



L'approche écotoxicologique des changements de formulation

Christophe Morin et Laure Garrigue-Antar - LEESU
Anthony Marconi - Tronico VigiCell

Démarche complexe :

- nombreuses molécules
- diversité de types d'eaux

➤ 3 grands types d'approches utilisées dans Cosmet'eau

Substances

- Individuelles
- Mélanges

Bioessais in vivo sur zebrafish



Échantillons synthétiques

- Eaux grises reconstituées
3 formulations
avec parabènes
sans parabènes
bio

Bioessais in vitro sur microorganismes et cellules eucaryotes

TRONICO VIGICELL
ALCEN

Échantillons réels

- Eaux usées
- Exutoires de bassins versants
- Emissaires
- STEU & fonctionnement STEU
- Déversoirs d'orage

Bioessais in vivo sur zebrafish



➤ Le modèle de poisson zèbre (*Danio rerio*)

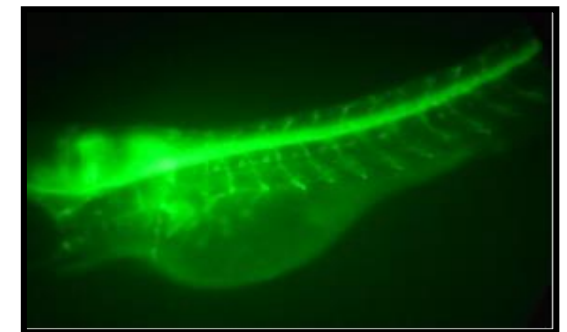
• Principaux intérêts

- Petite taille, descendance nombreuse, génération rapide, peu couteux
 - Génome : 50 à 80% d'homologie avec la plupart des gènes humains
- Modèle pour un grand nombre de pathologies humaines, dont le cancer, les maladies neurodégénératives
- Modèle intégratif « animal entier » de toxicité développementale, test de risque environnemental, pharmacologie...



☐ Embryon/Larve

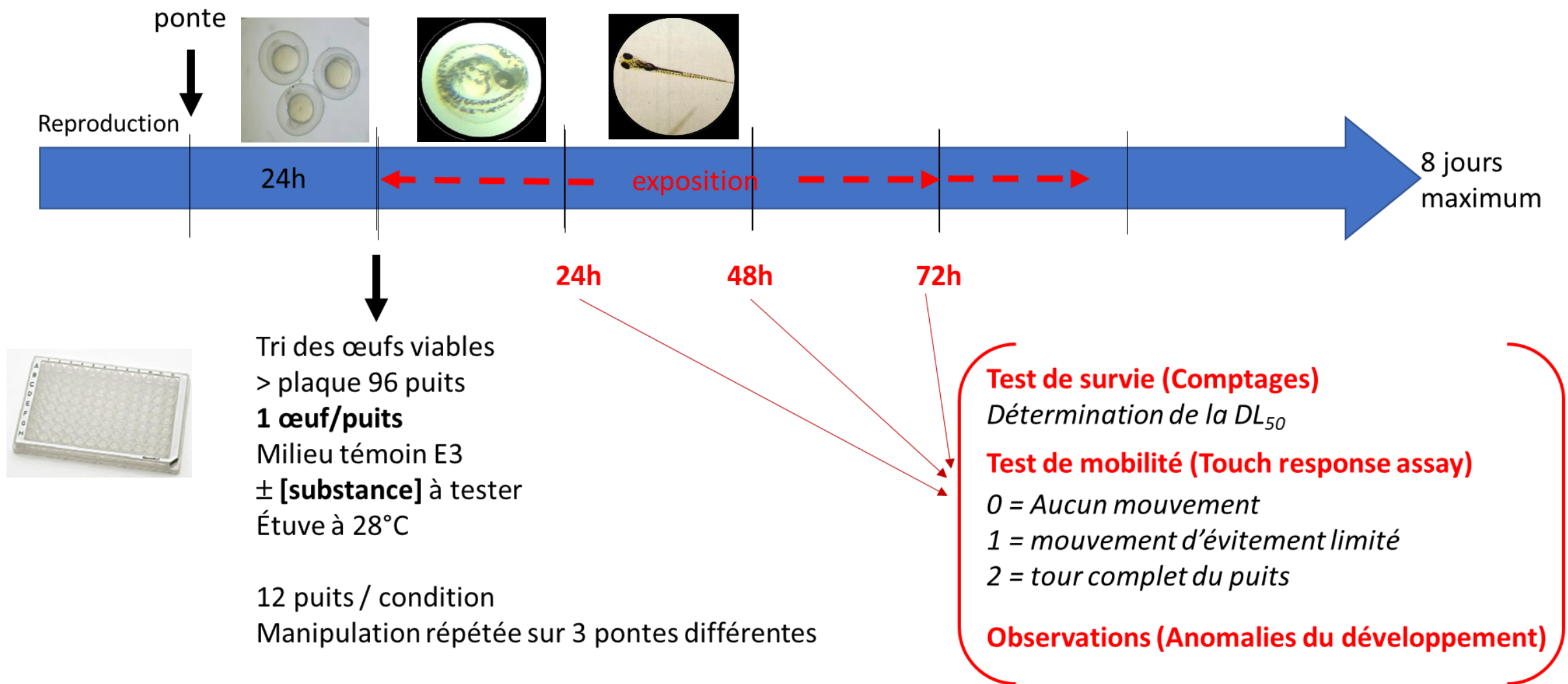
- Organisation simple
- Transparent
- Développement rapide
- Génétiquement modifiable



Morin, Biovaria 2015

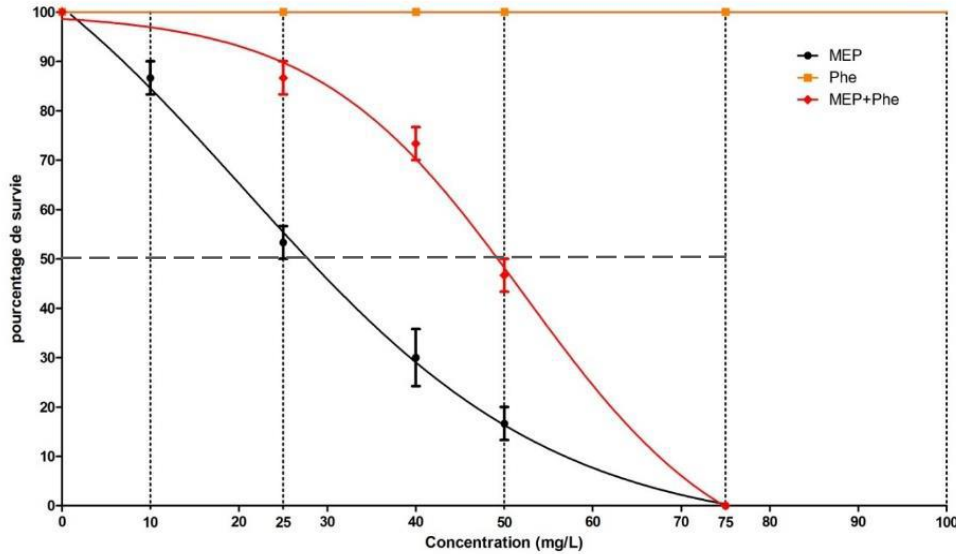
* Souche Hb9-GFP , motoneurones fluorescents

1- Approche toxicologique classique



1- Approche toxicologique classique : résultats

Effets du cocktail MEP-PE: dose-réponse entre 0 - 75mg/L (MEP) +2[MEP] (PE)



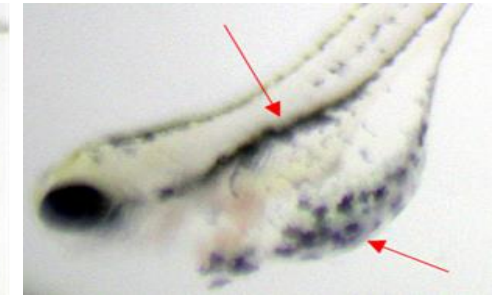
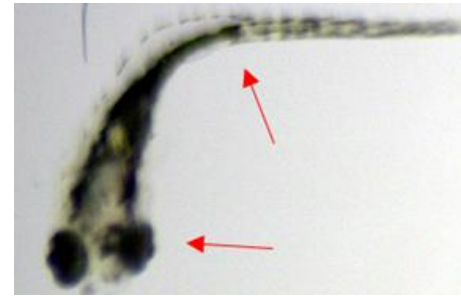
6 j : PE : sans effet

DL₅₀ MEP = 28 mg/L

DL₅₀ MEP/PE = 49,6 mg/L

La présence de PE modifie l'écotoxicité du MEP :

- Le taux de survie augmente
- Apparitions d'anomalies importantes non observées pour MEP seul



Anomalies :

- 1 - Malformation de la tête
- 3 - Oedèmes

- 2 - Queue courbée
- 4 - Vessie natatoire dégonflée

mg/L

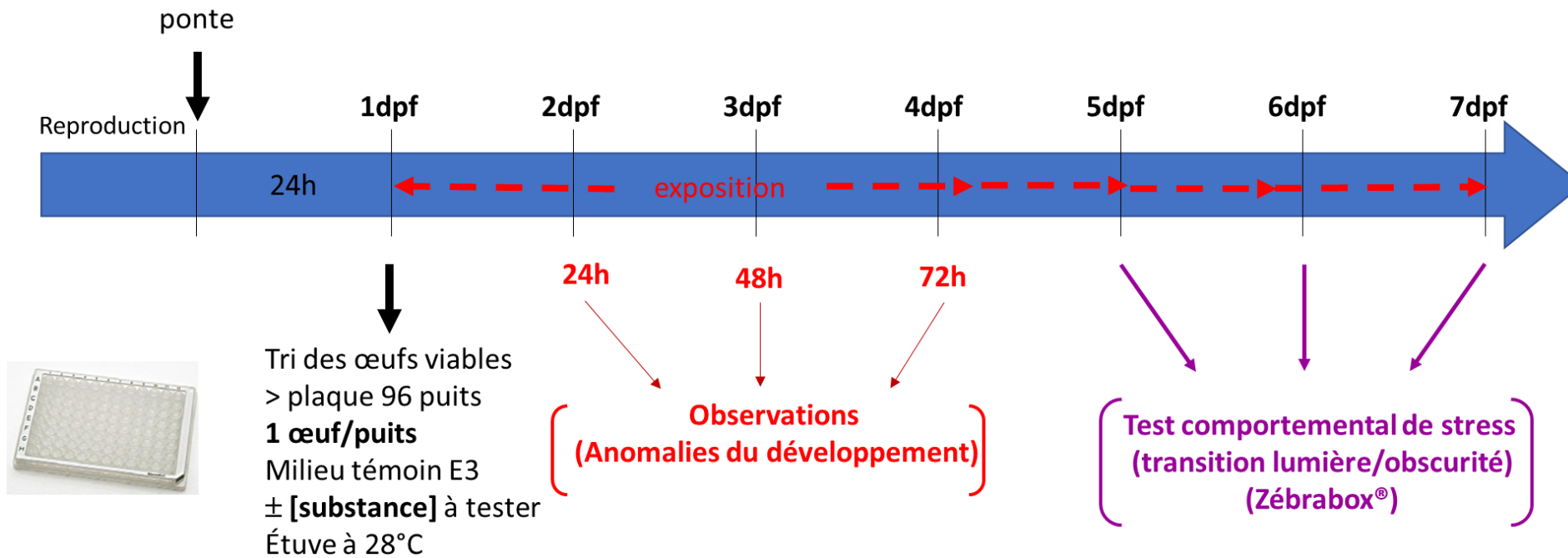
Molécules évaluées à de fortes concentrations

LD ₅₀	MeP	MIT	CPN	PE	MeP + PE
48h	75,8 mg/L	40,9 mg/L	167 mg/L	-	-
72h	40,9 mg/L	33,5 mg/L	153,9 mg/L	-	-

2- Approche environnementale

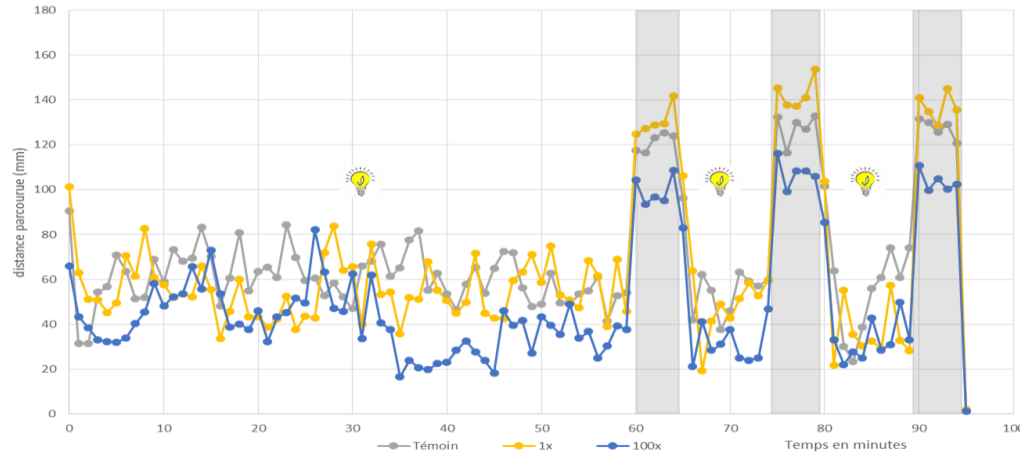
Molécules évaluées à des concentrations environnementales et en cocktails

Composé	C (µg/l)	lieu	Référence
MeP	0,7	rivières	LOUS Review, (2013)
MIT	0,05	Allemagne: Rhin, Danube et autres rivières	Rafoth et al, (2007)
CPN	0,16	Japan: rivières recevant les eaux traitées	Kamura et al, (2014)
PE	14	Japan: rivières recevant les eaux traitées	Kamura et al, (2014)

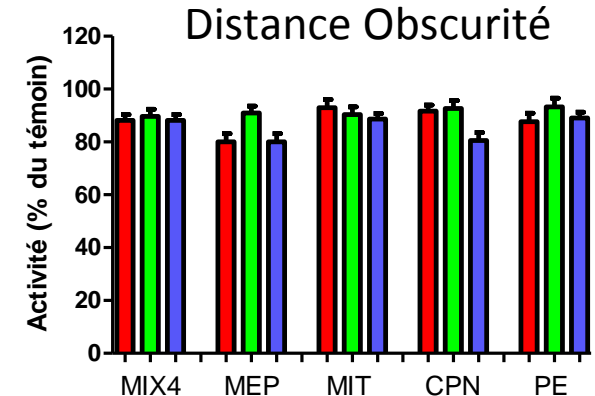
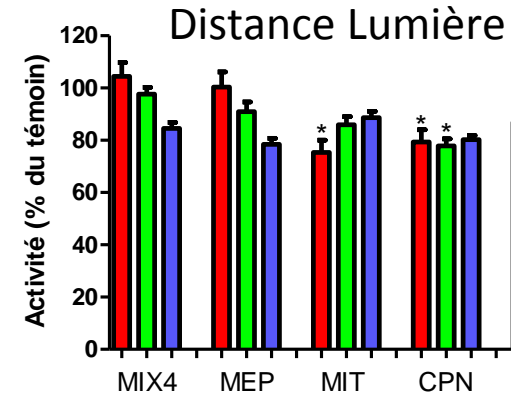


12 puits / condition
 Manipulation répétée sur 3 pontes différentes

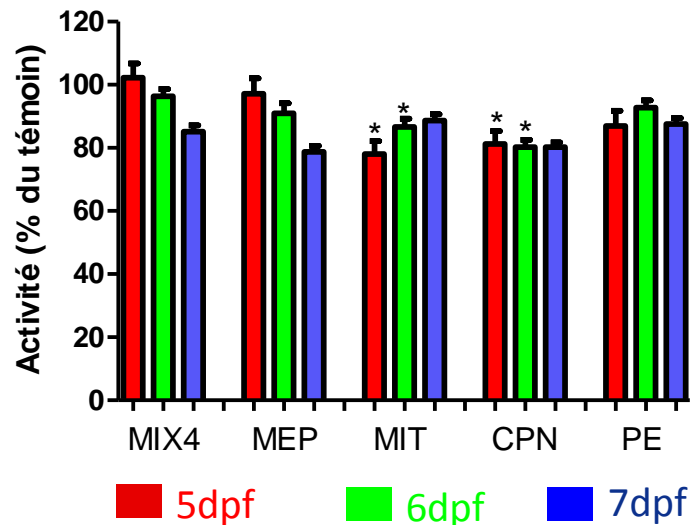
2- Approche environnementale



Molécules évaluées à des concentrations environnementales et en cocktails



Distance totale Lumière + Obscurité



- Comportement différent selon la phase (lumière/obscurité)
- Pas de synergie ou additivité systématique de l'effet des polluants

➤ Bilan sur le modèle de larves de poisson zèbre

Mise en œuvre d'une procédure suffisamment sensible permettant:

1- d'évaluer les effets *d'un polluant particulier* à des concentrations environnementales

2- d'évaluer les effets *de cocktails de polluants* à des concentrations environnementales

➤ Bilan sur l'étude d'impact de polluants émergents

3- L'évaluation de l'effet d'un nouveau substituant (des parabènes), doit être effectuée dans un *contexte complexe, en présence d'autres molécules présentes dans l'environnement* (effet cocktail)

➤ Perspectives opérationnelles

Approche pertinente pour *l'évaluation* et *le suivi de la qualité de l'eau*

Les bioessais *in vitro*

Application à des prélèvements réels et
eaux grises de synthèse



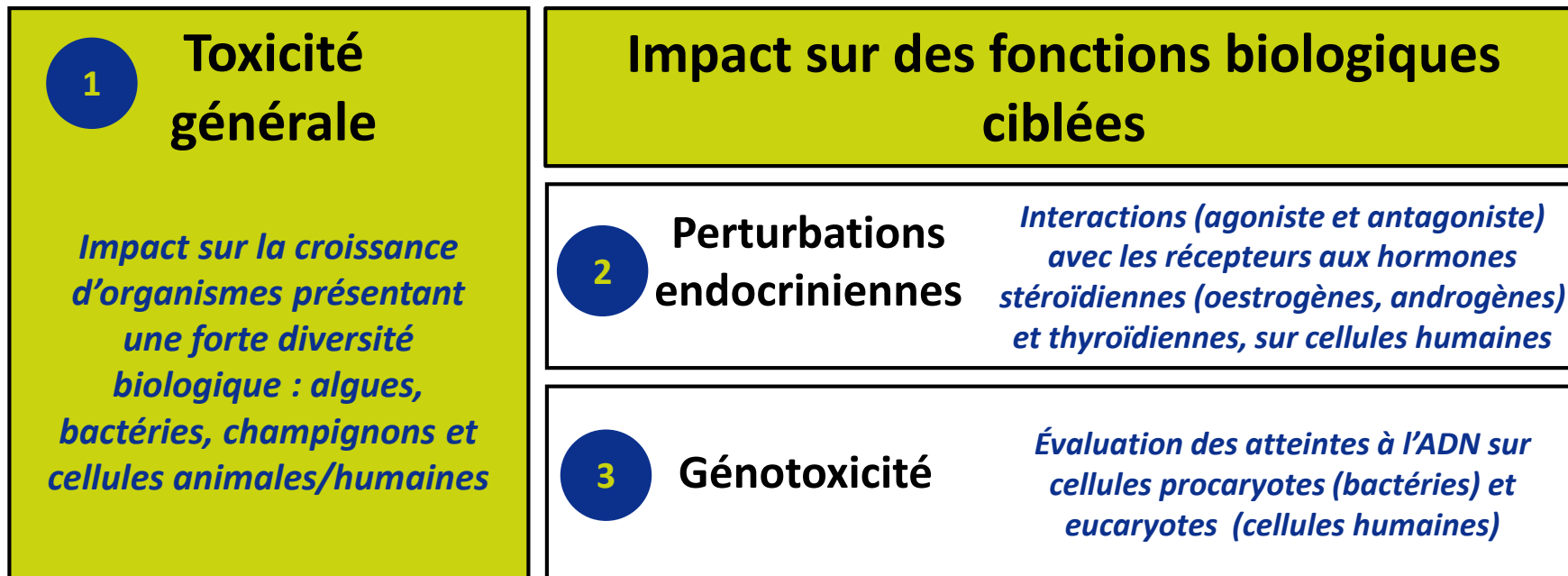
La toxicité



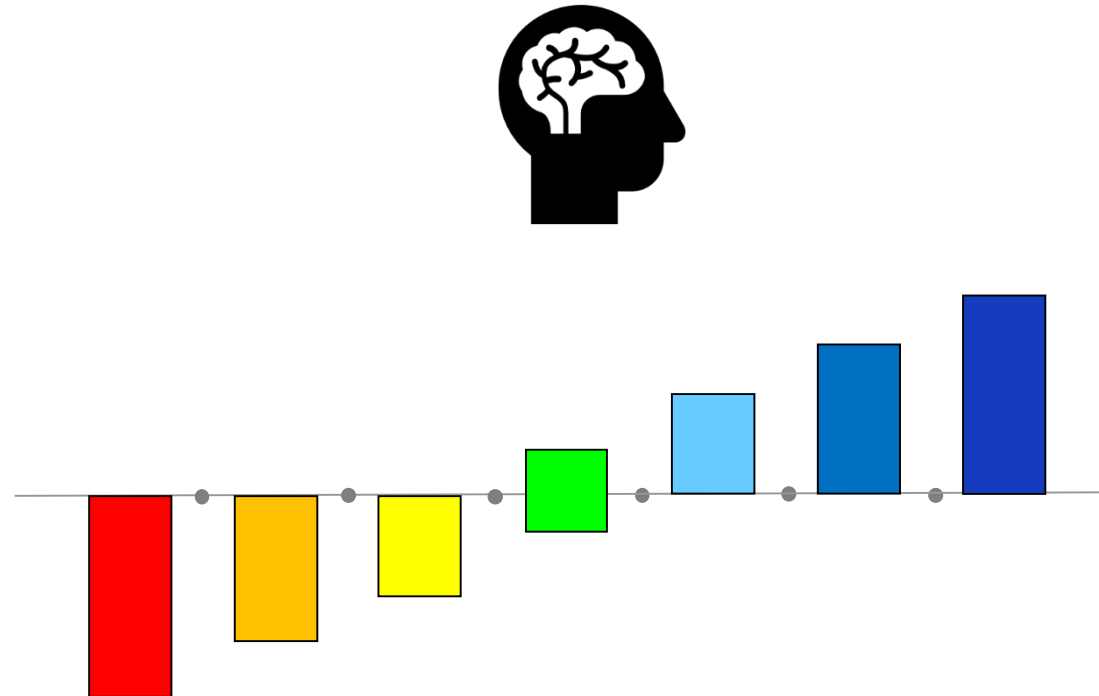
LES toxicités



- 3 panels de tests couvrant une multiplicité d'organismes et d'effets
- 17 bioessais en parallèle
 - *Bactéries, algues, champignons, levures, cellules humaines*
 - *Incluant variants résistants ou sensibles*



- Prise en compte de la complexité de la réponse biologique et synthèse en code couleur



- Eaux grises de Σ : 18



6 Gels douche
6 Shampoings
6 Dentifrices



2 PB, 2-PB, 2 bio

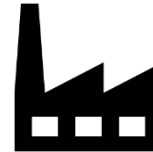
- Eaux « réelles » : 55



Exutoires BV: 3 campagnes -> 7 pts.
3 sites



Emissaires EM : 4 campagnes -> 11 pts.
3 sites



STEU (EB & rejets) : 4 campagnes -> 17 pts.
5 sites



Déversoirs orage DO : 2 campagnes -> 5 pts.
3 sites



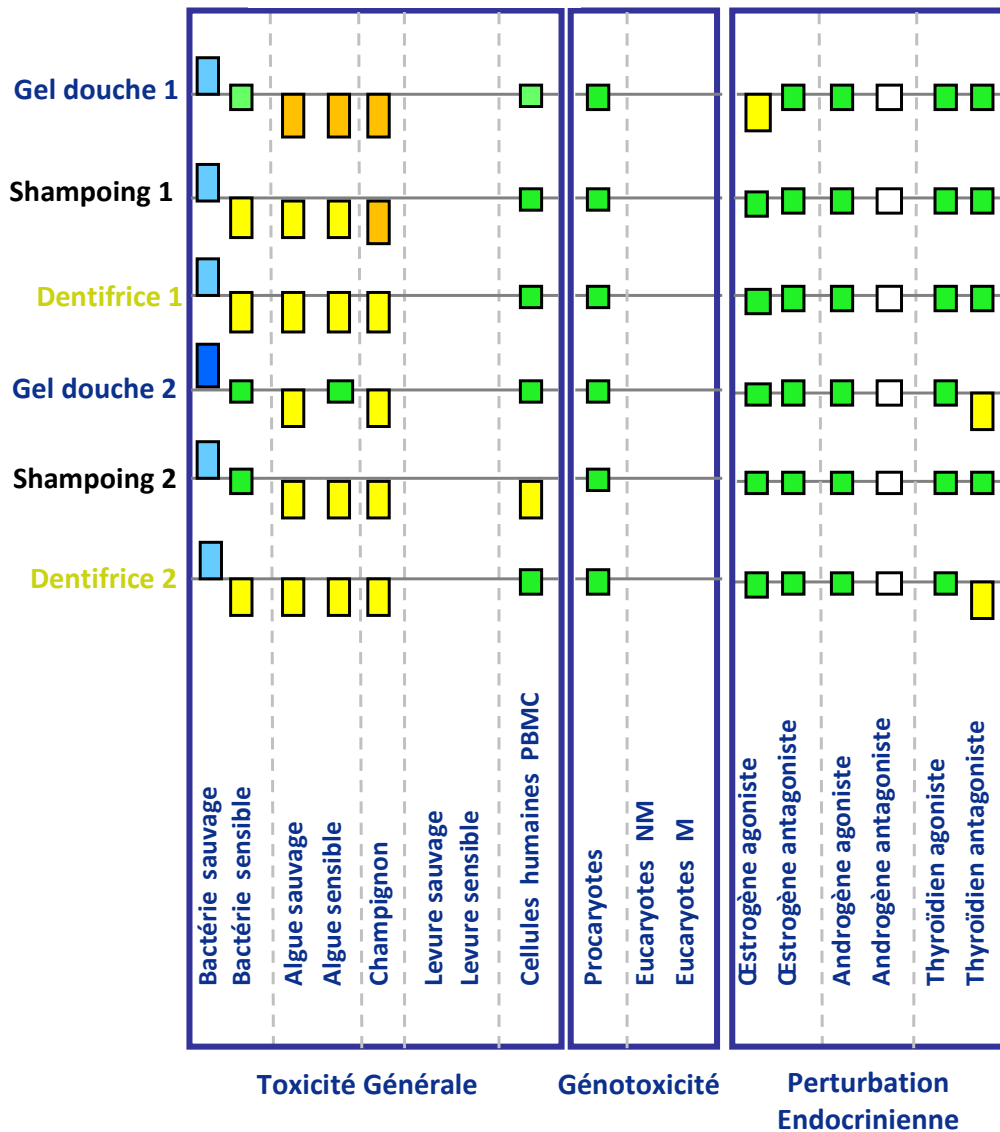
Milieu (Seine) MN : 5 campagnes -> 15 pts
3 sites

Résultats eaux grises de synthèse

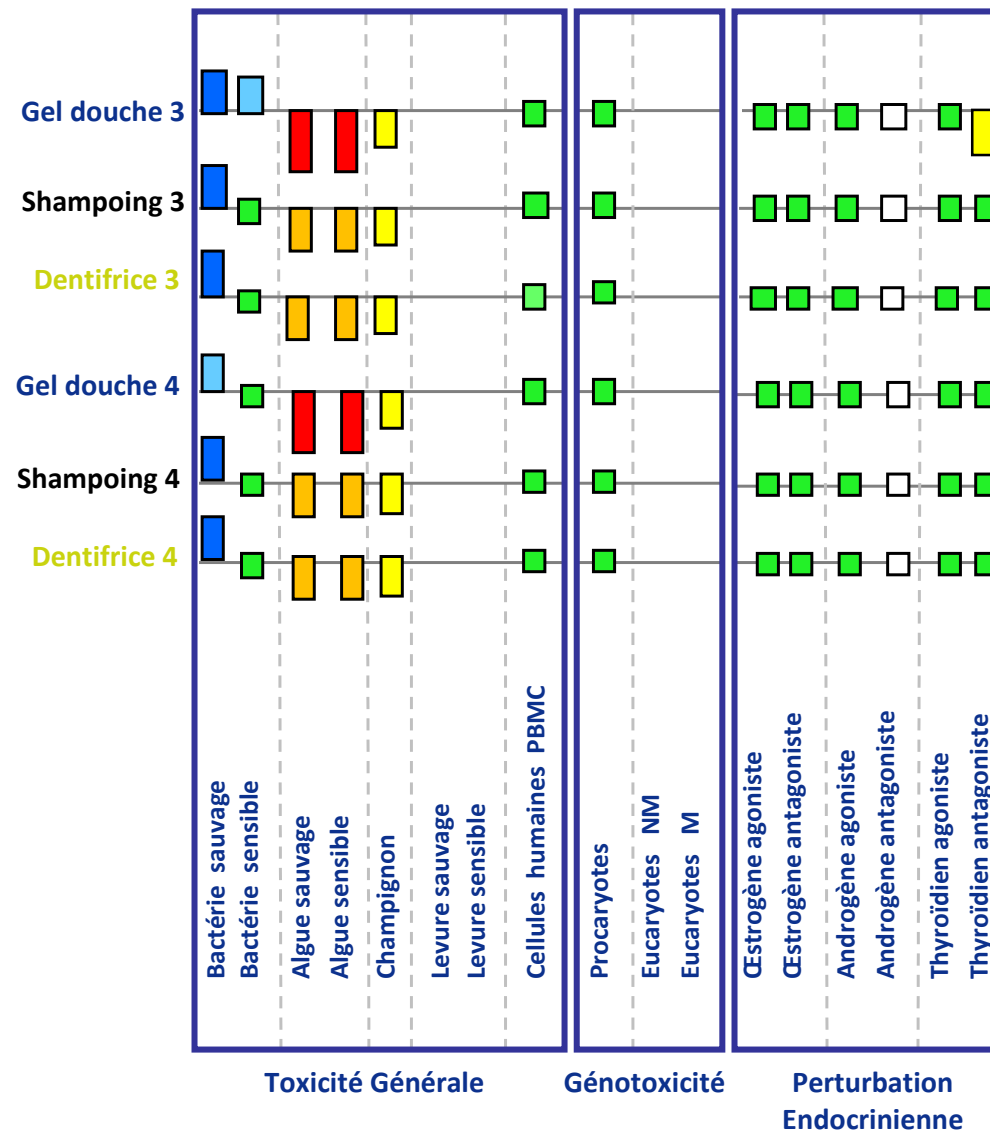
Observations et considérations diverses



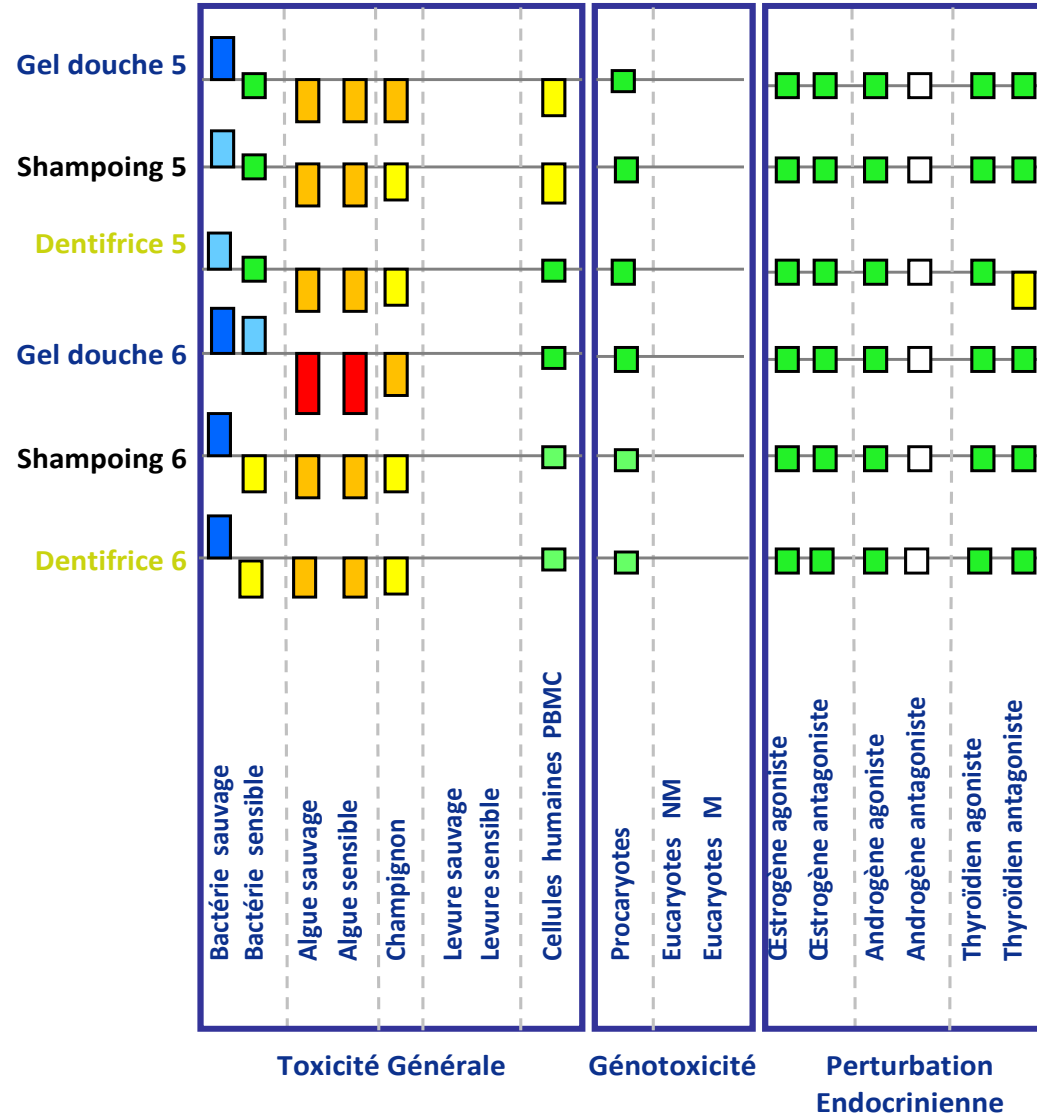
Formulations Avec Parabènes



Formulations Sans Parabènes

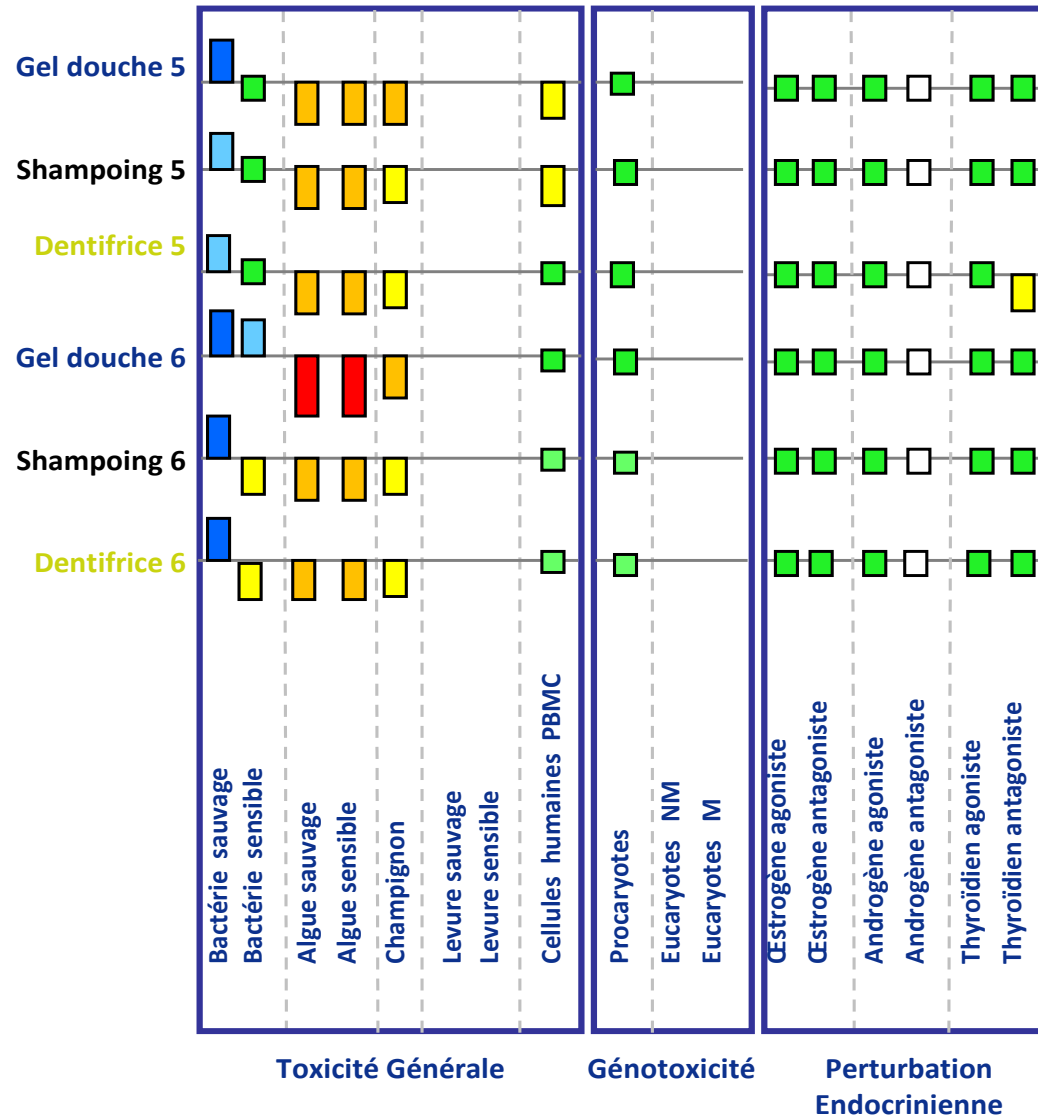


Formulations Bio



- Toxicité dépendante des organismes et formulations
 - Toxicité moins marquée au niveau des bactéries (prolifération)
 - Toxicité algue plus légère sur quasi toutes les préparations avec parabène, plus marquée sur l'ensemble des résultats sans parabènes ou bio!
 - 3 points chauds toxicité algues (score rouge), systématiquement sur gels douches (1 gel bio, les 2 restant sur gels sans parabènes) -> COD
 - Toxicité cellules humaines sur 2 shampoings (un sans parabène, 1 bio) et 1 gel douche bio...

Formulations Bio



Gel douche #6 : 5 conservateurs, dont le premier en 8^e pos./ingrédients

Gel douche #5 : uniquement deux dont le premier en 14^e pos.!

- Activité œstrogène-like:
 - *1 gel douche (avec parabène)*
- Activités thyroïdien-like (antago):
 - *2 gels douche et dentifrices (+/- paraben, bio) mais pas shampoings*
- Pas d'androgènes-like ni de génotoxicité détectés



- Substitution...par quoi?



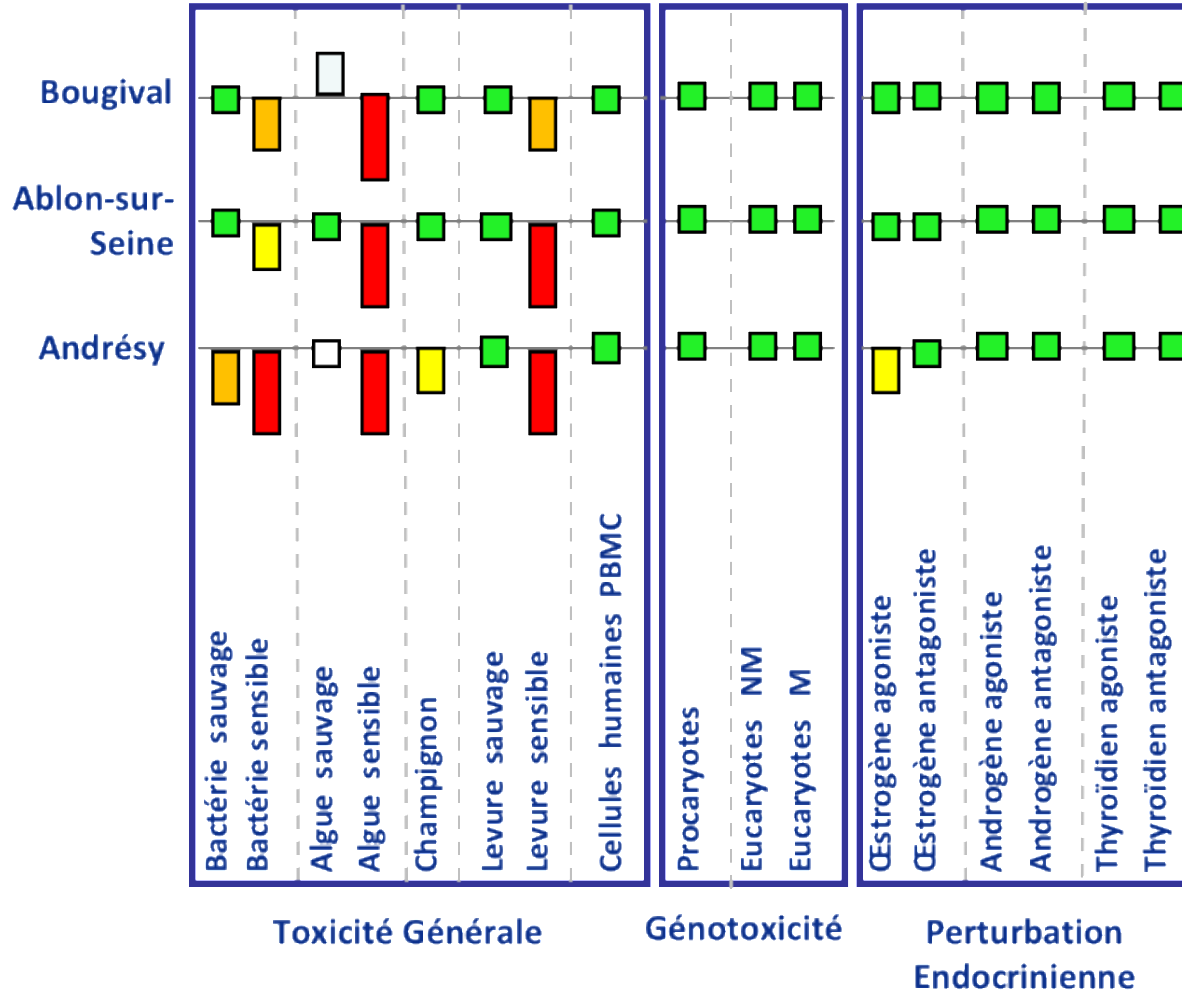
- Bio = mieux?




Résultats eaux « réelles »

Aperçu cycle de l'eau



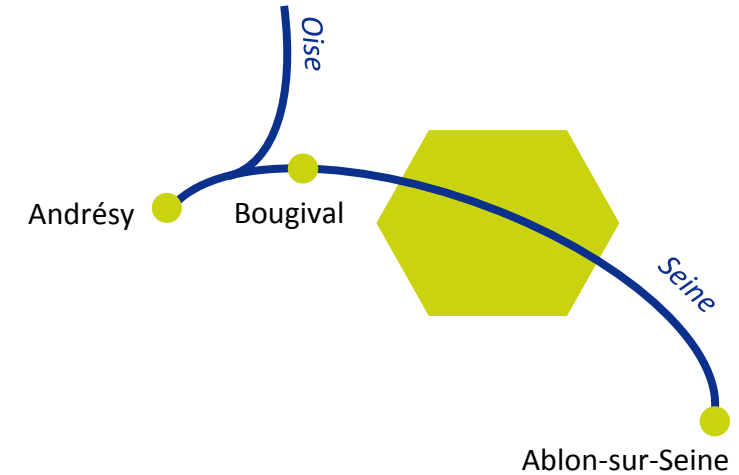


55 points expérimentaux
« eaux réelles » -> Synthèse

- Toxicité variable suivant les organismes, les mois, la météorologie -> multifactorielle
 - *Milieus naturels et effluents STEU moins marqués que EB, EM, BV, DO* 
 - *Toxicité fréquente au niveau des bactéries*
 - *Toxicité algues / levures contextuelle : prolifération algues dans DO et effluents STEP, selon la période dans EM et EB par ex.*
 - *Aucune réponse des cellules humaines (test positif dans contextes / échantillons bien particuliers)*



- Détection systématique d'oestrogènes-like :
 - *EM, EB et rejets de STEU (moins certains mois)*
 - *DO et BV*
 - *Milieu (pas toujours, mais toujours à Andresy)*
- Détection plus sporadique d'androgènes- et thyroïdiens-like :
 - *1 androgène-like EM, EB (juillet 2015), 1 BV, 1 DO*
 - *1 thyroïdien-like EB (oct. & fev., EM tox), 1 BV, 1 DO (idem andro.)*



- Situation classique en regard des connaissances et retour d'expérience historique sur 8 dernières années
 - *Travaux SIAAP, SEDIF, AESN, AEAG*
 - *Projets Lumieau, Roulépur*



- Effets génotoxiques ponctuels
 - *Genotoxicité cellules humaines sur BV (hôpital), EB (x3), DO (Alma)*
 - *Genotoxicité Bactéries BV (-hôpital, x3), effluent STEU*
- Tests généralement positifs dans des tissus urbains / industriels particuliers ou en cas de situations fortement dégradées (météo, accident etc.)
 - *Situation assez normale / non préoccupante, cohérent ici*



Conclusion

Apports des bioessais



« Il n'est plus possible de fixer des objectifs et limites de qualité sous le seul angle de la nature chimique des contaminants. La validation d'un panel d'essais biologiques doit compléter le dispositif décisionnaire... »

Prof. Yves LEVI

- Une approche complémentaire et pertinente
- La météo juste avec le thermomètre?



- Beaucoup plus réglementaires qu'on ne le pense...
 - *DCE appelle à une approche intégrée du suivie des eaux*
 - *CIS posent l'importance des bioessais (19 et 3 + 7, 25, 27)*
 - *Evolutions 2019 DCE*



Merci de votre attention!

Laure Garrigue-Antar– LEESU

Christophe Morin – LEESU

Anthony Marconi – Tronico VigiCell