

16 Mars
2012

Synthèse Bibliographique en Biologie et Biotechnologie

Revue - Mars 2012

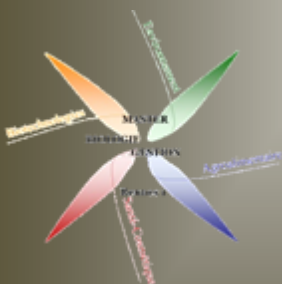
Les parabènes : Faut-il conserver les conservateurs ?

BARADAT Jonathan

BAILHACHE Thierry

Université Rennes 1 –UFR SVE

Master 2 Biologie Gestion Marketing
Université de Rennes 1
UFR Sciences de la Vie et de
l'Environnement



Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement M. Bailhache pour sa disponibilité et son aide lors de la réalisation de cette synthèse bibliographique.

Les parabènes : Faut-il conserver les conservateurs ?

2

J. Baradat

*Université de Rennes I - UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement – Campus de Beaulieu, 263
avenue du Général Leclerc, 35700 Rennes.*

Résumé

Les parabènes sont des esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Ils sont utilisés comme conservateurs dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire du fait de leurs propriétés antimicrobiennes et de leur faible coût. Leur activité augmente par accroissement de leur chaîne alkyle, entraînant également une diminution de leur solubilité en phase aqueuse. Une fois administrés, les parabènes sont rapidement absorbés et excrétés par l'organisme en différents composés grâce à des enzymes spécifiques. De nombreuses études ont été réalisées afin d'évaluer leur toxicité : celle-ci apparaît à des doses bien supérieures comparées à l'exposition journalière chez l'homme. Cependant, les récentes découvertes du rôle des parabènes en tant que perturbateurs endocriniens et de leurs responsabilités supposées dans l'apparition de tumeur, notamment les cancers du sein, a remis en cause leurs utilisations en tant que conservateurs.

Sommaire

Introduction	3
Qu'est-ce que les parabènes ?	4
Propriétés physico-chimiques	4
Absorption, métabolisme et excrétion des parabènes par l'organisme	6
Les parabènes dans l'industrie	8
Les parabènes dans l'industrie cosmétique	9
Les parabènes dans l'industrie agroalimentaire	9
Les parabènes dans l'industrie pharmaceutique.....	9
Effets biologiques des parabènes	10
Exposition aux parabènes.....	10
Etudes toxicologiques.....	10
Effets sur le système reproducteur et effets utéro-tropiques	14

Effet œstrogénique et rôle de perturbateur endocrinien	15	3
Conclusion	19	
Bibliographie	20	
Annexes	24	

Introduction

Les parabènes sont utilisés depuis plus d'un demi-siècle comme conservateur dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire, du fait de leur propriété antibactérienne et antifongique. Leur faible toxicité, leur faible coût et leurs caractéristiques physico-chimiques en font des conservateurs de premier choix. Du fait de leur utilisation massive, ils sont étudiés depuis de nombreuses années : Elder, en 1984, a réalisé un rapport complet sur l'utilisation des principaux parabènes. En 2005, Soni *et al.* ont mis à jour ces données avec les récentes études dans ce domaine.

Néanmoins, en 2004, la découverte par Darbre d'esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque dans les tumeurs cancéreuses du sein humain, relance le débat quant à leur rôle supposé dans l'apparition et la prolifération des cancers. Des investigations avaient déjà été menées sur l'effet potentiellement cancérigène des parabènes, notamment par Byford en 2002, ayant prouvé que ces derniers permettent la croissance des cellules cancéreuses MCF-7 du sein par leur activité œstrogénique.

Alors, suite à ces récentes découvertes, une des questions qui nous vient à l'esprit est « Faut-il conserver ces conservateurs ? »

Cette revue va peut-être permettre d'apporter quelques éléments de réponse. Dans un premier temps, une description de la nature des parabènes ainsi que leurs différentes propriétés physico-chimiques va permettre de mieux comprendre leurs rôles dans l'industrie de nos jours. Par la suite, une synthèse des effets biologiques des parabènes, notamment leurs toxicités à plus ou moins long terme, sera abordée. Celle-ci sera complétée finalement par les récentes études concernant les effets œstrogéniques des parabènes ainsi que leurs rôles en tant que perturbateur endocrinien dans la prolifération de tumeurs cancéreuses.

Qu'est-ce que les parabènes ?

4

Propriétés physico-chimiques

Les parabènes regroupent la famille des esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Ils sont obtenus par estérification du *p*-hydroxybenzoate en présence d'un alcool et d'acide sulfurique. Il existe différents types de parabènes en fonction de la nature de la chaîne alkyle. Ainsi, le méthyl, l'éthyl, le propyl ou encore le butyl parabènes peuvent être retrouvés, et ce sous différentes appellations (figure 1). L'éthyl parabène par exemple est également nommé éthyl-4-hydroxybenzoate ou encore *p*-hydroxybenzoate d'éthyl (Soni *et al.*, 2002).

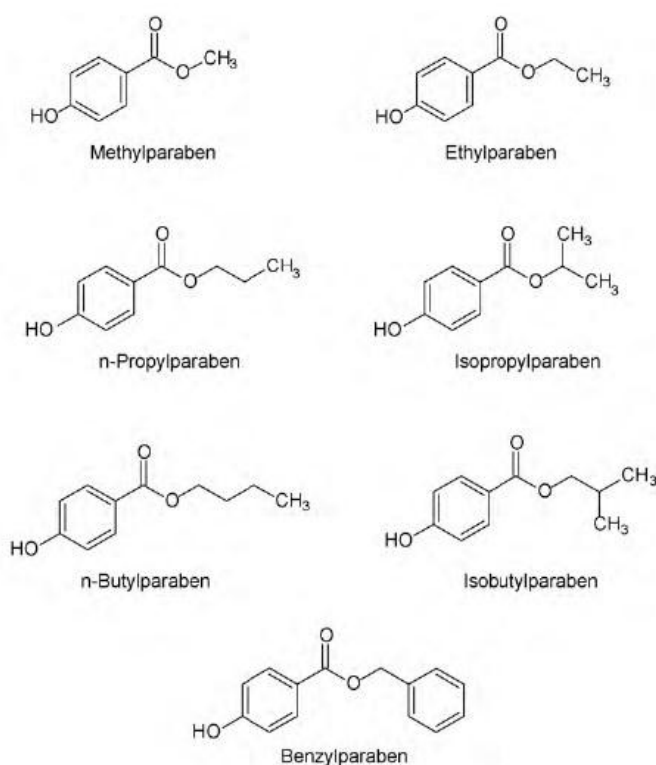


Figure 1 : Les différents parabènes les plus souvent utilisés (extrait de Boberg *et al.*, 2010)

Les parabènes sont utilisés depuis plus d'un demi-siècle comme conservateurs, de par leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, dans les secteurs de l'agroalimentaire, de la cosmétique mais aussi de la pharmaceutique. Les parabènes se trouvant sous forme de cristaux ou de poudre à température ambiante, il est nécessaire de les solubiliser à l'aide de solvant dans les formulations (Soni *et al.*, 2005).

Faiblement toxiques, biodégradables et nécessitant un faible coût, ce sont des conservateurs de choix (Soni *et al.*, 2002). Possédant également un large spectre d'action contre les bactéries, les levures et les moisissures, les parabènes peuvent être utilisés seuls ou en association avec d'autres conservateurs (parabènes ou non) afin d'augmenter leur efficacité (Boehm et Maddox, 1972 ; Turakka *et al.*, 1988). Certains produits complémentaires tels que des tensio-actifs, utilisés dans les formulations afin d'augmenter la solubilité des parabènes, accroîtraient également leurs efficacités (Darwish et Bloomfield, 1995). Par exemple, le carbopol, un polymère hydrophile très utilisé dans de nombreuses formulations, augmente l'activité antimicrobienne du méthyl parabène sur *Echirichia Coli* et *Pseudomonas Aeruginosa* (Scalzo *et al.*, 1996). Cependant, l'utilisation de tensio-actifs comme solvant entraîne en parallèle une diminution de la pénétration des parabènes au niveau de la peau. Une étude sur les coefficients de perméabilité réalisée en 1986 montre que l'utilisation de solubilisant tels que l'alcool conduit à une diminution de l'absorption des parabènes mais augmente leur activité antimicrobienne (Komatsu et Suzuki, 1986).

Certains scientifiques ont remarqué que ces conservateurs sont plus efficaces contre les Grams positifs que les Grams négatifs (Elder, 1984). Ce constat pourrait s'expliquer par la composition de leur membrane : les Grams négatifs possèdent des lipopolysaccharides (LPS), à l'inverse des Grams positifs. Effectivement, en 1985, Russel et Furr ont analysé l'effet des parabènes sur un type sauvage et un mutant d'*E.Coli* déficient en LPS. Il s'est avéré que les esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque sont plus efficaces sur les mutants.

Les mécanismes d'action des parabènes sont mal connus. Il est probable qu'ils inhibent les transports membranaires et les fonctions mitochondriales des bactéries (Soni *et al.*, 2002). Une autre explication a été avancée en 2005. Les bactéries possèdent 3 types de canaux mécano-sensibles (MscM, MscS et MscL) sur leur membrane plasmique, étant à l'origine de la régulation de leur pression osmotique. Les parabènes activeraient les canaux MscS et MscL en abaissant leur seuil d'activation, entraînant ainsi une ouverture anormale des canaux et une expulsion de composés cytoplasmiques, conduisant à la lyse cellulaire de la bactérie (Nguyen *et al.*, 2005).

Plus la longueur de la chaîne alkyle est importante, plus l'activité antifongique augmente, mais plus la solubilité dans l'eau diminue (Mac Robby et Parker, 1974). De nombreuses études font état de la solubilité des parabènes en solution aqueuse selon ce même constat. Comme les bactéries se développent essentiellement en phase aqueuse, la solubilité des parabènes détermine leur efficacité (Soni *et al.*, 2001). Ainsi, les parabènes à chaîne alkyle courte, tel que le méthyl et le propyl parabène, bien que moins efficaces, sont les plus utilisés car plus solubles en phase aqueuse (Routledge *et al.*, 1998).

Il semblerait que les bactéries s'adaptent plus aisément aux composés de poids moléculaires importants. Ainsi, *E.coli* s'accommode rapidement au propyl parabène et plus difficilement au méthyl parabène, entraînant des courbes de survie différentes en fonction de la nature des parabènes administrés (O'Neill et Mead, 1982).

Robach et Pierson ont analysé en 1978 l'efficacité des parabènes sur *Clostridium Botulinium* par rapport à sa croissance et sa production de toxine. Ainsi, une dose de 400 ppm de méthyl et propyl parabène n'entraîne que peu d'effet, alors que des doses plus importantes (1000 et 1200 ppm) retardent ou inhibent respectivement la germination. Ceci détermine une concentration minimale de parabène nécessaire pour que la conservation soit assurée (MIC)¹ (Russell *et al.* 1985).

Les parabènes possèdent également une certaine efficacité contre les champignons, même à faible concentration (Elder, 1984).

Les esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque sont stables aux variations de pH, notamment dans les solutions acides et neutres. Ils restent efficaces dans des solutions dont le pH est compris entre 4,5 et 7,5 (Maddox, 1982). Cependant, dans les solutions basiques (pH supérieur à 8), les parabènes perdent de leur efficacité en tant que conservateurs (Rosen et Berke, 1973). Ils sont aussi stables aux variations de température. Ainsi, les produits contenant des parabènes peuvent être autoclavés, notamment dans l'industrie cosmétique, sans perte significative de leur activité antimicrobienne (Maddox, 1982). Leurs points d'ébullition élevés en font également des conservateurs très utilisés en agroalimentaire, notamment pour des produits cuits (Soni *et al.*, 2005).

Absorption, métabolisme et excrétion des parabènes par l'organisme.

De nombreuses expériences ont montré que les parabènes, une fois administrés, étaient rapidement et complètement absorbés par le tractus gastro intestinal et la peau pour être hydrolysés. Les parabènes à longue chaîne alkyle pénètrent mieux dans la peau (Lee et Kim, 1994). En 1956, Jones *et al.*, après une administration orale (1g/kg) et intraveineuse (50mg/kg) de parabènes à des chiens, a montré que respectivement 89% et 85% de la dose initiale était présente dans les urines 48h après administration. De plus, suite à une administration orale de méthyl et de propyl parabène, ceux-ci ne sont pas excrétés dans les matières fécales, suggérant qu'ils sont complètement absorbés par l'organisme (Schuebel et Manger, 1929).

Le principal métabolite issu de l'hydrolyse des parabènes par l'organisme est l'acide *p*-hydroxybenzoïque, qui peut être conjugué avec la glycine, l'acide glucuronique ou l'acide sulfurique (figure 2). En effet, après une administration orale de 0,4 à 0,8g/kg de méthyl parabène à un lapin, 86% de cette dernière était excrétée dans les urines en 24h, dont 39% sous forme d'acide *p*-hydroxybenzoïque seul, 15% conjugué avec la glycine, 15% avec l'acide

¹ MIC : Concentration minimale d'inhibition

glucuronique et 10% avec l'acide sulfurique (Tasukamoto et Terada, 1964). Les parabènes sont très fortement dégradés, il ne reste qu'une faible quantité de molécules intactes dans le sérum humain (Ye *et al.*, 2008) et dans les urines (Ye *et al.*, 2006). Selon la revue de Boberg *et al.* en 2010, seulement 0,1% de parabènes libres et non conjugués sont retrouvés dans le sérum humain.



Figure 2 : Deux métabolites principaux des parabènes.

L'acide *p*-hydroxyhippurique correspond à une glycine conjuguée (extrait de Boberg *et al.*, 2010)

La forte proportion d'acide *p*-hydroxybenzoïque présente dans les urines après administration de parabènes suggère une hydrolyse de la liaison ester de ces derniers. Ainsi, une étude menée par Derache et Gourdon en 1963 a montré qu'une dose de méthyl et propyl parabène administrée oralement à un rat était totalement absorbée par le tube digestif puis hydrolysée grâce à une estérase environ 30 min après ingestion. De même, après administration d'une dose en intraveineuse de méthyl parabène (100mg/kg/jour) à des chiens, les ester sont présents uniquement dans le cerveau, la rate et le pancréas, alors qu'une forte concentration en métabolites est détectée dans le foie et les reins. Une analyse *in vitro* de ces derniers a permis de mettre en évidence une forte activité des estérases dans ces organes (Elder, 1984). Ces enzymes sont également présentes au niveau de la peau, mais en quantité plus faible par rapport au foie, entraînant une hydrolyse des parabènes plus lente à ce niveau (Prusakiewicz *et al.*, 2006).

L'utilisation d'inhibiteurs d'estérases tel que le diisopropyl fluorophosphate inhibe l'apparition de métabolites, suggérant que cette enzyme est bien à l'origine de la dégradation des parabènes (Seko *et al.*, 1999). En 1996, une étude a été menée sur l'hydrolyse des parabènes sur la peau humaine. Quatre isoformes de la carboxyl-estérases ont été identifiés sur la peau et dans le tissu sous-cutanée, avec des localisations et des affinités différentes en fonction de la nature des parabènes (tableau 1) (Lobemeier *et al.*, 1996).

Enzymes	Localisation	Substrats préférentiels
Parabène carboxylestérase I	Tissu adipeux sous cutané	Méthyl parabène
Parabène carboxylestérase II	Tissu adipeux sous cutané	Butyl parabène
Parabène carboxylestérase III	Kératinocyte	Butyl parabène
Parabène carboxylestérase IV	Sang	NC ²

8

Tableau 1 : Les différentes carboxyl-estérases présentent au niveau de la peau et du sang humain

(inspiré de Lobemeier *et al.*, 1996)

La métabolisation des parabènes se décompose en deux étapes : la première consiste en l'hydrolyse en *p*-hydroxybenzoate, la seconde en la production des autres métabolites à partir de ce dernier (Derache et Gourdon, 1963).

Du fait de la forte proportion de *p*-hydroxybenzoate dans les urines, des études se sont intéressées à son éventuelle toxicité. Sa DL50³ a été déterminée à une valeur de 6g/kg alors que sa NOAEL⁴ est de 1g/kg/j. De plus, il est non embryotoxique et tératogène (Organisation for Economic and Co-operation Development, 1999). Le *p*-hydroxybenzoate a également une légère activité oestrogénique *in vivo* sur la souris (Lemini *et al.*, 1997), qui n'est pas observée *in vitro* (Routledge *et al.*, 1998).

Les parabènes dans l'industrie

Utilisés massivement de nos jours dans l'industrie du fait de leurs efficacités, de leurs faibles toxicités et de leurs faibles coûts, les parabènes sont également présents à l'état naturel dans la vanille, le fruit de la passion ou encore la plaquebière (Soni *et al.*, 2002). En 1979, Goodwin *et al.* ont découvert la présence de méthyl parabène dans les sécrétions vaginales de chiens en œstrus.

Certaines études ont également montré que des bactéries produisent du phénol en présence de parabènes. C'est le cas par exemple de *Klebsiella aerogenes*, *P. aeruginosa*, de *Pseudomonas cepacia* (Nakamori *et al.*, 1975 ; Horiuchi *et al.*, 1994) ou encore de certaines bactéries marines (Peng *et al.*, 2006). Il a été également démontré que certaines espèces de *Pseudomonas* dégradent les parabènes pour les utiliser comme source de carbone et facteur de croissance (Beveridge et Hart, 1970).

² NC : Non communiqué

³ DL50 : Dose létale 50%. Dose qui élimine 50% de l'échantillon.

⁴ NOAEL : No observed adverse effect level. Dose limite à partir de laquelle il n'y a toujours pas d'effets négatifs observés.

Les parabènes dans l'industrie cosmétique.

9

Les parabènes sont très utilisés dans le domaine de la cosmétique, notamment le méthyl et le propyl parabène (Soni *et al.*, 2001). Plus de 13 200 formulations cosmétiques comprenant cette famille de conservateur ont été référencées (Elder, 1984).

Leur utilisation intensive dans ce milieu est corrélée à certaines de leurs caractéristiques : ils sont inodores, ils ne décolorent pas les vêtements et ne durcissent pas les crèmes (Neidig et Burrell, 1944). Ainsi, les parabènes peuvent être utilisés en toute sécurité sur la peau, les cheveux, les lèvres, les muqueuses, les ongles et les aisselles, et ceci de manière occasionnelle ou quotidienne (Mowad, 2000).

Selon une étude faite par Rastogi *et al.* en 1995, sur 215 produits cosmétiques analysés, près de 98% contenaient du méthyl parabène. Dix ans plus tard, ce chiffre est descendu à 80%, probablement du fait des récentes découvertes sur le développement de cancer corrélé avec leur utilisation (Rousselle, 2005).

La dose de conservateurs, tel que les parabènes, autorisée dans les produits cosmétiques ne doit pas dépasser 0,8% (Rastogi *et al.*, 1995).

Les parabènes dans l'industrie agroalimentaire

De par leur faible toxicité et leur solubilité en phase aqueuse, les parabènes ont rapidement intéressé les industriels de l'agroalimentaire. Ainsi, nous pouvons les retrouver dans de multiples aliments tel que les boissons, les produits surgelés, les sirops, les sauces ou encore les légumes (Soni *et al.*, 2002). L'utilisation de méthyl parabène en tant que conservateur a été reconnue comme sûre (FDA, GRAS 1973).

En moyenne, la dose journalière absorbée a été estimée entre 1 et 16 mg/kg/jour pour un enfant et entre 4 et 6 mg/kg/jours pour un adulte (Elder, 1984).

Les parabènes dans l'industrie pharmaceutique

La première utilisation des parabènes s'est faite dans l'industrie pharmaceutique, au milieu des années 20 (Sabalitschka, 1930). On les retrouve dans de nombreux produits médicaux, comme les sirops, les suppositoires ou encore certains produits injectables comme les anesthésiques. Les concentrations de parabènes dans les produits de santé n'excèdent que très rarement 1% (Neidig et Burrell, 1944 ; Boehm et Maddox, 1972). Ils sont également utilisés dans les produits pharmaceutiques en libre-service. Cependant, l'utilisation de méthyl ou de propyl parabène seuls dans des produits ophtalmiques est à proscrire : aux

concentrations efficaces contre les micro-organismes, ces conservateurs peuvent être irritants pour les yeux. En effet, une étude menée par Furrer et son équipe en 1999 a montré qu'une solution de parabènes supérieure à 0,1% était irritante pour la cornée. Certains parabènes, tel que le méthyl ou le propyl parabène, sont inefficaces dans les dentifrices, les solutions intranasales et dans la plupart des produits injectables (Soni *et al.*, 2002).

Effets biologiques des parabènes

Exposition aux parabènes

L'exposition aux parabènes a été évaluée à une valeur de 1,3mg/kg/jour, dont 0,79, 0,34 et 0,0016mg/kg/jour dues respectivement au méthyl, propyl et butyl parabène. De plus, une ADI⁵ de 10 mg/kg/jour pour le méthyl et l'éthyl parabène a été jugée comme n'ayant aucun effet sur la santé. Aucune recommandation n'a été faite pour le propyl-parabène (Cowan-Ellsberry et Robinson, 2009). Les marges de sécurité (rapport entre les doses journalières administrées et les LOAEL⁶) observées pour le propyl et le méthyl parabène ont été estimées à 19 et 7 respectivement, mais ces valeurs varient en fonction du LOAEL utilisée (Boberg et al., 2010).

La consommation journalière de parabènes chez l'homme a été estimée à 0,1mg/kg/jour dans la nourriture. En outre, les expositions concernant les cosmétiques et les médicaments sont respectivement de 0,83 et 0,41 mg/kg/jour. Ainsi, l'homme consomme en moyenne 1,26 mg/kg/jour de parabènes (Soni *et al.*, 2005).

Etudes toxicologiques

De nombreuses études, à plus ou moins long terme, ont été menées sur le modèle animal afin de mettre en évidence une éventuelle toxicité des parabènes en fonction du mode d'administration. Le méthyl parabène est souvent le plus étudié car c'est le plus utilisé dans l'industrie.

⁵ ADI : Acceptable Daily Intake. Dose journalière admissible

⁶ LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level. Dose minimale pour laquelle un effet néfaste est observé

Toxicité aiguë : les doses létales

Administration orale

Des études ont été menées afin de connaître l'éventuelle toxicité des parabènes et notamment leurs doses létales. Une DL50 de méthyl parabène de 8g/kg pour une administration orale, et de 2g/kg sous forme de sel de sodium a été déterminé chez la souris. A ces doses, une perte du contrôle musculaire (ataxie) ainsi qu'une forte dégradation du système nerveux sont observés avant la mort (Matthews *et al.*, 1956).

Administration cutanée

Les effets des parabènes ont été étudiés sur la peau des lapins. Après 14 jours de traitement avec un produit cosmétique contenant 0,2% de méthyl parabène, aucun effet toxique significatif n'a été observé. De même, il a déterminé que la DL50 d'un produit cosmétique contenant un mélange de 0,2% de méthyl et 0,1% de propyl parabène était de 2g/kg (Elder, 1984).

Administration sous-cutanée

Différentes études pour étudier la toxicité des parabènes en voie sous-cutanée ont été élaborées. Des doses supérieures à 165 mg/kg entraîneraient une détresse respiratoire et une ataxie chez la souris (Bijlsma, 1924). De plus, Mason *et al.*, en 1971, ont étudié la toxicité du méthyl parabène dans les vaccins chez le rat. La DL50 en sous-cutanée était supérieure à 500mg/kg car aucune mort n'a été observée à cette dose sur 20 animaux.

Administration intraveineuse

Une paralysie chez la souris ainsi qu'une chute de la pression artérielle sont observées chez le chien après administration d'une dose de parabène de 80 mg/kg en intraveineuse. Pour des doses allant jusqu'à 1400 mg/kg, des effets cardio-vasculaires entraînent la mort des sujets. Ainsi, une DL50 de 170 mg/kg en intraveineuse a été déterminée pour le méthyl parabène. De plus, aucun effet sur le système nerveux n'a été répertorié (Matthews *et al.*, 1956).

Administration intra péritonéal

12

Une étude sur les souris a montré qu'une dose de méthyl parabènes comprise entre 300 et 400 mg/kg entraînait des paralysies. Une DL50 de 960 et de 760 mg/kg selon qu'il s'agisse respectivement de l'ester ou de son sel sodé a été déterminé (Matthews *et al.*, 1956).

Ainsi, nous observons que les DL50 les plus importantes concernent les administrations orales : ceci est dû au fait que par cette voie, les parabènes sont davantage dégradés au moment de leur passage dans le tube digestif, en comparaison avec les autres modes d'administration (tableau 2).

Espèce	Voie d'administration	Parabène	DL50 (mg/kg)
Souris	Intrapéritonéal	Méthyl parabène	960
	Intrapéritonéal (sel)		760
	Orale		8000
	Orale (sel)		2000
	Intraveineuse (sel)		170
Lapin	Cutanée	Méthyl(0,2%)/Propyl(0,1%)	2000
Rat	Sous-cutanée	Méthyl parabène	>500

Tableau 2 : les DL50 du méthyl parabène selon les différentes voies d'administration.

Effets à court terme

Administration orale

A des doses de 18mg/kg /jour pendant 28 jours et 53mg/kg/jour pendant 4 jours, aucun effet toxique n'a été répertorié chez le chien (Bijlsma, 1928).

D'autres investigations plus récentes ont permis d'approfondir ces résultats : des doses plus importantes ont été administrées chez le lapin, à savoir 500 mg/kg/jour. Là encore, aucun effet toxique n'a été observé (Food and Drug Administration, 1973).

Administration cutanée

Une investigation sur le lapin a été réalisée en appliquant un produit cosmétique contenant 0,2% de méthyl parabène à des doses comprises entre 5,5 et 11 mg/cm² sur 8,4% de la surface du corps, pour une durée de 3 mois. A la fin de l'expérience, les scientifiques ont

observé un érythème modéré, une légère desquamation de la peau ainsi qu'un œdème. Les analyses hématologiques et histologiques se sont avérées négatives, ne montrant ainsi aucun effet dus au traitement (Elder, 1984).

Effets à long terme

Les études sur les effets des parabènes au long terme sont importantes afin de mieux comprendre quelles peuvent être les conséquences d'une exposition continue à ces conservateurs pour l'organisme, et les éventuels effets qui peuvent en découler. De nombreuses études ont été menées en ce sens, sans montrer une réelle corrélation avec une exposition aux parabènes. De plus, les études à long terme ont montré que les parabènes n'étaient pas accumulés dans l'organisme (Boberg *et al.*, 2010).

En 1956, Matthews et son équipe ont nourri des rats durant 96 semaines avec des doses de parabènes comprises entre 1,05 et 5,5g/kg/jour. Les résultats montrent une légère augmentation du poids de la rate pour les spécimens ayant reçu les plus fortes doses journalières. Cet effet est plus marqué chez les mâles. En 1971, Mason *et al.*, après administration à des rats de différentes doses de méthyl parabènes comprise entre 0,6 et 3,5 mg/kg deux fois par semaine durant 1 an, n'ont pas observé de différences significatives avec les rats contrôles non traités. Des rations en gélule de 0,5 et de 1g/kg/jour de méthyl et propyl parabène ont été données à des chiens pendant une période d'un an. Aucuns effets n'ont été observés.

Selon un rapport de la FDA, un effet toxique des parabènes a été reporté à partir d'une dose journalière de méthyl et de propyl parabène de 4g/kg/jour (Food and Drug Administration, 1973).

Embryotoxicité et effet tératogène

L'embryotoxicité et le potentiel effet tératogène des parabènes, c'est-à-dire entraînant des malformations chez le fœtus, ont été étudiés par un laboratoire de recherche américain, en 1972 et 1973, sur différentes espèces animales. Le protocole expérimental est résumé dans le tableau suivant : des doses variables de méthyl parabène ont été administrées par voie orale à différents moments de la gestation en fonction des espèces (4 groupes de 21 à 25 animaux). Le fœtus a ensuite été prélevé par césarienne pour permettre une observation des organes et du squelette (tableau 3).

	Souris	Rat	Hamster	Lapin
Dose orale de méthyl parabène (mg/kg)	5,5		3	
	25,5		14	
	118		65	
	550		300	
Administration (jour de gestation)	du 6ème au 15ème jour		du 6ème au 10ème jour	du 6ème au 18ème jour
Césarienne	17ème jour	20ème jour	14ème jour	29ème jour

Tableau 3 : Protocole expérimental afin de déterminer l'embryotoxicité des parabènes

Finalement, l'administration d'une dose de 550 et de 300 mg/kg à des animaux en période de gestation n'a entraîné aucun effet notable sur la nidation ni d'anomalies dans les tissus viscéraux et squelettiques des fœtus. Ceci indique donc que le méthyl parabène, tout du moins aux doses administrées, n'a pas d'effet embryogénique et tératogène (Food and Drug Research Labs, 1973). Une étude plus récente *in vivo* faite sur des rats a montré que les parabènes peuvent passer de la mère au fœtus via le placenta. De plus, des doses plus importantes de parabènes non dégradées se retrouvent ainsi dans le fœtus (Frederiksen *et al.*, 2008).

Effets sur le système reproducteur et effets utérotropiques

Deux études ont montré que certains parabènes (butyl et propyl parabènes) réduisent le taux de sperme ainsi que la production de testostérone chez des rats, suite à une administration orale durant 1 à 2 mois, pour des doses allant de 10 à 1000 mg/kg/jour (Oishi, 2001 et Oishi, 2002a). Ainsi, une LOAEL⁷ de 10mg/kg/jour est déterminée. Des résultats semblables ont également été trouvés chez la souris (Oishi, 2002b) pour des doses de 146 mg/kg/jour. Cependant, toutes les voies d'administration n'ayant pas été étudiées, il est difficile d'émettre une quelconque hypothèse sur les effets des parabènes sur l'appareil reproducteur.

Une expérience menée par Routledge *et al.* en 1998 s'est intéressée à l'évolution du poids de l'utérus d'un rat immature en fonction de la prise de parabène. Le butylparabène

⁷ LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level. Dose minimale pour laquelle un effet néfaste est observé

entraîne une légère augmentation par prise orale, celle-ci est plus importante par prise sous-cutanée. En revanche, le méthyl parabène n'a pas d'effet sur le poids de l'utérus.

Effet œstrogénique et rôle de perturbateur endocrinien

Différentes expériences avaient déjà été réalisées antérieurement afin de mettre en évidence le possible effet cancérigène des parabènes. A ce titre, dans l'étude de Matthews décrite plus haut, aucun effet cancérigène n'a été observé après analyse des organes (Matthews *et al.*, 1956). De même, Kirschstein en 1973, a souhaité étudier le potentiel effet cancérigène de conservateurs utilisés dans les produits biologiques sur des souris et des rats. Pour cela, il a inoculé une ou plusieurs doses de méthyl parabènes et observé les effets durant plusieurs mois. Finalement, il en a conclu qu'aucunes différences significatives n'étaient observées entre les animaux traités et les témoins, le pourcentage d'adénome au poumon étant respectivement de 14% et 14,5%.

La découverte en 2004 de la présence de parabènes dans les cellules cancéreuses du sein par Darbre et son équipe a remis en cause leur utilisation en tant que conservateur antimicrobien. En effet, un grand nombre de cancer du sein trouvent leurs origines dans le cadran inférieur latéral de ce dernier, zone d'application d'anti-transpirant notamment, contenant des parabènes (Crinnion, 2010). Le caractère lipophile de ces derniers leur permet de traverser facilement les tissus adipeux, dont le sein, et se retrouver en grande quantité dans le lait maternel (Darbre, 2006).

De plus, l'influence des œstrogènes dans l'apparition de cancer du sein est reconnue depuis de nombreuses années (Lipworth, 1995). Les parabènes possèdent une structure similaire aux alkylphénols (figure 3) reconnus pour leur activité œstrogéniques, notamment chez la levure (Routledge et Sumpter, 1996). De ce fait, certaines études ont montré que les parabènes jouent le rôle de perturbateurs endocriniens à forte concentration, leur activité œstrogénique ayant été établie dans un grand nombre de publications (Routledge *et al.*, 1998 ; Boberg *et al.*, 2010). En effet, sur 25 études *in vitro* et *in vivo* portant sur l'effet œstrogénique des parabènes, 24 ont conclu que les parabènes étaient bien des perturbateurs endocriniens (Darbre et Harvey, 2008). La diminution de l'activité œstrogénique des parabènes lors de l'utilisation d'un anti-œstrogène, le tamoxifène, confirme leur rôle de perturbateur endocrinien (Routledge *et al.*, 1998).

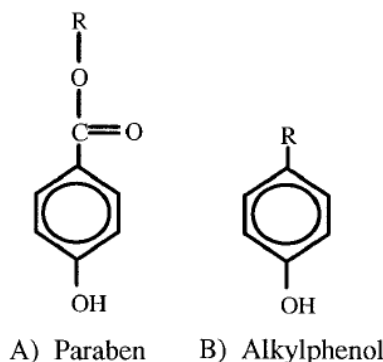


Figure 3 : Comparaison de la structure des parabènes avec celle des alkylphénols

(extrait de Routledge *et al.*, 1998)

Ainsi, les parabènes ont été qualifiés de xéno-œstrogènes, c'est-à-dire des molécules fabriquées par l'homme et imitant l'effet des œstrogènes (Darbre, 2006).

L'augmentation de l'activité œstrogénique des parabènes est corrélée avec la longueur de la chaîne alkyle : plus cette dernière est importante, plus l'activité augmente. Ce constat est également observé lors de l'accroissement de l'arborescence entre le propyl et l'isopropyl parabène, ainsi qu'entre le butyl et l'isobutyl parabène (Okubo *et al.*, 2001). Seulement, cette œstrogénicité est très faible comparée au 17β -œstradiol, principal œstrogène naturel (Routledge *et al.*, 1998). Toutefois, il est important de se questionner pour savoir s'il existe un lien entre la quantité de parabène, possédant un effet œstrogénique avéré, retrouvée dans les cellules cancéreuses, et l'apparition puis le développement de tumeur.

En 2008, Darbre et Harvey, après l'analyse complète de près de 150 références scientifiques sur la toxicité des parabènes, ont conclu que l'exposition aux parabènes et l'augmentation des cancers du sein étaient probablement indépendantes. En 2002, Byford s'est intéressé à l'effet œstrogénique des parabènes chez l'homme et leur rôle dans la prolifération des MCF-7⁸, cellules issues d'un cancer du sein. Cet effet était établi antérieurement chez le poisson et le rat (Pedersen *et al.*, 2000 ; Routledge *et al.*, 1998). Il a été montré que les parabènes sont capables de se lier au récepteur des œstrogènes ER α des cellules MCF-7, via leur groupe hydrophénolique, au niveau du domaine LBD⁹. La liaison sur ce dernier se fait en compétition avec le 17β -œstradiol. Ainsi, pour inhiber l'effet de l'œstradiol, c'est-à-dire empêcher sa liaison au récepteur, les concentrations en parabènes doivent être 10 000 à 2 500 000 de fois supérieures, l'inhibition augmentant avec la longueur de la chaîne alkyle. Les parabènes ont donc beaucoup moins d'affinités pour les ER α que les œstrogènes naturels tels que l'œstradiol. L'affinité des parabènes pour les récepteurs ER α et Er β a également été

⁸ MCF7 : Michigan Cancer Foundation Seventh sample : Lignée cellulaire issue d'un cancer du sein.

⁹ LBD : Ligand Binding Domain

étudiée. Celles-ci sont identiques, indiquant qu'il n'y a pas de spécificité de liaison des parabènes pour ces différents types de récepteur aux œstrogènes (Okubo *et al.*, 2001). Ainsi, par liaison aux ER α , les parabènes sont capables de réguler l'expression de gène reporter œstrogène-dépendant.

Les parabènes sont capables d'augmenter l'expression de certains gènes. C'est le cas par exemple du gène ps2, exprimé également dans les cellules MCF7. Là encore, l'analyse Northern Blots des ARNm de ps2 montre bien l'effet œstrogénisant des parabènes et leur influence dans l'expression du gène, avec une efficacité moindre par rapport au 17 β -œstradiol (annexe 1).

Enfin, Byford a également mis en évidence la capacité des parabènes à augmenter la prolifération des MCF-7 sur une culture monocouche. De plus, d'après le tableau suivant, on constate un accroissement de la prolifération des cellules cancéreuses avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle. De ce fait, une plus faible concentration en propyl ou butyl parabène est nécessaire pour obtenir une même croissance cellulaire. Cependant, les concentrations nécessaires en parabène pour obtenir une même croissance de 10⁶ cellules sont beaucoup plus élevées (10 000 à 1 000 000 de fois) par rapport à l'œstradiol (Byford *et al.*, 2002). Selon une autre étude similaire, l'isopropyl et l'isobutylparabène induisent également une augmentation de la croissance des cellules cancéreuse MCF-7, avec un maximum de prolifération à 5.10⁻⁶M (tableau 4). Ainsi, les EC50¹⁰ des parabènes sont répartis selon l'ordre croissant suivant : isopropyl, isobutyl, butyl, propyl, éthyl et méthyl parabène (Okubo *et al.*, 2001).

	Œstradiol	Méthyl parabène	Ethyl parabène	Propyl parabène	Butyl parabène	Isopropyl parabène	Isobutyl parabène	Référence
C _{max} ¹¹	10 ⁻¹⁰ M	2. 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	5.10 ⁻⁶ M	ND ¹²	ND	Byford <i>et al.</i> , 2002
	3.10 ⁻¹¹ M	2. 10 ⁻⁴ M	2.10 ⁻⁵ M	2.10 ⁻⁵ M	2.10 ⁻⁵ M	5.10 ⁻⁶ M	5.10 ⁻⁶ M	Okubo <i>et al.</i> , 2001

Tableau 4 : Concentration en parabènes entraînant une croissance des cellules MCF-7

(inspiré de Byford *et al.*, 2002 et Okubo *et al.*, 2001)

L'utilisation d'un anti-œstrogène (ICI 182,720) conduit à une diminution de l'expression des ER et à l'arrêt de la prolifération des cellule MCF7 en présence de parabènes, ce qui traduit que la croissance observée précédemment est bien le fait de l'activité œstrogénique des

¹⁰ EC50 : Concentration pour laquelle on obtient 50% de l'efficacité maximale

¹¹ C_{max} : Concentration pour laquelle la prolifération cellulaire est maximale

¹² ND : Non Déterminé dans cette étude

parabènes et que ces cellules cancéreuses sont bien œstrogène-dépendantes (Byford *et al.*, 2002 ; Okubo *et al.*, 2001).

18

Les parabènes sont également capables de diminuer l'expression des gènes des ER α et d'augmenter celle des récepteurs à la progestérone PR, tout comme le 17 β -œstradiol mais dans une moindre mesure (annexe 2) (Okubo *et al.*, 2001).

En 2007, Prusakiewicz a apporté une nouvelle approche quant au rôle de perturbateur endocrinien des parabènes. Il a montré que ces derniers ont une action inhibitrice *in vitro* et *in vivo* sur les sulfo-transférases de la peau et du foie (SULT) dont le rôle est de métaboliser les œstrogènes. Cette activité inhibitrice est plus importante au niveau du foie que de la peau. Elle croît également en fonction de la longueur de la chaîne alkyle, ce qui est en adéquation avec les observations déjà faites. Par contre, aucune activité inhibitrice n'a été détectée pour le principal métabolite des parabènes, le *p*-hydroxybenzoate. Du fait de leur inhibition par les parabènes, une augmentation de la concentration des œstrogènes est observée, expliquant alors l'activité œstrogénique de ces conservateurs. Il est évident que les parabènes sont en fait des substrats des sulfo-transférases, expliquant l'origine des parabènes sulfo-conjugués retrouvés dans les métabolites présents dans les urines.

Conclusion

Les parabènes, de par leurs caractéristiques antimicrobiennes, sont utilisés depuis des décennies en tant que conservateurs, et ce dans de nombreuses industries. Possédant un large spectre d'action sur de nombreux microorganismes, solubles dans l'eau, stables à la température ainsi qu'aux pH et nécessitant un faible coût, les parabènes semblent être des conservateurs de choix pour de nombreux industriels. Un tel engouement pour ce type de produit a forcément fait l'objet de multiples études depuis de nombreuses années, notamment afin de déterminer leur éventuelle toxicité. Aux doses administrées, il ne fait nul doute que les parabènes ne présentent que très peu de risque pour la santé, les LOAEL et les DL50 étant très nettement supérieures à l'exposition journalière, aujourd'hui estimée à 1,26 mg/kg/jour.

Cependant, les récentes découvertes de parabènes dans les tumeurs cancéreuses du sein chez l'homme relance la polémique quant à leur utilisation. Leur activité oestrogénique, même si moins importante que le principal œstrogène naturel, le 17β -œstradiol, les classe parmi les perturbateurs endocriniens à surveiller. Ainsi, les parabènes peuvent se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes ER α et par la même réguler l'expression de certain gènes. Alors quel est le rôle de ces conservateurs dans le développement de cancers ? Même si ces études ont montré leur capacité à permettre la prolifération de cellules cancéreuses, notamment les cellules MCF-7 du sein, l'apparition de cancer peut-elle leur être uniquement imputée ? Il semblerait que non, d'autres facteurs complémentaires entrant très certainement en compte.

Ainsi, la découverte de l'effet oestrogénique des parabènes a entraîné une limitation de leur utilisation depuis 2005 (Reisch, 2005), augmentant ainsi l'offre de produit « sans parabène ». Il paraît essentiel pour les industriels de trouver une alternative à ces conservateurs que l'on pensait idéaux. Quelles seraient alors les nouvelles pistes pour nous permettre une conservation adéquate et sans risque pour l'homme, mais également pour l'environnement, de tous ces produits de grande consommation ? Les prochaines études devraient très certainement nous éclaircir davantage sur ces nouveaux conservateurs, jusqu'à la découverte peut être de nouveaux effets néfastes qui nous amèneront à nous renouveler.

Bibliographie

BEVERIDGE E.G., HART A. *The utilization for growth and the degradation of p-hydroxybenzoate esters by bacteria*. International Biodeterioration Bulletin, 1970, 6, 9-12.

BIJLSMA U.G. *Solbrol-p-hydroxybenzoic acid methyl ester*. Archives of international Pharmacodynamics and Therapeutics, 1928, 34, 173-179.

BOBERG J., TAXVIG C., CHRISTIANSEN S., HASS U. *Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites*. Reproductive Toxicology, 2010, 30, 301-312.

BOEHM E.E., MADDOX D.N. *Recent applications for preservatives of pharmaceuticals*. Manufacturing Chemists Aerosol News, 1972, 43, 21-23.

BYFORD J.R., SHAW L.E., DREW M.G.B., POPE G.S., SAUER M.J., DARBRE P.D. *Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells*. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2002, 80, 49-60.

COWAN-ELLSBERRY C.E., ROBINSON S.H. *Refining aggregate exposure : example using parabens*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009.

CRINNION W.J. *Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens*. Alternative Medicine Review, 2010, 3, 190-196.

DARBRE P.D., ALJARRAH A., MILLER W.R., COLDHAM G., SAUER M.J., POPE G.S. *Concentrations of parabens in human breast tumours*. Journal of Applied Toxicology, 2004, 24, 5-13.

DARBRE P.D. *Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006, 20, 121-143.

DARBRE P.D., HARVEY P.W. *Parabens esters : reviews of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks*. Journal of Applied Toxicology, 2008, 28, 561-78.

DARWISH R.M., BLOOMFIELD S.F. *The effect of cp-solvent on the antimicrobial activity of paraben preservatives*. International Journal of Pharmaceutics, 1995, 119, 183-192.

DERACHE R., GOURDON J. *Metabolism of a food preservative: p-hydroxybenzoic acid and its esters*. Food and Cosmetics Toxicology, 1963, 1, 189-195.

ELDER R.L. *Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben*. Journal of the American College of Toxicology, 1984, 3, 147-209.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Methyl paraben and propyl paraben. Affirmation of GRAS status of direct human food ingredients*. Federal Register, 1973, 38, 2048-2050.

FOOD AND DRUG RESEARCH LABS. *Teratologic evaluation of FDA 71-38 (methyl paraben) US NTIS report (PB-223817)*, 1973, 14.

FREDERIKSEN H., TAXVIG C., HASS U., VINGGAARD A.M., NELLEMAN C. *Higher levels of ethyl paraben and butyl paraben in rat amniotic fluid than in maternal plasma after subcutaneous administration*. Toxicological Sciences, 2008, 106, 376-383.

FURRER P., MAYER J.M., PLAZONNET B., GURNY R. *Ocular tolerance of preservatives on the murine cornea*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1999, 47, 105-112.

GOODWIN M., GOODING K.M., REGNIER F. *Sex pheromone in the dog*. Science, 1979, 203, 559-561.

HORIUCHI K., MORIMOTO K., KOBASHI K., MITSUI T., SUEMITSU R. *Transesterification of ethyl paraben by free and entrapped cells of Pseudomonas cepacia*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 77, 324-325.

JONES P.S., THIGPEN D., MORRISON J.L., RICHARDSON A.P. *p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. III. The physiological disposition of p-hydroxybenzoic acid and its esters*. Journal of American Pharmaceutical Association, Science

Edition, 1956, 45, 265–273.

21

KIRSCHSTEIN, R.L. *Toxicology and carcinogenicity of preservatives used in the preparation of biological products*. International Symposium on Preservatives in Biological Products, San Francisco 1973. Developmental Biology Standard, 1973, 24, 203-212.

KOMATSU H., SUZUKI M., *Percutaneous absorption of butylparaben through guinea pig skin in vitro*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1986, 68, 596-598

LEE C.H., KIM H.J. *A study on the absorption mechanismsof drugs through biomembranes*. Archives of Pharmacal Research, 1994, 17, 182-189.

LEMINI C., SILA G., TIMOSSO C., LUQUE D., VALVERDE A., GONZALEZ-MARTINEZ M., HERNANDEZ A., RUBIO-POO C., CHAVEZLARA B., VALENZUELA F. *Estrogenic effects of p-hydroxybenzoic acid in CD1 mice*. Environmental Research, 1997, 75, 130-134.

LIPWORTH L. *Epidemiology of breast cancer*. European Journal of Cancer Prevention, 1995, 4, 7-30.

LOBEMEIER C., TSCHOETSCH C., WESTIE S., HEYMANN E. *Hydrolysis of parabens by extracts from differing layers of human skin*. Biological Chemistry, 1996, 377, 647-651.

LONNING P.E. *Endocrinology and treatment of breast cancer*. Clinics in Endocrinology and Metabolism, 2004, 18, 1-130.

MADDOX D.N. *The role of p-hydroxy-benzoates in modern cosmetics*. Cosmetics and Toiletries, 1982, 97, 85-88.

MASON M.M., CATE C.C., BAKER J. *Toxicology and carcinogenesis of various chemicals used in the preparations of vaccines*. Clinical Toxicology, 1971, 4, 185-204.

MATTHEWS C., DAVIDSON J., BAUER E., MORRISON J.L., RICHARDSON A.P. *p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. II. Acute and chronic toxicity in dogs, rats and mice*. Journal of American Pharmaceutical Association Science Edition, 1956, 45, 260-267.

McROBBIE D.I., PARKER M.S. *Some aspects of the antifungal activity of esters of p-hydroxybenzoic acid*. International Biodeterioration Bulletin, 1974, 10, 109-112.

MOWAD C.M. *Allergic contact dermatitis caused by parabens: 2 case reports and a review*. American Journal of Contact Dermatitis, 2000, 11, 53-56.

NAKAMORI R., TANAKA F., NOJIRI T., YOSHINO H., OKUMURA M. *Phenol formation from alkyl paraben by bacteria*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1975, 64, 1071-1073.

NEIDIG C.P., BURRELL H. *The esters of p-hydroxybenzoic acids as preservatives*. Drug and Cosmetic Industry, 1944, 54, 481-489.

NGUYEN T., CLARE B., GUO W., MARTINAC B. *The effects of parabens on the mechanosensitive channels of E. coli*. European Biophysics Journal, 2005, 34, 389-395.

O'NEILL J.J., MEAD C.A. *The parabens: bacterial adaptation and preservative capacity*. Journal of the Society of the Cosmetic Chemists, 1982, 33, 75-84.

OISHI S. *Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats*. Toxicology and Industrial Health, 2001, 17, 31-39.

OISHI S. *Effects of propylparaben on the male reproductive system*. Food and Chemical Toxicology, 2002a, 40, 1807-1813.

OISHI S. *Effects of butylparaben on the male reproductive system in mice*. Archives of Toxicology, 2002b, 76, 423-429.

OKUBO T., YOKOYAMA Y., KANO K., KANO I. *ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERα and PR*. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39, 1225-1232.

ORGANISATION FOR ECONOMIC AND CO-OPERATION DEVELOPMENT. *4-hydroxybenzoid acid CAS n°: 99-96-7. Screening Information Data Set Initial Assessment report for 9th SIAM*. UNEP Publications, 1999, 176-218.

PEDERSEN K.L., PEDERSEN S.N., CHRISTIANSEN L.B., KORSGAARD B., BJERREGAARD P. *The preservatives ethyl-, propyl-, and butylparaben are oestrogenic in a in vivo fish assay*. Pharmacology & Toxicology, 2000, 86, 110-113.

PENG X., ADACHI K., CHEN C., KASAI H., KANO H., SHIZURI Y., MISAWA N. *Discovery of a Marine Bacterium Producing 4-Hydroxybenzoate and Its Alkyl Esters, Parabens*. Applied and Environmental Microbiology 2006, 8, 5556-5561.

PRUSAKIEWICZ J.J., ACKERMANN C., VOORMAN R. *Comparison of skin esterase activities from different species*. Pharmaceutical Research, 2006, 23, 1517-1524.

PRUSAKIEWICZ J.J., HARVILLE H. M., ZHANG Y., ACKERMANN C., VOORMAN R.L. *Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity : Possible link to paraben estrogenic effects*. Toxicology, 2007, 232, 248-256.

RASTOGI S.C., SCHOUTEN A., DE KRUIJF N., WEIJLAND J.W. *Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products*. Contact Dermatitis, 1995, 32, 28-30.

REISCH M.S. *Keeping well-preserved : cosmetics preservatives makers offer alternatives as widely used parabens come under scrutiny*. Chemical & Engineering News, 2005, 25-26.

ROBACH M.C., PIERSON M.D. *Influence of p-hydroxy benzoic acid esters on the growth and toxin production of Clostridium botulinum*. Journal of Food Science, 1978, 43, 787-789.

ROSEN W.E., BERKE P.A. *Modern concepts of cosmetic preservation*. Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1973, 24, 663-675.

ROUSSELLE C. *Evaluation des risques liés à l'utilisation des parabens dans les produits cosmétiques*. Vigilance - Lettre de l'AFSSAPS, 2005, 30, 3.

ROUTLEDGE E.J., SUMPTER J.P. *Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1996, 15, 241-248.

ROUTLEDGE E.J., PARKER J., ODUM J., ASHBY J., SUMPTER J.P. *Some alkyl hydroxyl benzoate preservatives (parabens) are estrogenic*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1998, 153, 12-19.

RUSSELL A.D., FURR J.R., PUGH W.J. *Susceptibility of porin and lipopolysaccharide-deficient mutants of Escherichia coli to a homologous series of esters of p-hydroxybenzoic acid*. International Journal of Pharmaceutics, 1985, 27, 163-173.

RUSSELL A.D., FURR J.R. *The effects of antiseptics, disinfectants and preservatives on smooth, rough and deep rough strains of Salmonella typhimurium*. International Journal of Pharmaceutics, 1986, 34, 115-123.

SABALITSCHKA T. *Application of ethyl p-hydroxybenzoate in maintenance of sterility, in sterilization and in disinfection*. Archives of Pharmacology, 1930, 268, 653-673.

SCALZO M., ORLANDI C., SIMONETTI N., CERRETO F. *Study of interaction effects of polyacrylic acid polymers (Carbopol 940) on antimicrobial activity of methyl parahydroxybenzoate against some gram negative, gram-positive bacteria and yeast*. Journal of Pharmaceutics and Pharmacology, 1996, 48, 1201-1207.

SCHUEBEL K., MANGER J. *Contribution to the pharmacology of parahydroxybenzoic esters: the fate in the organism and toxicity*. Archives of Experimental Pathology and Pharmacology, 1929, 146, 208-222.

SEKO N., BANDO H., LIM C.W., YAMASHITA F., HASHIDA M. *Theoretical analysis of the effect of cutaneous metabolism on skin permeation of parabens based on a two-layer skin diffusion/metabolism model*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1999, 22, 281-287.

SONI M.G., BURDOCK G.A., TAYLOR S.L., GREENBERG N.A. *Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature*. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39, 513-532.

SONI M.G., TAYLOR S.L., GREENBERG N.A., BURDOCK G.A. *Evaluation of the health aspects of methyl paraben : a review of the published literature*. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40, 1335-1373.

SONI M.G., CARABIN I.G., BURDOCK G.A. *Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)*. Food and Chemical Toxicology , 2005, 43, 985-1015.

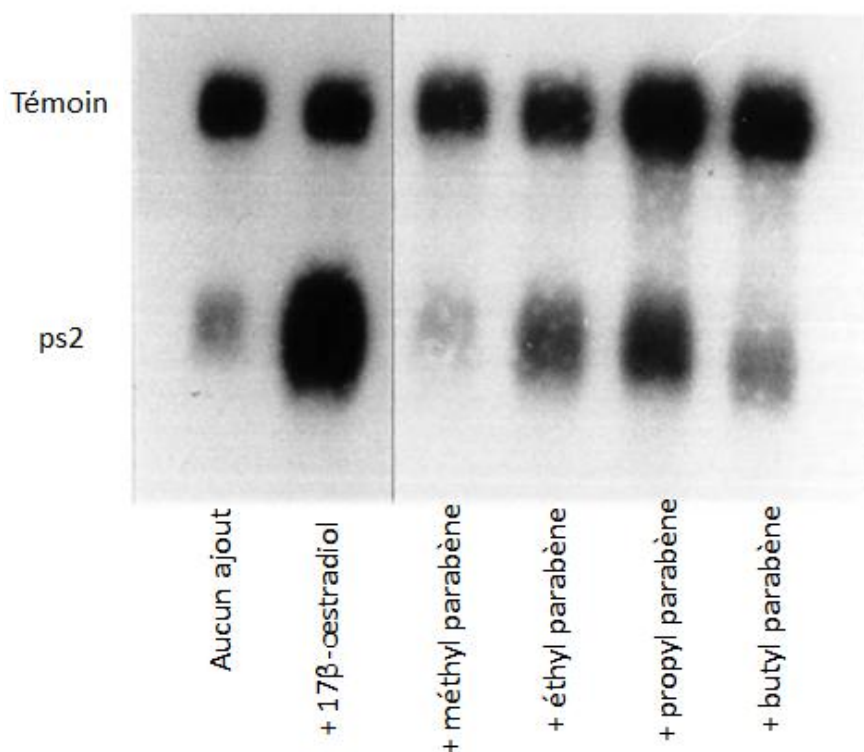
TASUKAMOTO H., TERADA S. *Metabolism of drugs. XLVII. Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbits*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1964, 12, 765-769.

23

TURAKKA L., OJANEN T., HENELL U., KARJALAINEN A. *Parabens as antimicrobial preservatives in creams*. Pharmazie, 1988, 43, 701-703.

YE X., BISHOP A.M., REIDY J.A., NEEDHAM L.L., CALAFAT A.M. *Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans*. Environmental Health Perspectives, 2006, 114, 1843-1846.

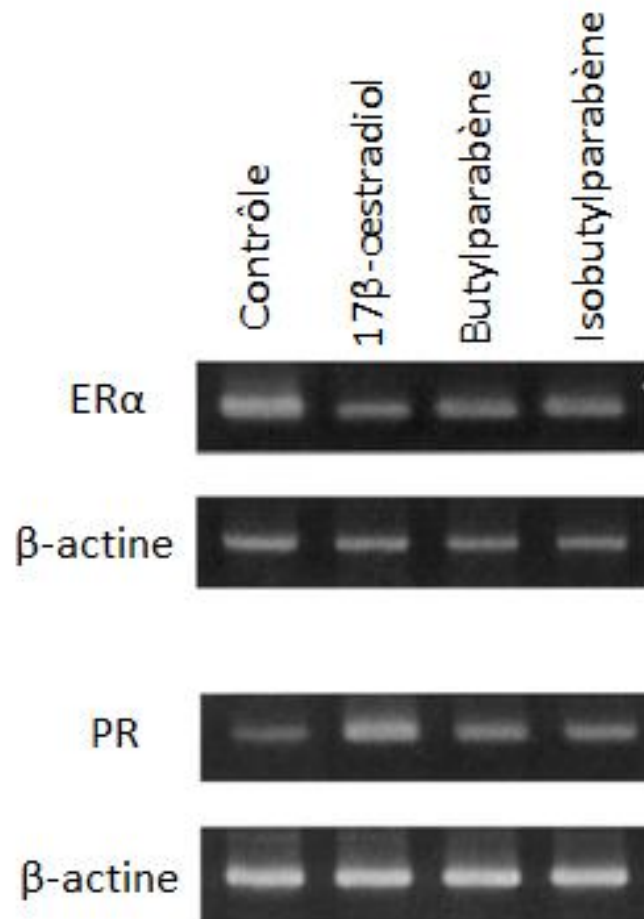
YE X., TAO L.J., NEEDHAM L.L., CALAFAT A.M. *Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum*. Talanta, 2008, 76, 865-871.



Annexe 1 : Régulation de l'expression des ARNm de ps2 par les parabènes dans les cellules cancéreuses MCF-7

(extrait de Byford *et al.*, 2002)

Ce Northern Blot a été réalisé après 4 jours en présence de parabènes ou non. La dose d'œstradiol rajoutée est de 10^{-8} M, celle d'éthyl et de méthyl parabène est de 10^{-4} M, alors que celle du propyl et du butyl est de 10^{-5} M. Le témoin correspond à l'expression du gène 36B4 non régulé par les œstrogènes.



Annexe 2 : Régulation de l'expression des gènes des récepteurs à œstrogènes ERα et à progestérones

(extrait de Okubo *et al.*, 2001)

La β-actine sert de référence à cette détection par RT-PCR. L'électrophorèse se fait sur un gel d'agarose à 2%. Les cellules composant le contrôle sont traitées avec 0,1% d'éthanol, les cellules du contrôle positif sont traitées avec 10^{-7} M d'œstradiol, les autres avec 10^{-4} M et 10^{-5} M de butyl et d'isobutylparabène respectivement pendant 24h.