



HAL
open science

La biodiversité végétale au service des ingrédients naturels : étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes d'extraits végétaux et développement d'un conservateur naturel pour l'industrie cosmétique

Florence Merck

► To cite this version:

Florence Merck. La biodiversité végétale au service des ingrédients naturels : étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes d'extraits végétaux et développement d'un conservateur naturel pour l'industrie cosmétique. Autre. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4118 . tel-01708778

HAL Id: tel-01708778

<https://theses.hal.science/tel-01708778>

Submitted on 14 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUÉES
INSTITUT DE CHIMIE DE NICE UMR 7272 CNRS

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du
grade de Docteur en Chimie
de
L'UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR

par

Florence MERCK

**La biodiversité végétale au service des ingrédients naturels :
Étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes
d'extraits végétaux et développement d'un
conservateur naturel pour l'industrie cosmétique**

Dirigée par Xavier Fernandez

Soutenue le **14 décembre 2017** devant le jury composé de :

Gérald CULIOLI	Maître de Conférences HDR Université de Toulon	<i>Rapporteur</i>
Alain MUSELLI	Professeur Université de Corse	<i>Rapporteur</i>
Anne LANDREAU	Maître de Conférences HDR Université d'Angers	<i>Examineur</i>
Xavier FERNANDEZ	Professeur Université Côte d'Azur	<i>Directeur de thèse</i>

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Tout d'abord, j'exprime ma profonde reconnaissance aux membres du jury qui me font l'honneur de juger cette thèse en tant que rapporteurs, le Dr. Gérard Culioli et le Pr. Alain Muselli, et au Dr. Anne Landreau qui participe au jury en tant qu'examineur.

Ensuite, je tiens à remercier tout particulièrement le Pr. Xavier Fernandez de m'avoir confié ce sujet aussi vaste que passionnant et d'en avoir assuré la direction scientifique. Merci pour ta confiance, tes conseils et tes encouragements qui m'ont été d'une aide précieuse tout au long de ce travail.

Merci au Dr. Elisabet Duñach de m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse à l'Institut de Chimie de Nice.

Je remercie le FEDER et la Région PACA d'avoir permis le financement de cette thèse, ainsi que le Pôle PASS pour la labellisation du projet NATUBAVAL.

J'exprime mes sincères remerciements aux autres membres de l'équipe « NATUBAVAL », sans qui ce travail n'aurait pu aboutir : Yohan Rolland (Naturex), Claude Monin (Acphytaroma), Jean-Paul Ghérardi (Biophyto), Alexandre Dingas (SOFIA Cosmétiques), Francis Hadji-Minaglou (Zea Mais Consultancy) ainsi qu'à Audrey Kerdudo qui a travaillé sur la partie cosmétique de ce projet.

Merci également à Jean-Louis Polidori et François Boillot (Biophyto) pour l'identification botanique des matières premières végétales.

Je n'oublie pas Laurent Lapeyre (Nixe) qui a réalisé les nombreux tests d'activité antimicrobienne tout au long du projet et Jean-Philippe Kucma (Newonat) pour les essais de distillation moléculaire.

Je tiens également à remercier le Pr. Farid Chémat (UMR 408 INRA-UAPV) ainsi que toute l'équipe GREEN pour leur accueil durant mon séjour en Avignon. Merci en particulier au Dr. Anne-Sylvie Fabiano-Tixer pour cette précieuse collaboration et son aide dans la réalisation des tests d'activité antioxydante.

De manière plus personnelle, j'aimerais souligner à quel point cette thèse aura été riche en enseignements, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain.

Un merci tout particulier à Lise et Rémi qui m'ont pris sous leur aile dès mon arrivée à l'ICN, et à Momo et JJ pour les précieux conseils qu'ils ont su me prodiguer. Le temps passé au laboratoire m'aura permis de tisser de véritables liens, j'aimerais remercier Céline, Marie, Irene et Raff pour leur amitié et leur présence.

Ma rencontre la plus marquante durant mon cursus universitaire aura sans aucun doute été celle du Pr. Annelise Lobstein, que j'aimerais remercier pour ses enseignements emplis de sagesse. Merci de m'avoir encouragée à me lancer dans l'aventure d'une thèse.

Je tiens également à remercier Olivier Vernet, avec qui j'ai eu le privilège de travailler l'orgue au CNRR durant mes années passées à Nice. Les moments d'évasion musicale et votre soutien en toutes circonstances m'ont été d'une grande aide.

Les temps difficiles révèlent les véritables amis. J'ai pu compter sur le soutien inconditionnel de ma « Nanours », Anne-Sophie. Malgré les kilomètres qui nous séparent, tu as toujours cru en moi et j'espère pouvoir te rendre un jour la pareille.

Jérôme, Marine, Amélie, L'Haja, Malvina et Rémy, merci de vous être montrés patients et compréhensifs et d'avoir toujours été là pour me soutenir.

Merci à mes fournisseurs officiels de chocolat Nadja « je-ne-le-sais-pas », Mumu mon experte Word, Sandrine « Mme Schmitt » et Dominik pour votre humour et votre incroyable générosité de cœur et d'esprit. Je pense également à Alice, Pauline, Mimi et Volker qui ont toujours su trouver les mots justes dans les moments de doute. Un grand merci aussi à Christel, Loli, Hervé, Laëti, Caro, Pauline, Audrey et Val pour leur amitié et les bons moments partagés sur ou en-dehors des courts du TCK.

J'aimerais adresser mon plus grand « MERCI » à ma Maman. Ton amour, ta bienveillance, ton soutien et ta patience jour après jour m'ont aidé à croire en moi et à tenir bon jusqu'au bout de cette aventure.

Pour finir, j'aimerais dédier ce travail à mon Papa, parti beaucoup trop tôt. C'est grâce à tout ce qu'il m'a appris et parce qu'il a toujours su me guider dans mes choix que j'ai trouvé la force et le courage de ne jamais abandonner.

« Le bonheur n'est pas au sommet de la montagne
mais dans la façon de la gravir. »
Confucius

À mon Papa

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	13
GLOSSAIRE.....	15
INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
CHAPITRE I	19
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE : DE L'INDUSTRIE COSMÉTIQUE À LA BIODIVERSITÉ VÉGÉTALE –INTRODUCTION AU PROJET « NATUBAVAL »	19
1. La conservation des produits cosmétiques	21
1.1. Introduction à la réglementation cosmétique européenne.....	21
1.2. Les conservateurs antimicrobiens	24
1.2.1. La contamination des produits cosmétiques par les micro-organismes	24
1.2.2. Rôle et mode d'action des conservateurs antimicrobiens	27
1.2.3. Les conservateurs autorisés.....	28
1.3. Les conservateurs antioxydants	33
1.3.1. L'oxydation en cosmétique : introduction et définitions.....	33
1.3.2. Rôle, mode d'action et exemples d'antioxydants.....	37
1.3.3. Les controverses liées aux antioxydants de synthèse	41
1.4. Les alternatives naturelles aux conservateurs synthétiques.....	42
1.4.1. Les huiles essentielles	42
1.4.2. Les extraits naturels obtenus à l'aide de solvants.....	43
1.4.3. Les huiles végétales.....	44
1.4.4. Intérêt des alternatives issues du monde végétal.....	44
1.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de produits naturels et de la conservation des produits cosmétiques.....	48
1.5.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne	48
1.5.2. Évaluation de l'activité antioxydante de produits naturels.....	50
1.6. Évaluation de l'efficacité d'un système de conservation cosmétique ..	52
1.7. Quelles autres solutions pour la conservation des cosmétiques ?	53
1.8. La cosmétique « bio »	54

2.	La biodiversité végétale : quels enjeux pour la préserver et quel intérêt dans l'industrie cosmétique ?	56
2.1.	Introduction à la biodiversité	56
2.2.	Les « hotspots » de biodiversité : origine et évolution.....	57
2.3.	Le Bassin méditerranéen : un « hotspot » aux ressources exceptionnelles	58
3.	Le projet « NATUBAVAL »	60
3.1.	La genèse du projet	60
3.2.	Les objectifs, acteurs et partenaires du projet	60
3.3.	Les objectifs des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse	63
CHAPITRE II		65
RECHERCHE DE NOUVEAUX EXTRAITS NATURELS AUX PROPRIÉTÉS CONSERVATRICES		65
1.	Présélection des espèces végétales d'intérêt	67
2.	Extraction des matières premières végétales.....	68
3.	Empreinte chromatographique des extraits bruts.....	70
3.1.	Analyse des extraits bruts par HPLC-ELSD-DAD	70
3.2.	Analyses des extraits bruts par HPTLC	72
3.2.1.	Analyse des composés phénoliques	73
3.2.2.	Analyse des terpénoïdes.....	75
4.	Évaluation biologique des extraits bruts.....	77
4.1.	Activité antimicrobienne	77
4.1.1.	Évaluation de l'activité antimicrobienne par spectrophotométrie.....	78
4.1.2.	Évaluation de l'activité antimicrobienne d'une sélection d'extraits bruts contre <i>A. brasiliensis</i> par HPTLC-EDA.....	83
4.2.	Activité antioxydante	85
4.2.1.	Détermination de la teneur en phénols totaux : indice de Folin-Ciocalteu	86
4.2.2.	Détermination de la capacité antioxydante : test DPPH.....	86
4.2.3.	Évaluation de l'activité antioxydante d'une sélection d'extraits bruts par HPTLC-EDA	88
5.	Sélection des extraits d'intérêt	90

CHAPITRE III.....	93
ÉTUDE ET OPTIMISATION DE L'EXTRAIT DE <i>S. CHAMAECYPARISSUS</i> : DÉVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU CONSERVATEUR NATUREL	93
1. Présentation de <i>S. chamaecyparissus</i>	95
1.1. Origine et description botanique	95
1.2. Utilisations traditionnelles	97
1.3. Phytochimie de l'huile essentielle de santoline.....	97
2. Fractionnement bioguidé de l'extrait de santoline	98
2.1. Fractionnement de l'extrait brut	98
2.2. Étude de l'activité antimicrobienne des fractions obtenues	100
3. Étude de la fraction active F2	103
3.1. Isolement du composé majoritaire.....	103
3.2. Caractérisation structurale du composé majoritaire de F2	104
3.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne du spirokétal énoI (SKE)...	107
3.3.1. Activité antimicrobienne de la santoline et évaluation de la teneur intraspécifique en SKE.....	108
3.3.2. Activité antimicrobienne de trois espèces du genre <i>Santolina</i> et évaluation de la teneur interspécifique en SKE.....	111
4. Optimisation de l'extrait brut de santoline	115
4.1. Optimisation de la matière première végétale : partie de la plante traitée	115
4.2. Optimisation du solvant d'extraction	118
4.3. Validation du méthanol comme solvant d'extraction	120
4.4. Réalisation d'un second pilote industriel	121
5. Optimisation de la couleur : décoloration de l'extrait brut de santoline..	123
5.1. Décoloration par distillation moléculaire	123
5.1.1. Essais sur le pilote 1	123
5.1.2. Essais sur le pilote 2.....	126
5.2. Décoloration au charbon actif	129
6. Optimisation cosmétique et faisabilité industrielle : conclusions et perspectives du projet NATUBAVAL	132

CHAPITRE IV	135
ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTIMICROBIEN DE MÉLANGES D'EXTRAITS : UNE ALTERNATIVE POUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN INGRÉDIENT COSMÉTIQUE CONSERVATEUR ?	135
1. Contexte et intérêt de cette alternative	137
2. Étude de mélanges <i>S. chamaecyparissus</i> – <i>R. chalepensis</i>	138
2.1. Intérêt de <i>R. chalepensis</i> dans cette étude	138
2.2. Étude de mélanges santoline/rue	139
3. Étude de mélanges impliquant <i>S. chamaecyparissus</i> , <i>R. chalepensis</i> et une gomme-résine	143
4. Conclusions et perspectives	145
CONCLUSION GÉNÉRALE	147
PARTIE EXPÉRIMENTALE	149
1. Réactifs, solvants et appareillage	151
1.1. Réactifs et solvants	151
1.2. Appareillage	151
1.2.1. HPLC-ELSD-DAD	151
1.2.2. HPTLC	152
1.3. UPLC-HRMS	152
1.4. RMN	152
2. Procédures expérimentales	153
2.1. Prélèvement et préparation du matériel végétal (Chapitre II)	153
2.2. Extraction des matières premières végétales	153
2.3. Analyse des extraits bruts	154
2.3.1. HPLC-DAD-ELSD	154
2.3.2. HPTLC	155
2.4. Tests d'activité antimicrobienne	156
2.4.1. Tests sur plaques 96 puits (méthode par dilution)	156
2.4.2. Tests par bioautographie (HPTLC-EDA)	160
2.5. Tests d'activité antioxydante	160
2.5.1. Dosage des phénols totaux : détermination de l'indice de Folin-Ciocalteu	160

2.5.2.	Évaluation de la capacité antioxydante : test au DPPH.....	164
2.6.	Analyse de l'extrait brut de <i>S. chamaecyparissus</i> (Chapitre III) ...	167
2.6.1.	Fractionnement bioguidé de l'extrait brut.....	167
2.6.2.	Isolement du composé majoritaire de F2	168
2.6.3.	Identification du composé majoritaire isolé.....	169
2.7.	Dosage du spirokétal énol (SKE) par HPLC-DAD	172
2.8.	Extraits obtenus dans le cadre de l'évaluation de l'activité antimicrobienne du SKE	174
2.8.1.	Extraits bruts de santoline d'origine géographique variable.....	174
2.8.2.	Extraits issus d'autres espèces du genre <i>Santolina</i>	175
2.8.3.	Extrait pilote 1 Naturex.....	175
2.9.	Extraits obtenus dans le cadre de l'optimisation de l'extrait de santoline.....	175
2.9.1.	Extraits issus de différentes parties de la plante	175
2.9.2.	Essais obtenus à l'aide d'un mélange éthanol/eau en proportions variables.	176
2.9.3.	Extraits obtenus à partir d'autres solvants organiques	177
2.9.4.	Extrait pilote 2	177
2.9.5.	Décoloration par distillation moléculaire.....	177
2.9.6.	Décoloration au charbon actif.....	180
2.10.	Évaluation de l'activité de mélanges (Chapitre IV).....	180
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	183
	CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	191
	ANNEXES.....	193

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

AFNOR : Association française de normalisation

AGMI : acides gras monoinsaturés

AGPI : acides gras polyinsaturés

AISBL : Association internationale sans but lucratif

ANSM : Association Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé

ATCC : *American Type Culture Collection*

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CBD : *Convention on Biological Diversity* / Convention sur la diversité biologique

CE : Communauté européenne

CEE : Communauté économique européenne

CEPF : *Critical Ecosystem Partnership Fund* / Fonds de Partenariat pour les Ecosystèmes Critiques

CI : *Conservation International*

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMR : Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique

COSMOS : COSmetic Organic Standard

CSSC : Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs

δ : déplacement chimique (ppm)

DAD : *Diode Array Detector* / Détecteur à barrettes de diode

DIP : Dossier d'Information sur le Produit cosmétique

DO : densité optique

ECHA : *European Chemicals Agency* / Agence européenne des produits chimiques

EDA : *effect-directed analysis* / analyse dirigée par l'effet

ELSD : *Evaporative Light Scattering Detector* / Détecteur évaporatif à diffusion de lumière

EN : *European norm* / Norme européenne

ESI : *Electrospray Ionisation* / ionisation par électronébuliseur

FDA : *Food and Drug Administration* / Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

HPLC : *High-Performance Liquid Chromatography* / Chromatographie liquide haute performance

HPTLC : *High-Performance Thin-Layer Chromatography* / Chromatographie sur couche mince haute performance

HRMS : *High Resolution Mass Spectrometry* / Spectrométrie de masse haute résolution

IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane

ICH : *International Conference on Harmonisation* / Conseil international d'harmonisation

INCI : *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* / Nomenclature internationale des ingrédients cosmétiques

INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques

ISO : *International Organization for Standardization* / Organisation internationale de normalisation

J : constante de couplage (Hz)

λ : longueur d'onde (nm)

m/z : rapport masse/charge

N/A : non applicable

NF : Norme française

NOS : *Reactive Nitrogen Species* / Espèces réactives de l'azote

ONG : Organisation non gouvernementale

ONU : Organisation des Nations Unies

Ph. Eur. : Pharmacopée européenne

PI : pouvoir d'inhibition

R_f : rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : *Reactive Oxygen Species* / Espèces réactives de l'oxygène

TCM : triglycérides à chaîne moyenne

TOF : *Time of Flight* / Temps de vol

t_R : temps de rétention

USP : *United States Pharmacopoeia* / Pharmacopée américaine

UV : ultraviolet

GLOSSAIRE

Anthelminthique : vermifuge, qui élimine les parasites intestinaux¹

Capitule : inflorescence à fleurs sessiles ou subsessiles portées par le sommet élargi du pédoncule (réceptacle)²

Catarrhe : inflammation et hypersécrétion des muqueuses³

Emménagogue : qui provoque ou favorise l'apparition des menstruations¹

Hampe florale : axe florifère sans feuille⁴

Néphélométrie : il s'agit d'une méthode permettant de mesurer la teneur de particules en suspension d'un milieu, par exemple la quantité de matière en suspension dans un liquide ou la concentration d'une suspension de bactéries. La néphélométrie consiste à mesurer, au moyen d'un néphélomètre, l'intensité lumineuse à un certain angle d'un rayon issu de la diffusion d'un rayon initial par la particule.⁵

Tomenteux : recouvert de poils longs et doux, cotonneux²

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'industrie cosmétique est un secteur dynamique porté par le marketing et l'innovation pour proposer des produits toujours plus novateurs, performants et ciblés. Elle est en progression constante avec une croissance du marché cosmétique mondial de l'ordre de 4,0 % en 2016, et une augmentation de l'ordre de 20 % des ventes en ligne. Les consommateurs, quant à eux, s'intéressent de plus en plus à la composition des produits qu'ils achètent.

Les études scientifiques et enquêtes d'associations de consommateurs remettant en cause l'innocuité de certains composants se multiplient depuis le début des années 2000. Les conservateurs synthétiques tels que les parabènes, le triclosan ou encore le phénoxyéthanol, utilisés pour leur efficacité et leur faible coût, font partie des ingrédients cosmétiques pointés du doigt. Cela pose une véritable problématique aux fabricants de produits cosmétiques, qui se voient obligés d'adapter leurs formulations pour proposer des alternatives considérées comme sûres aux consommateurs.

Dans un autre registre, une des thématiques d'urgence au niveau mondial d'un point de vue environnemental et dans une optique de développement durable, est la protection de la biodiversité. Le concept de *hotspot* s'applique aux zones possédant une richesse spécifique exceptionnelle et une forte perte de biodiversité. Ces points chauds de biodiversité sont au nombre de 35 répartis sur tout le globe et représentent des zones sensibles dont la diversité écologique est en danger, qu'il est nécessaire de préserver. Un de ces *hotspots* se trouve en partie sur le territoire français : le bassin méditerranéen. Représentant seulement 2 % de la surface terrestre, il concentre pas moins de 20 % de la flore totale mondiale.

La recherche d'ingrédients naturels engageant les fabricants cosmétiques dans une politique d'économie verte, il est indispensable de reconnaître le besoin urgent de préserver la biodiversité et de procéder à une utilisation durable des ressources.

C'est dans ce contexte et grâce à la volonté d'une collaboration entre plusieurs acteurs clés qu'est né le projet NATUBAVAL, dont l'objectif est la valorisation de la biodiversité végétale méditerranéenne en vue du développement d'un nouveau conservateur destiné à l'industrie cosmétique. L'objectif de ce travail est d'exposer la démarche scientifique et la stratégie mises en œuvre pour mener à bien ce projet. L'ensemble des étapes ayant permis le développement d'un ingrédient naturel, de l'identification d'une plante d'intérêt parmi dix-sept candidats à la caractérisation d'un actif issu de cette plante, en passant par l'optimisation de l'extrait de départ pour obtenir un extrait formulable, sont présentés dans cette thèse.

Le premier chapitre est consacré à la présentation des thématiques et du contexte dont elle fait l'objet, à savoir la conservation en cosmétique et la biodiversité végétale. Il présente également les objectifs et acteurs du projet NATUBAVAL.

Le second chapitre s'intéresse à l'analyse de dix-sept extraits végétaux obtenus à partir de plantes méditerranéennes sélectionnées pour leur potentiel antimicrobien et/ou antioxydant. Une étude de leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes a permis de sélectionner une espèce d'intérêt particulier dont la potentielle utilisation en tant que conservateur cosmétique n'était jusqu'alors pas décrite dans la littérature : *Santolina chamaecyparissus*, la santoline.

Le troisième chapitre de cette thèse présente l'analyse approfondie de l'extrait brut de santoline, en particulier l'identification d'un actif, et le travail d'optimisation réalisé afin de développer un ingrédient cosmétique conservateur.

Le quatrième chapitre expose l'évaluation d'une alternative à la stratégie de développement d'un ingrédient cosmétique conservateur constitué d'un seul extrait. Dans cette partie, l'activité antimicrobienne de mélanges à base de santoline et d'autres extraits ou fractions d'extraits présentant également un fort potentiel antimicrobien a été étudiée.

Le cinquième et dernier chapitre regroupe l'ensemble des procédures expérimentales mises en œuvre dans cette étude.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE : DE L'INDUSTRIE COSMÉTIQUE À LA BIODIVERSITÉ VÉGÉTALE –INTRODUCTION AU PROJET « NATUBAVAL »

Qu'est-ce qu'un produit cosmétique ? Comment est réglementée sa mise sur le marché ? Ce chapitre présente tout d'abord quelques notions de base sur la réglementation et la formulation des produits cosmétiques avant de s'intéresser à une catégorie d'additifs cosmétiques : les conservateurs. Qui sont-ils, pourquoi sont-ils utilisés, et surtout, pourquoi l'utilisation de certains conservateurs de synthèse est-elle aujourd'hui tant controversée ? Quelles sont les alternatives naturelles dont disposent les industriels cosmétiques ? La biodiversité végétale est un immense capital naturel qui a tout à fait intérêt à être préservé et valorisé au vu des nombreuses menaces qui pèsent sur cet équilibre fragile. De cette volonté de combiner cosmétique et biodiversité est né un projet aux nombreuses facettes : le projet « NATUBAVAL ».

1. La conservation des produits cosmétiques

1.1. Introduction à la réglementation cosmétique européenne

Selon l'article L5131-1 du Code de la Santé Publique, « *on entend par produit cosmétique toute substance ou mélange destiné à être mis en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaires, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes, ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles* ».

Avec une croissance de 3,9 % en 2015, le marché mondial de la cosmétique est estimé à plus de 200 milliards d'euros⁶. Le marché européen est estimé à lui seul à 77 milliards d'euros par *Cosmetics Europe*, ce qui en fait le premier marché mondial. L'industrie cosmétique européenne est également la plus active au niveau mondial en termes d'exportation, et constitue ainsi un secteur clé pour l'économie européenne⁷. Avec une offre toujours plus innovante en réponse aux besoins des consommateurs et un marketing de plus en plus stratégique, il est aujourd'hui devenu presque impossible de se passer de produits cosmétiques.

En effet, qu'il s'agisse de produits pour la peau (crèmes, lotions, solaires, maquillage), de produits d'hygiène (savons de toilette, déodorants), de produits capillaires (shampooings, colorants, laques) ou encore de parfums, chacun d'entre nous, à tout

âge, en est consommateur à dose plus ou moins importante. La sécurité du consommateur est donc un enjeu crucial pour les fabricants cosmétiques, et les produits cosmétiques font aujourd'hui partie des produits de consommation les plus contrôlés et réglementés.

Ainsi, le Code de la Santé Publique encadre leur mise sur le marché au moyen de dispositions s'inscrivant dans le règlement cosmétique (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009, entré en vigueur en 2013 et applicable aux 28 pays de l'Union européenne et à quatre pays de l'Association Européenne de Libre Echange (la Suisse, la Norvège, l'Islande et le Liechtenstein). Les produits cosmétiques ne sont pas soumis à une autorisation préalable de mise sur le marché, contrairement aux médicaments.

En revanche, le fabricant ou le responsable de la mise sur le marché doit tout de même s'assurer de la sécurité de ses produits et tenir à disposition des autorités de contrôle nationales un dossier technique appelé DIP (Dossier d'Information sur le Produit cosmétique) répondant aux exigences législatives réglementaires. Selon le règlement cosmétique, ce dossier doit également être conservé dix ans après la mise sur le marché du dernier lot d'un produit cosmétique. Des listes « négatives » de substances interdites (annexe II du règlement cosmétique) ou réglementées (annexe III), et des listes « positives » de substances autorisées comme colorants (annexe IV), conservateurs (annexe V) et filtres ultraviolets (annexe VI) sont également prévues par la réglementation et mises à jour régulièrement par les instances européennes.

La liste complète des ingrédients, selon leur dénomination INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*, Nomenclature internationale des ingrédients cosmétiques) doit figurer sur l'étiquette de chaque produit cosmétique dans l'ordre décroissant de leur concentration lorsque celle-ci est supérieure à 1 % du produit fini. Pour les ingrédients présents en concentration inférieure à 1 % du produit fini, l'ordre d'apparition peut être aléatoire. La nomenclature INCI a été initiée aux Etats-Unis dans les années 1970⁸ et est obligatoire dans l'Union Européenne depuis 1999. Elle est standardisée dans tous les pays utilisant la dénomination INCI à travers le monde afin d'assurer une certaine transparence de produits souvent commercialisés à l'échelle internationale, d'autant plus qu'elle répertorie actuellement plus de 16 000 ingrédients.

Concernant la fabrication des produits cosmétique, chaque étape doit être effectuée selon les BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) définies par la norme NF EN ISO 22716 créée en 2008, afin d'assurer un niveau de qualité constant et homogène⁹. En somme, une réglementation stricte et un engagement sans faille des fabricants sont deux facteurs complémentaires permettant de garantir une parfaite innocuité des produits cosmétiques ainsi que la sécurité du consommateur.

Enfin, peu importe la formulation réalisée (crème, lotion, émulsion, etc.), la composition d'un produit cosmétique est toujours la même¹⁰ : tout d'abord, les **excipients** constituent la base du produit (jusqu'à 90 % de la formule) et lui confèrent sa texture et son aspect physique. Ils servent également à véhiculer le ou les principe(s) **actif(s)**, dont la concentration totale dans la formule peut aller de 1 % pour des actifs synthétiques à 70 % pour des actifs naturels. Le choix des excipients est déterminant pour la qualité et l'efficacité des produits, d'autant plus qu'un excipient peut également jouer le rôle de principe actif, lorsqu'il s'agit par exemple d'une huile végétale riche en acides gras et vitamines.

D'après l'article 20 du règlement européen 655/2013, lorsque des allégations revendiquent une certaine efficacité des actifs, elles doivent être justifiées par des publications ou des études.

Ensuite, les **adjuvants** favorisent le rôle de l'excipient et du principe actif et ont un effet essentiellement sur la texture du produit. Ils sont présents en très faibles concentrations : ce sont par exemple les gélifiants, les agents de consistance, les tensio-actifs ou encore les humectants.

Finalement, les **additifs** n'influencent pas les propriétés cosmétiques du produit (activité, texture), mais ils sont utilisés pour permettre une meilleure présentation (couleur, odeur...) et une meilleure conservation du produit. Ce sont par exemple les colorants, les parfums, ou encore les conservateurs)¹¹.

Cette dernière catégorie d'additifs fera l'objet dans ce travail d'une attention toute particulière car elle constitue la thématique principale de cette étude. Par ailleurs, la thématique des conservateurs en cosmétique est alimentée par de nombreux débats, que ce soit au sein de l'industrie cosmétique ou des consommateurs.

Comment les conservateurs influencent-ils la durée de vie des produits cosmétiques ? Quelles sont les solutions de conservation proposées aux industriels cosmétiques ? Tout d'abord, les conservateurs peuvent être divisés en deux grands groupes : les conservateurs antimicrobiens et les conservateurs antioxydants.

1.2. Les conservateurs antimicrobiens

Bien que les produits cosmétiques ne doivent pas être stériles, il est nécessaire de garantir leur intégrité et de les protéger de toute altération et contamination microbienne. Afin de prolonger leur durée de vie, les fabricants ont recours à l'utilisation de conservateurs, dont la liste positive se trouve en annexe V du règlement cosmétique. Au sens strict et d'après le règlement cosmétique, les agents conservateurs sont des substances « *exclusivement ou principalement destinées à empêcher le développement de micro-organismes dans le produit cosmétique* ».

1.2.1. La contamination des produits cosmétiques par les micro-organismes

De nombreux produits cosmétiques – lorsqu'il ne s'agit pas de lotions riches en éthanol ou de produits anhydres – sont, que ce soit lors de leur production, de leur utilisation ou en raison de leur composition, des cibles faciles pour les micro-organismes tels que les bactéries ou les moisissures, qui peuvent alors proliférer dans un milieu qui leur est favorable. Lors des étapes de production, les cosmétiques peuvent être contaminés par différentes sources : les matières premières (ingrédients actifs, eau, agents colorants), les emballages primaires (contenants), l'atmosphère des locaux de production, et le personnel. Lors de leur utilisation, ils sont soumis au contact de la salive, des mains, de l'eau et de l'air qui sont autant de sources potentielles de contamination microbienne. De plus, ils sont typiquement conservés dans la salle de bain, qui est un endroit chaud et humide, réunissant ainsi toutes les conditions optimales pour la croissance microbienne. Enfin, en termes de formulation, ils peuvent contenir de l'eau, des acides gras, des peptides ou encore des hydrates de carbone et constituent ainsi un milieu favorable à la croissance microbienne¹².

Les micro-organismes susceptibles de contaminer les produits cosmétiques sont donc ceux faisant partie de notre environnement au quotidien. Il s'agit surtout de bactéries (par exemple *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa), mais des champignons microscopiques (par exemple les espèces du genre *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*) et levures (par exemple *Candida albicans*, ou les espèces du genre *Saccharomyces*) peuvent également s'y retrouver.

Par définition, un micro-organisme est un organisme vivant qui ne peut être observé à l'œil nu mais uniquement au moyen d'un microscope. Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes, c'est-à-dire que les cellules, uniques, ne contiennent pas de noyau. On distingue les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif¹³. Les bactéries à Gram négatif possèdent une structure à double membrane, plus épaisse que celles des bactéries à Gram positif, puisqu'elle est constituée d'une membrane interne et d'une membrane externe, séparées par un espace périplasmique comportant notamment une paroi cellulaire (**Figure 1**). Les bactéries à Gram positif possèdent une membrane unique dite membrane plasmique, séparée de la paroi cellulaire par un espace périplasmique. La paroi cellulaire permet dans les deux cas le maintien de la forme et de l'équilibre osmotique des cellules et est essentiellement constituée de peptidoglycane. Une technique de coloration appelée coloration de Gram, publiée par Hans Christian Gram en 1884, assortie à une observation au microscope, permet de les différencier¹⁴.

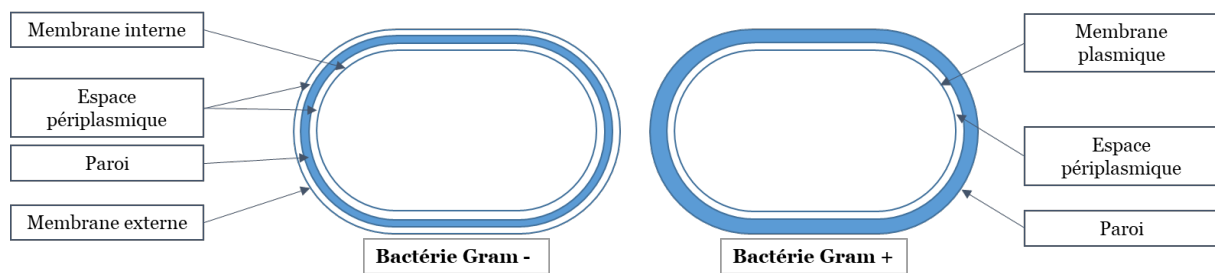


Figure 1 : Schéma des structures membranaires des bactéries à Gram négatif et positif

À l'inverse, les champignons microscopiques sont eucaryotes, c'est-à-dire que chaque cellule contient un noyau et leur structure est ainsi plus complexe. Ils se présentent souvent sous forme de filaments et sont donc pluricellulaires, à l'exception des levures qui sont des champignons unicellulaires¹⁵. La **Figure 2** présente quatre micro-organismes parmi les plus susceptibles de contaminer les produits cosmétiques : *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif), *Pseudomonas aeruginosa* (bactérie à Gram négatif), *Aspergillus brasiliensis*, anciennement connu sous le nom de *Aspergillus niger* (champignon microscopique filamenteux) et *Candida albicans* (levure unicellulaire).

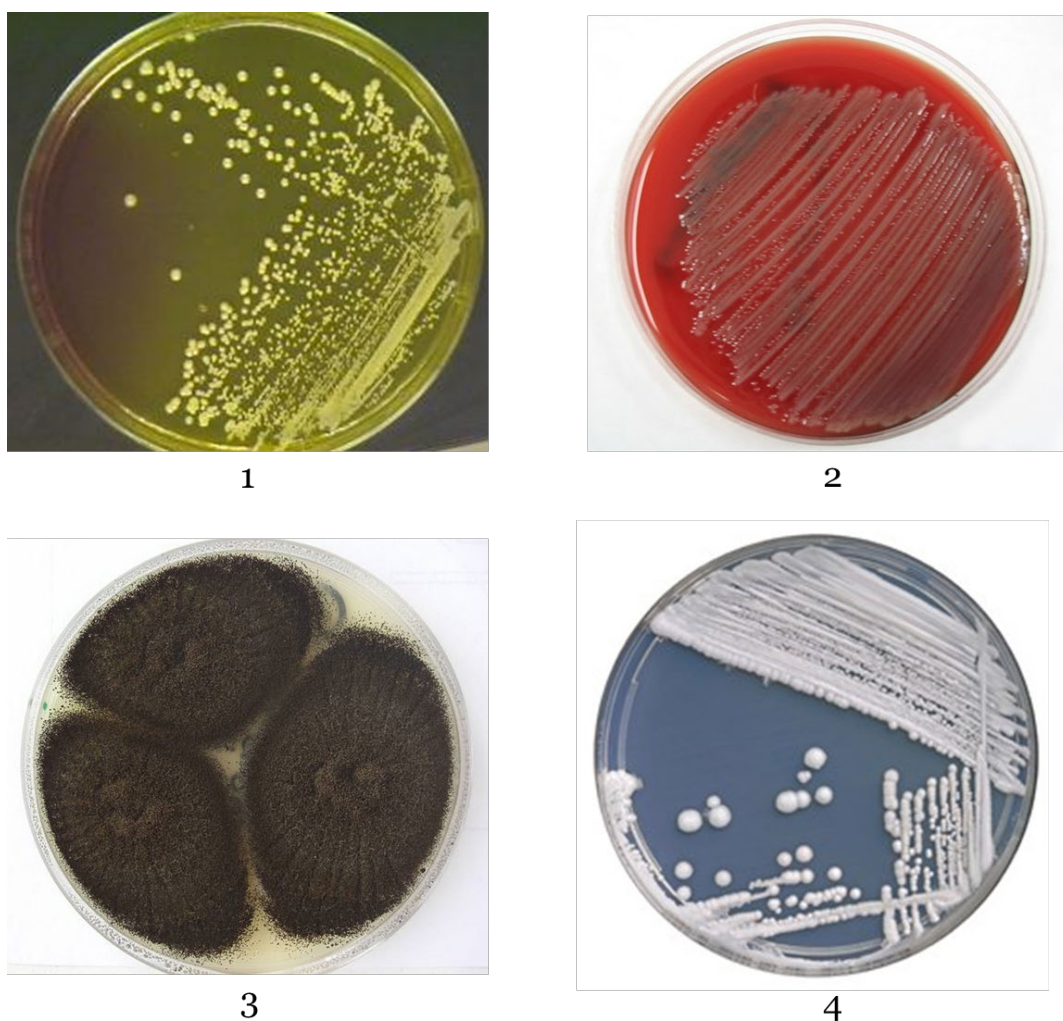


Figure 2 : Les principaux micro-organismes responsables de la contamination des produits cosmétiques

1 : *Staphylococcus aureus*¹⁶ ; **2** : *Pseudomonas aeruginosa*¹⁷

3 : *Aspergillus brasiliensis*¹⁸ ; **4** : *Candida albicans*¹⁹

1.2.2. Rôle et mode d'action des conservateurs antimicrobiens

Les conservateurs antimicrobiens sont utilisés pour pallier toute contamination ou prolifération microbienne. Ils sont utilisés dans les produits contenant une phase aqueuse et peuvent être de deux types selon les organismes visés : antibactériens (contre les bactéries) et antifongiques (contre les champignons microscopiques). Deux mécanismes d'action existent selon les conservateurs utilisés : ils peuvent soit tuer les micro-organismes (conservateurs bactéricides ou fongicides) ou inhiber leur croissance (conservateurs bactériostatiques ou fongistatiques). Un aspect très important de la conservation est que l'action des conservateurs se fait toujours sur les cellules microbiennes uniquement, et non sur les cellules humaines. Ceci est dû à la différence de structure entre les deux types de cellules. Par ailleurs, l'action des conservateurs se fait à travers de nombreux points d'attaque. Concernant le mode d'action des conservateurs sur les cellules microbiennes, celui-ci varie selon le type de conservateur.

En effet, les conservateurs peuvent agir en dénaturant les protéines situées au niveau de la paroi cellulaire bactérienne, sur les membranes, la synthèse des protéines ou encore en altérant les systèmes enzymatiques et en dénaturant les acides nucléiques pour modifier le système de reproduction des cellules eucaryotes²⁰. Cela affecte directement le transport et la production d'énergie. Plus spécifiquement, les parabènes, qui sont les conservateurs les plus utilisés durant de nombreuses années, qui seront présentés plus en détails un peu plus loin, perturbent le potentiel électrique de la membrane pour bloquer la production d'énergie et le transport de nutriments essentiels à la survie de la bactérie²¹.

Finalement, selon la dose incorporée, l'action des conservateurs est plus ou moins importante et peut aller d'une simple inhibition de la croissance microbienne à une destruction irréversible des micro-organismes.

1.2.3. Les conservateurs autorisés

L'annexe V du règlement cosmétique européen 1229/2009 (**Annexe 1**) cite une cinquantaine de conservateurs, tous synthétiques, autorisés dans les produits cosmétiques. Les plus notoires d'entre eux sont les esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, plus connus sous le nom de **parabènes**, ou parabens (**parahydroxybenzoates**), qui ont longtemps été à la tête des conservateurs les plus utilisés, puisqu'encore en 2010, on les retrouvait dans près de 80 % des produits cosmétiques.

Quatre d'entre eux sont autorisés en cosmétique (**Figure 3**) : les esters méthylique (méthylparabène, *Methylparaben*), éthylique (éthylparabène, *Ethylparaben*), propylique (propylparabène, *Propylparaben*) et butylique (butylparabène, *Butylparaben*) de l'acide 4-hydroxybenzoïque, les méthyl- et propylparabène étant les plus utilisés. Malgré leur efficacité, leur utilisation est de moins en moins importante, et ce depuis la controverse née suite à la publication d'une étude du Dr. Philippa Darbre, selon laquelle des recherches effectuées à l'université de Reading au Royaume-Uni auraient permis de mettre en évidence la présence de parabènes dans des tumeurs issues de cancers du sein en raison d'un effet œstrogénique²². Les parabènes sont suspectés de présenter un effet œstrogénique²³, ou des effets négatifs sur la fertilité masculine lors d'une exposition durant l'enfance²⁴.

Bien qu'aucune de ces études n'ait réellement confirmé ces recherches préliminaires et qu'aucun lien direct n'ait pu être établi entre la présence de parabènes dans un produit cosmétique et le développement de tumeurs cancéreuses, la forte médiatisation de ces travaux a conduit à un rejet massif par les consommateurs des produits contenant des parabènes. Pour les industriels cosmétiques, cela pose problème puisque ces conservateurs étaient utilisés dans toutes les formulations eau-huile, et sont efficaces à très faible concentration (0,4 % pour un ester seul et 0,8 % en mélange). Souvent utilisés en mélange pour leur effet de synergie et afin de garantir un large spectre d'activité antimicrobienne, ils ont représenté une solution à faible coût pour les fabricants, qui se sont vus, de plus en plus, obligés de se tourner vers d'autres alternatives afin de répondre aux exigences des consommateurs.

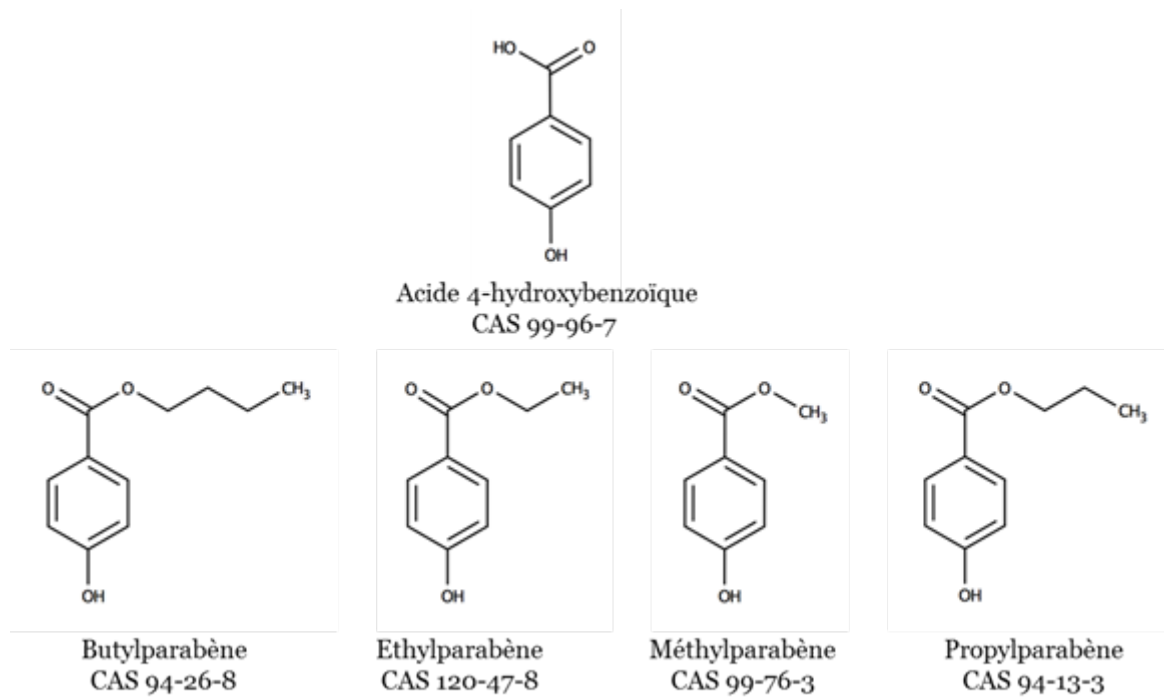
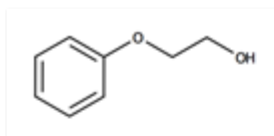


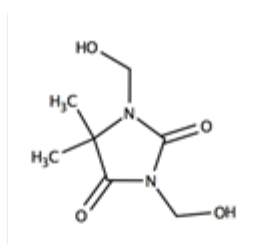
Figure 3 : L'acide 4-hydroxybenzoïque et ses esters : les parabènes

Comment les industriels résolvent-ils alors le « problème » des parabènes ? Quelles alternatives sont utilisées afin de rassurer les consommateurs ?

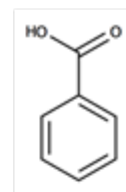
En fait, une simple diminution de la concentration de parabènes dans les formulations n'est pas satisfaisante du point de vue des consommateurs. Par conséquent, le principe de précaution étant de rigueur, les fabricants préfèrent utiliser un des nombreux conservateurs de synthèse alternatifs, en remplacement ou en complément des parabènes. La **Figure 4** présente les formules chimiques des autres conservateurs synthétiques les plus fréquemment retrouvés sur la liste des ingrédients des produits cosmétiques.



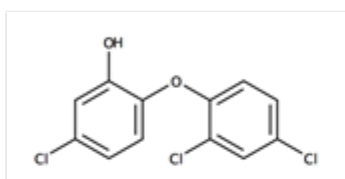
Phénoxyéthanol
(*Phenoxyethanol*)
122-99-6 (1,0 %)



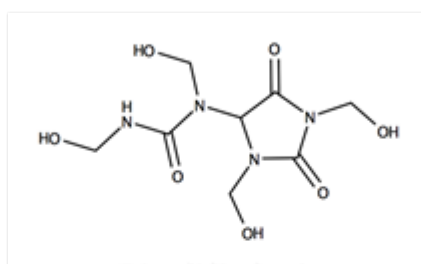
Diméthylhydantoïne
(*DMDM Hydantoin*)
6440-58-0 (0,6 %)



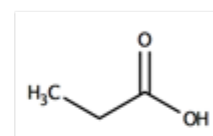
Acide benzoïque
(*Benzoic acid*)
65-85-0 (2,5 % ³)



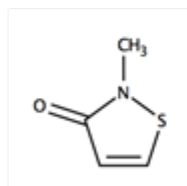
Triclosan
(*Triclosan*)
3380-34-5 (0,3 %)



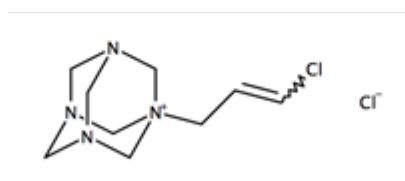
Diazolidinyl urée
(*Diazolidinyl urea*)
78491-02-8 (0,5 %)



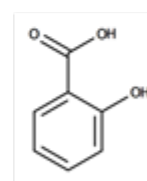
Acide propionique
(*Propionic acid*)
79-09-4 (2,0 % ³)



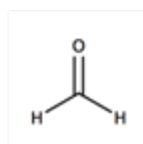
Méthylisothiazolinone
(*Methylisothiazolinone*)
2682-20-4 (00015 % ¹)



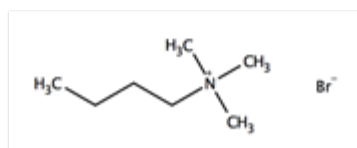
Quaternium-15
(*Quaternium-15*)
4080-31-3 (0,2 %)



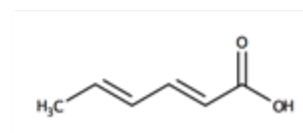
Acide salicylique
(*Salicylic acid*)
69-72-7 (0,5 % ³)



Formaldéhyde
(*Formaldehyde*)
50-00-0 (5,0 % ²)



Bromure de cétrimonium
(*Cetrimonium bromide*)
57-09-0 (0,1 %)



Acide sorbique
(*Sorbic acid*)
110-44-1 (0,6 % ³)

Figure 4 : Exemples d'alternatives de synthèse aux parabènes :

Nom de la molécule

(*Dénomination INCI*)

Numéro CAS (concentration maximale autorisée)

¹ d'un mélange dans un rapport 3:1 de chloro-5- méthyl-2- isothiazoline-4-one-3 et méthyl-2- isothiazoline-4-one-3

² en aldéhyde formique

³ acide

En revanche, ces alternatives synthétiques aux parabènes ne sont pas forcément plus sécurisantes ou plus inoffensives. Voici quelques exemples de conservateurs qui sont, eux aussi, fortement controversés :

- Le phénoxyéthanol : il fait partie de la famille des éthers de glycol. Un rapport de l'Association Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), publié en mai 2012, lui attribue de potentiels effets reprotoxiques et hépatotoxiques, en plus d'être potentiellement responsable de l'apparition d'eczéma et d'urticaire. Les bébés et jeunes enfants ayant un seuil de tolérance moins élevé, l'ANSM préconise, concernant les enfants de moins de 3 ans, d'éviter toute utilisation de phénoxyéthanol dans les produits cosmétiques destinés au siège et de réduire la concentration en phénoxyéthanol à 0,4 % au lieu d'1,0 % dans tous les autres types de produits²⁵.

- Le triclosan : souvent présent dans les dentifrices et dans certains savons, il est également accusé d'être un perturbateur endocrinien, avec notamment une activité anti-androgène^{23,26}. Bien que la *Food and Drug Administration* (FDA, Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) l'ait partiellement interdit aux États-Unis en octobre 2016, il est toujours autorisé en Europe. Il est néanmoins interdit dans les produits de rasage depuis le 30 octobre 2014, et sa concentration est limitée à 0,2 % dans les bains de bouche.

- La méthylisothiazolinone (MIT) : elle est connue pour son fort pouvoir allergisant, même utilisée à très faible concentration (0,01 %). Ainsi, un rapport publié en décembre 2015 par le Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs (CSSC) de la Commission Européenne recommande une utilisation de 0,0015 % pour les produits à rincer, et ne considère pas comme sûre la concentration autorisée de 0,01 % pour les produits sans rinçage en raison des risques de développement d'allergies de contact par les consommateurs²⁷.

- Le formaldéhyde : gaz également connu sous le nom de formol lorsqu'il est sous forme de solution aqueuse, il a longtemps été utilisé pour ses propriétés conservatrices. En revanche, il est nocif par inhalation et classé 1B selon la classification CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique), ce qui représente un

risque CMR présumé pour l'homme. Malgré tout, son utilisation est autorisée dans les produits pour ongles, et plus spécifiquement les durcissants pour ongles. Par ailleurs, il est également connu comme étant l'allergène cosmétique le plus fréquent en raison de son fort pouvoir irritant²⁸.

En outre, des substances libérant du formaldéhyde sont autorisées par la liste positive des conservateurs, notamment la diméthylhydantoïne, la diazolidinyl urée ou encore le Quaternium-15. Toujours selon l'annexe V du règlement cosmétique, « tous les produits finis contenant du formaldéhyde ou des substances de la présente annexe et libérant du formaldéhyde doivent reprendre obligatoirement sur l'étiquetage la mention «Contient: *Formaldehyde*» dans la mesure où la concentration en formaldéhyde dans le produit fini dépasse 0,05 %». Cette mesure se veut rassurante pour le consommateur, qui est assuré d'utiliser des produits en toute transparence puisqu'il sait ce qu'ils contiennent.

En résumé, les conservateurs synthétiques, bien que souvent appréciés par les fabricants pour leur faible coût et leur efficacité à faible concentration, présentent un risque lié à leurs potentiels effets secondaires, et n'en sont donc pas moins inoffensifs. Même si les concentrations fixées par la réglementation sont considérées comme sûres car en-deçà du seuil de toxicité, l'effet à long terme de ces produits est souvent trop peu connu et, par conséquent, imprévisible.

En effet, la dose maximale autorisée en conservateurs est très variable, et se situe entre 0,004 % pour le chlorure d'argent et 2,5 % pour l'acide benzoïque. Les fabricants choisissent généralement d'utiliser un mélange de conservateurs en concentrations faibles afin d'obtenir une efficacité maximale tout en couvrant un large spectre microbien. Leur dosage est également plus ou moins important selon les risques de contamination. En effet, un produit contenant peu d'éléments nutritifs pour les micro-organismes ne nécessitera qu'une faible dose de conservateur, et vice-versa. De la même manière, un produit anhydre ou formulé avec une concentration suffisante en alcool éthylique (Dénomination INCI : *Alcohol denat.* ou *Alcohol*), généralement de l'ordre de 10 à 15 %, ne nécessitera pas ou peu de conservation supplémentaire.

En plus de prévenir les risques de contamination microbienne par l'ajout de conservateurs, les fabricants doivent également pallier les risques de dégradation des produits cosmétiques contenant des corps gras, très sensibles à l'oxydation. Ils ont alors recours à des agents antioxydants permettant de protéger ces corps gras. Cette catégorie de conservateurs n'est cependant pas réglementée de manière spécifique en-dehors du règlement cosmétique. Quels antioxydants sont utilisés en cosmétique et comment agissent-ils ?

1.3. Les conservateurs antioxydants

Tout d'abord, qu'est-ce que l'oxydation ? Pourquoi les produits cosmétiques y sont-ils sensibles ?

1.3.1. L'oxydation en cosmétique : introduction et définitions

De manière générale, l'oxydation correspond à une réaction chimique d'oxydoréduction, par exemple de type radicalaire lorsqu'elle se produit en présence de radicaux libres, espèces chimiques hautement réactives et instables du fait de la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés. Ces espèces cherchent à se stabiliser en prenant un ou plusieurs électrons à une substance voisine. La substance perdant un électron se retrouve oxydée, et le radical libre gagnant un électron s'en trouve réduit.

Les radicaux libres peuvent être oxygénés sous forme de ROS (*Reactive Oxygen Species*, espèces réactives de l'oxygène) ou azotés sous forme de RNS (*Reactive Nitrogen Species*, espèces réactives de l'azote). Ces composés sont présents naturellement dans notre organisme et impliqués dans de nombreux processus, physiologiques ou pathologiques²⁹. Par exemple, certains radicaux libres permettent un bon fonctionnement du système immunitaire. Un organisme sain est capable de contrôler leur présence afin qu'ils participent à la réponse immunitaire apportée par les leucocytes à une infection bactérienne ou virale. En revanche, présents en excès, ils sont responsables de réactions pro-oxydantes engendrant des phénomènes inflammatoires.

En cosmétique, les radicaux libres sont souvent générés par l'influence de sources exogènes, qui agissent comme catalyseurs des réactions d'oxydation. On peut citer notamment l'oxygène, la température, les rayons UV, ou encore certains métaux et enzymes. D'autres radiations comme les rayons X et gamma, ou encore les produits chimiques réagissant pour former des peroxydes (par exemple l'eau oxygénée) ou des superoxydes (par exemple les quinones), tout comme ceux métabolisés en radicaux (par exemple les phénols) ou ceux qui génèrent du fer (par exemple la ferritine) peuvent également être sources de radicaux libres.

Dans les produits cosmétiques, ce sont les corps gras qui sont les plus sensibles à l'oxydation. Ils proviennent par exemple d'huiles végétales, cires et phospholipides d'origine naturelle. Lorsqu'ils ne se trouvent plus dans leur environnement d'origine, c'est-à-dire les cellules végétales, ils ne sont plus protégés contre les altérations telles que l'oxydation ou la lipolyse (la dégradation par des enzymes telles que la lipase). L'oxydation est la principale cause de dégradation des acides gras insaturés dans les produits cosmétiques.

La réaction classique d'oxydation se déroule en trois étapes³⁰ (**Figure 5**) : l'initiation, la propagation et la terminaison. Au cours de l'initiation, des radicaux libres sont générés. Ensuite, au cours de la propagation, se forment tout d'abord des peroxydes, qui sont des composés primaires d'oxydation évoluant ensuite en composés secondaires d'oxydation, par exemple des composés aldéhydiques responsables de l'apparition du phénomène de rancissement. Des fonctions oxydées apparaissent enfin, et le stade de rancissement est alors avancé et perceptible au niveau olfactif et visuel. Le stade de terminaison, quant à lui, correspond à la formation de produits non radicalaires mais il est rarement atteint dans les produits cosmétiques en raison de la faible durée de vie des produits oxydés.

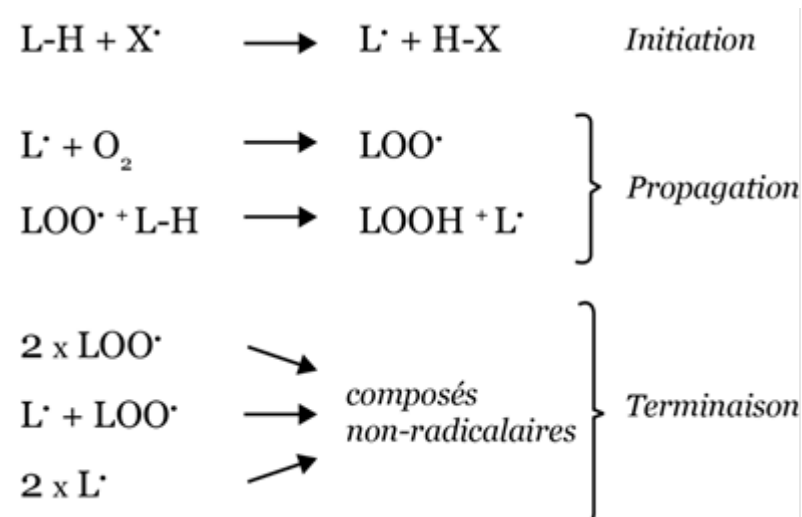


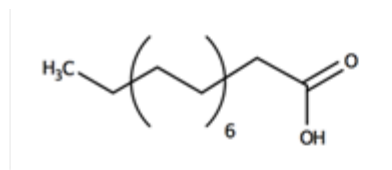
Figure 5 : Le mécanisme général de l'oxydation
Exemple de la peroxydation lipidique (**L[·]** : radical lipidique)

Dans les produits cosmétiques, le rancissement oxydatif des acides gras est plus spécifiquement une peroxydation lipidique, et se produit de manière spontanée (autoxydation) en présence d'oxygène atmosphérique³¹. Ce phénomène conduit non seulement au rancissement des acides gras oxydés, mais également à la formation de peroxydes et d'aldéhydes pouvant présenter une toxicité pour la peau.

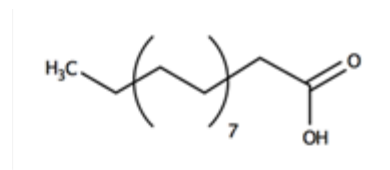
La nature des acides gras contenus par les corps gras influence fortement leur sensibilité à l'oxydation. En effet, en-dehors de leur chaîne carbonée plus ou moins longue et de leur fonction carboxylique, les acides gras peuvent contenir une ou plusieurs doubles liaisons, ou aucune. La ou les double(s) liaison(s) portée(s) par les acides gras monoinsaturés (AGMI, par exemple l'acide oléique) ou polyinsaturés (AGPI, par exemple l'acide linoléique ou l'acide linoléique) constitue(nt) des sites réactionnels favorisant les phénomènes d'oxydation (**Figure 6**).

Ainsi, les acides gras insaturés, qu'ils soient sous forme libre ou sous forme d'esters (triglycérides), sont les composés les plus sensibles à l'oxydation. À l'inverse, les acides gras saturés tels que l'acide stéarique ou l'acide palmitique, ne portant aucune double liaison, sont beaucoup plus stables. En revanche, plus l'insaturation d'un composé est importante, plus son oxydation sera rapide. Les dommages engendrés par ce phénomène se repèrent facilement : par exemple, sur une huile végétale, le rancissement est caractéristique et identifiable essentiellement par la dégradation

des propriétés organoleptiques des corps gras oxydés et parfois, par un changement de couleur.

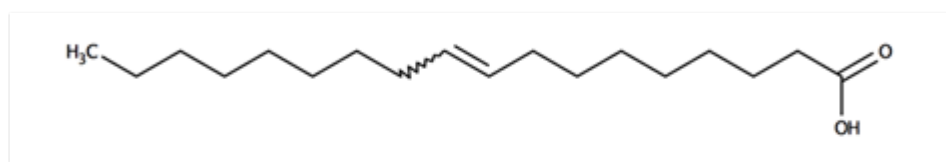


Acide palmitique (C16)
CAS 57-10-3



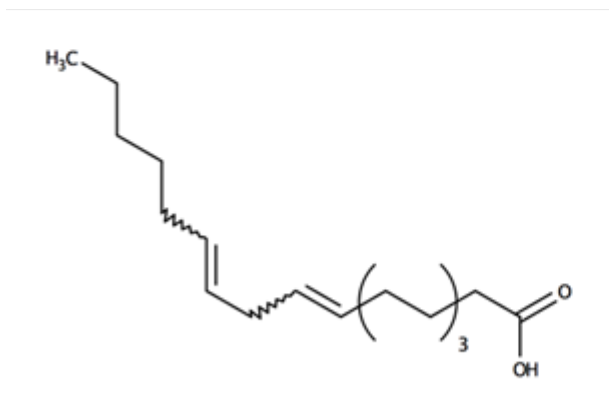
Acide stéarique (C18)
CAS 57-11-4

Acides gras saturés

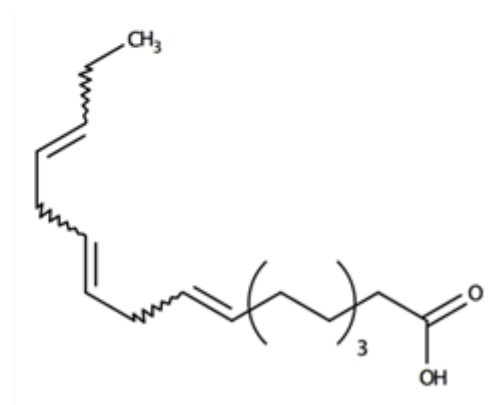


Acide oléique (C18)
CAS 112-80-1

Acide gras mono-insaturé



Acide linoléique (C18)
CAS 60-33-3



Acide linoléique (C18)
CAS 463-40-1

Acides gras poly-insaturés

Figure 6 : Exemples d'acides gras utilisés en cosmétique

Plus particulièrement, quelle est l'importance des agents antioxydants dans les produits cosmétiques et par quels mécanismes permettent-ils de s'opposer à l'oxydation ? De même, quels sont les antioxydants les plus fréquemment utilisés en cosmétique ?

1.3.2. Rôle, mode d'action et exemples d'antioxydants

De manière générale, un antioxydant est une substance qui retarde, prévient ou empêche les dommages oxydatifs causés sur une molécule cible³².

En cosmétique, des antioxydants sont incorporés dans les produits pour deux raisons : en tant qu'additifs, ils permettent d'empêcher le rancissement des ingrédients sensibles à l'oxydation, principalement les acides gras, huiles, et cires, mais également certains surfactants, parfums ou certaines vitamines liposolubles, et ainsi de prévenir la dégradation du produit. En outre, ils permettent de protéger les antioxydants présents en tant qu'actifs. En effet, ces derniers doivent demeurer intacts jusqu'à l'application du produit cosmétique, et permettent alors de protéger les cellules de la peau de ce même stress oxydatif, et ainsi de retarder le vieillissement de la peau. Il est donc primordial que les actifs soient intacts jusqu'à l'utilisation du produit, et que la phase huileuse, si elle est présente dans le produit, ne soit pas dégradée. Cela explique la nécessité d'incorporer des agents antioxydants dans les produits cosmétiques qui pourraient être sensibles à l'oxydation. Il est à noter que les réactions d'oxydation conduisant au rancissement des produits cosmétiques ne peuvent pas être totalement supprimées puisque cela signifierait une absence totale d'oxygène, mais elles sont simplement retardées pour permettre l'intégrité du produit pendant la durée d'utilisation recommandée par le fabricant.

Les antioxydants utilisés sont eux-mêmes sensibles à l'oxydation, et permettent ainsi de stopper les réactions d'oxydation en neutralisant les radicaux libres qui en sont responsables. En effet, les antioxydants ont la capacité de donner un ou plusieurs électrons aux radicaux instables, ce qui permet de les rendre stables et donc « inoffensifs », et par conséquent de protéger les molécules voisines qui seraient sensibles à l'oxydation.

Bien que les mécanismes d'action des antioxydants soient variés, il existe deux grands types d'antioxydants : les antioxydants primaires, ou « *chain breaking* », et les antioxydants secondaires ou préventifs^{31,33}. Les antioxydants primaires agissent au niveau de la propagation en interrompant les réactions en chaîne provoquées par les espèces radicalaires, c'est pourquoi on les appelle également antioxydants

antiradicalaires. Ainsi, ils s'oxydent en lieu et place des acides gras, et se stabilisent sous une forme non-radicalaire (**Figure 7**). Ces antioxydants sont tous des molécules possédant une fonction hydroxy X-H avec un hydrogène H labile. On retrouve par exemple dans cette catégorie les antioxydants synthétiques les plus connus tels que le BHT (Butyl hydroxytoluène), le BHA (Butyl hydroxyanisole), la TBHQ (Tert-Butylhydroquinone) ou encore les esters de l'acide gallique, également appelés gallates, dont le plus connu est le gallate de propyle.

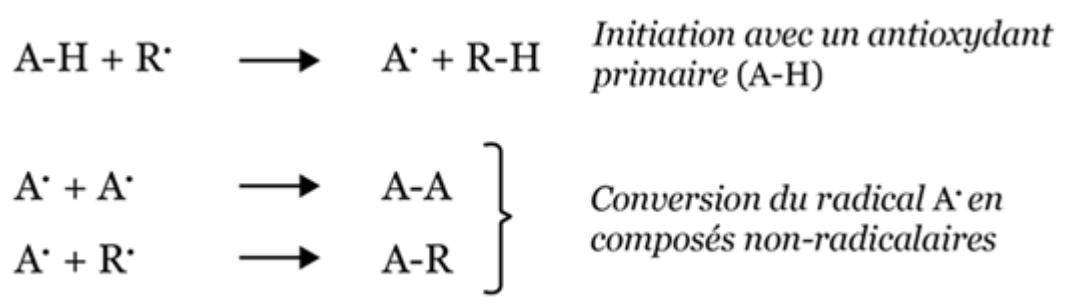


Figure 7 : Mécanisme d'action d'un antioxydant primaire

Les antioxydants secondaires, quant à eux, s'opposent à l'oxydation des lipides dès l'initiation, et plus particulièrement à la formation des espèces radicalaires initiatrices de la peroxydation lipidique. Ils agissent en synergie avec les antioxydants primaires, ce qui permet de prolonger la durée de vie de ces derniers. C'est le cas notamment de l'acide ascorbique ou vitamine C ou du palmitate d'ascorbyle, forme liposoluble de la vitamine C, qui agissent comme séquestrants d'oxygène.

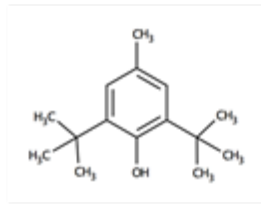
Il existe également des antioxydants secondaires chélateurs de métaux, permettant le piégeage des métaux prooxydants comme le fer ou le cuivre, par exemple l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique), l'acide citrique, l'acide phytique ou encore le gluconate de sodium. Ces chélateurs, en fixant les cations métalliques libres pour créer des complexes stables, empêchent les ions métalliques de se fixer sur les ingrédients sensibles et de provoquer leur oxydation. Leur action est donc indirecte, mais permet de compléter l'activité des autres agents antioxydants présents. Il existe également des antioxydants secondaires à rôle spécifique, permettant une action sur l'oxygène. Les carotènes, par exemple, possèdent la capacité de piéger l'oxygène singulet intervenant dans le cas d'une oxydation induite par la lumière et joue ainsi un rôle protecteur en présence de rayons ultra-violets.

Les antioxydants les plus courants parmi ces deux types d'antioxydants sont présentés dans la **Figure 8**.

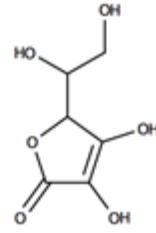
Souvent, les antioxydants sont associés dans les formules cosmétiques afin de maximiser l'effet synergique et de prolonger au maximum la durée de vie du produit. Il est important de considérer différents paramètres tels que leur présentation (liquide, poudre), leur solubilité (hydrosolubilité ou liposolubilité) ou leur stabilité thermique afin d'assurer une intégrité et une homogénéité parfaite de tous types de formulations.

Au niveau réglementaire, il n'existe pas de données spécifiques aux antioxydants en cosmétique. Ils sont pourtant nombreux, et d'origine synthétique, ou naturelle. Les industriels se basent alors souvent sur la réglementation agro-alimentaire, notamment en raison de l'existence de concentrations maximales d'utilisation pour les antioxydants synthétiques tels le BHA, le BHT et les gallates, et d'une recommandation *quantum satis* (« en quantité suffisante ») pour d'autres antioxydants tels que les tocophérols, l'acide ascorbique ou encore l'acide citrique.

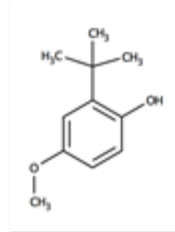
Une bonne connaissance des matières premières incorporées aux formulations cosmétiques est alors indispensable pour adapter l'antioxydant qui sera éventuellement incorporé et sa concentration, qui est généralement de l'ordre de 0,02 à 0,05 %³⁴.



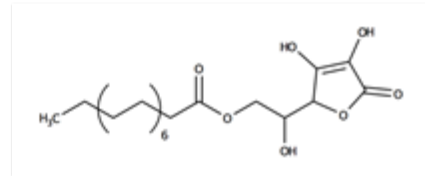
Butyl Hydroxytoluène
(*BHT*)
128-37-0



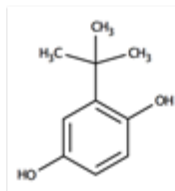
Acide ascorbique
(*Ascorbic acid*)
50-81-7



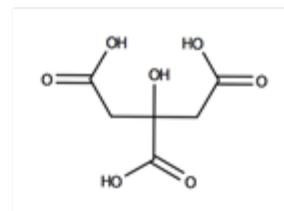
Butyl Hydroxyanisole
(*BHA*)
25013-16-5



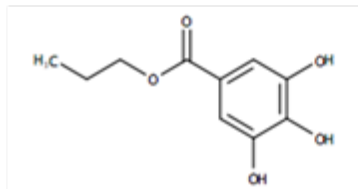
Palmitate d'ascorbyle
(*Ascorbyl palmitate*)
137-66-6



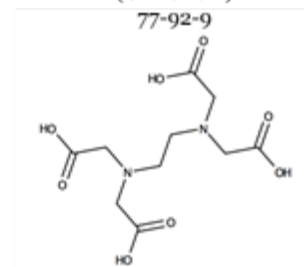
Tert-Butylhydroquinone
(*TBHQ*)
1948-33-0



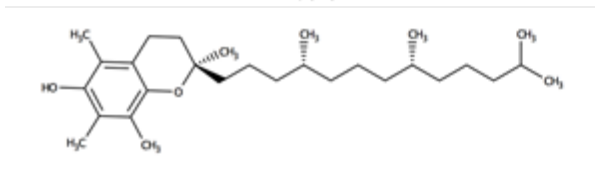
Acide citrique
(*Citric acid*)
77-92-9



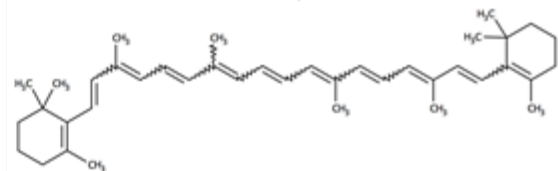
Gallate de propyle
(*Propyl gallate*)
121-79-9



Ethylène diamine tétra-acétate
(*EDTA*)
60-00-4



Tocophérol (vitamine E)
(*Tocopherol*)
10191-41-0



B-carotène
(*beta-Carotene*)
7235-40-7

Figure 8 : Exemples d'antioxydants couramment utilisés en cosmétique

Nom de la molécule
(*Dénomination INCI*)
Numéro CAS

De plus, outre l'utilisation d'agents antioxydants, une application rigoureuse des bonnes pratiques de fabrication permet également de contribuer à l'allongement de la durée de vie des produits cosmétiques. Il est ainsi essentiel pour les fabricants de garantir un environnement pauvre en oxygène, à température contrôlée, à l'abri de la lumière. Au niveau de la formulation des produits, il est également judicieux de veiller à limiter la présence de pigments comme la chlorophylle issue d'extraits végétaux, ou d'enzymes comme la lipase. Enfin, pour limiter l'action des catalyseurs exogènes, notamment métalliques, des précautions sont à apporter au niveau du conditionnement : par exemple, les fabricants doivent veiller à limiter l'utilisation de métaux pro-oxydants comme le cuivre ou le fer, ou à protéger les produits de tout contact avec ces métaux.

1.3.3. Les controverses liées aux antioxydants de synthèse

Les antioxydants de synthèse sont souvent préférés à leurs alternatives naturelles en raison de leur moindre coût et de leur facilité d'utilisation. Néanmoins, la question de leur innocuité, tout comme celle des conservateurs antimicrobiens de synthèse, est régulièrement soulevée par de nombreuses études scientifiques. Le BHA, par exemple, figure dans un rapport publié par le programme national de toxicologie (*National Toxicology Program*) des Etats-Unis et y est répertorié comme substance potentiellement cancérigène³⁵. Le centre international de recherche contre le cancer classe également le BHA comme étant potentiellement cancérigène, et le BHT comme substance dont l'innocuité ne peut être démontrée³⁴. Par ailleurs, le BHA a fait l'objet d'études lui attribuant des effets endocriniens³⁶. La TBHQ est étroitement liée au BHA puisqu'elle est métabolisée en BHA. Enfin, le BHA, le BHT et les gallates seraient également responsables d'allergies cutanées. De plus, il est à noter que l'utilisation du BHA est interdite dans les parfums³⁴.

En résumé, les agents synthétiques incorporés dans les produits cosmétiques, qu'ils soient à visée antimicrobienne ou antioxydante, suscitent de vives polémiques car leurs effets à long terme et surtout à forte concentration sur l'organisme humain sont peu ou pas du tout connus. Les fabricants se tournent de plus en plus vers des alternatives. Quelles sont-elles, et quels sont leurs avantages et leurs inconvénients ?

1.4. *Les alternatives naturelles aux conservateurs synthétiques*

Dans l'optique de rassurer le consommateur, souvent dubitatif face à la composition rarement transparente des produits cosmétiques, les fabricants ont recours à des ingrédients d'origine naturelle, qui peuvent être de différents types. Il peut s'agir par exemple d'extraits végétaux (huiles essentielles ou extraits obtenus par solvants) à la composition complexe, ou encore de composés purs.

1.4.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent leur propre norme AFNOR (NF ISO 4720) depuis octobre 2009, dans laquelle leur nomenclature est clairement définie. Il s'agit plus particulièrement d'une « *liste des noms botaniques de plantes utilisées pour la production des huiles essentielles, avec les noms communs des huiles essentielles en anglais et en français* »³⁷.

Les huiles essentielles sont des extraits obtenus par hydrodistillation ou entraînement à la vapeur d'eau, à partir d'organes végétaux (par exemple les feuilles, les graines, les racines, les fleurs ou encore les fruits), mécaniquement par expression dans le cas de péricarpes de fruits tels les *Citrus*, ou encore par distillation sèche (pyrogénéation) dans le cas de matières premières telles les écorces ou le bois (par exemple le cade). Le point commun de toutes ces méthodes est qu'elles ne nécessitent aucune utilisation de solvants ou produits chimiques. Les parties végétales mises en œuvre pour l'obtention des huiles essentielles peuvent être fraîches ou sèches. L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau sont des méthodes ancestrales et aujourd'hui encore les plus courantes, en particulier au niveau industriel. Des procédés plus modernes tels que la distillation sous vide, la turbodistillation, la distillation continue ou encore la distillation assistée par micro-ondes ont également vu le jour.

En-dehors de celles obtenues par expression, les huiles essentielles sont constituées de substances volatiles, souvent odorantes, dont certaines sont connues pour leur fort potentiel allergène. Une liste initialement constituée de 26 substances considérées comme potentiellement allergènes, établie en 1999, a été publiée dans le 7^{ème} amendement de la directive cosmétique (76/768/CEE), sous le numéro

2003/15/CE. Ainsi, depuis 2005, ces 26 substances possédant notamment des propriétés parfumantes ou aromatisantes, dont seize sont potentiellement présentes à l'état naturel et peuvent donc se retrouver dans les huiles essentielles, doivent figurer dans la liste des ingrédients cosmétiques dès que leur concentration est supérieure à 0,001 % dans les produits non rincés (par exemple les crèmes), et 0,01 % dans les produits rincés (par exemple les shampooings)³⁸. Cette liste, qui a depuis été révisée par le Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs (CSSC), contient aujourd'hui 82 substances considérées comme « allergènes de contact établis chez les humains » et pourrait provoquer un durcissement de la réglementation concernant les allergènes dans les prochains temps.

De telles données accompagnées de recommandations précises permettent aux fabricants d'indiquer les allergènes connus de manière transparente et aux consommateurs de s'y retrouver. Malgré un pouvoir allergisant connu, les huiles essentielles sont souvent utilisées comme alternatives aux agents antimicrobiens ou antioxydants de synthèse, seules ou en mélange, puisque de très nombreuses études confirment leur efficacité antimicrobienne et antioxydante.

1.4.2. Les extraits naturels obtenus à l'aide de solvants

D'autres extraits naturels peuvent être obtenus à l'aide de solvants aqueux ou organiques. Le principe de base pour l'obtention d'un extrait végétal est une extraction solide/liquide. Au contact d'un solvant ou d'un mélange de solvants, les constituants solubles sont séparés de la partie végétale (feuilles, branches, racines, plante entière...), entière ou broyée. L'extrait obtenu est ensuite généralement filtré, puis concentré sous vide afin d'obtenir un extrait brut, souvent de couleur foncée et de texture pâteuse. De nombreux paramètres peuvent être définis et ajustés dans la méthode d'extraction choisie, comme par exemple la durée d'extraction, la température d'extraction, le recours à une agitation mécanique ou magnétique, mais les techniques d'extraction peuvent également faire appel à des technologies d'assistance plus modernes telles que la mise en œuvre d'une haute pression, ou encore l'application d'ultrasons ou l'extraction par micro-ondes.

En phytochimie et en chimie analytique, les recherches se basant souvent sur des utilisations ancestrales et des savoirs populaires tenant compte de la dimension ethnopharmacologique, l'objectif est très souvent de maintenir ces traditions, et d'améliorer les procédés existants en obtenant de meilleurs rendements, avec une extraction optimisée en termes de temps, de coût et d'empreinte environnementale. Des outils très sophistiqués comme l'extraction au dioxyde de carbone supercritique ou à l'eau subcritique ont été développés, permettant, dans des conditions spécifiques de température et de pression, d'obtenir de très bons résultats en limitant l'utilisation de solvants souvent polluants, et de s'inscrire ainsi dans une optique de chimie durable.

1.4.3. Les huiles végétales

Les huiles végétales sont un autre type d'extraits très fréquemment utilisés dans les produits cosmétiques, dès lors que ces derniers sont constitués d'une phase huileuse. Elles peuvent être incorporées en tant que simple support de formulation, mais souvent, elles constituent des actifs à part entière. En effet, traditionnellement obtenues grâce à la pression mécanique de graines ou de fruits oléagineux, elles sont constituées d'acides gras et sont donc plus ou moins sensibles à l'oxydation en fonction de la nature de ces acides gras. Leur qualité est également directement influencée par le procédé de pression. Ainsi, une huile de qualité vierge est issue d'une pression dite « à froid », réalisée à température ambiante. En revanche, afin d'obtenir un meilleur rendement au niveau industriel, les huiles sont souvent obtenues par pression sous chauffage, ce qui implique un raffinement ultérieur afin de les débarrasser de leurs impuretés et les rendre commercialisables, parfois au détriment de leur qualité.

1.4.4. Intérêt des alternatives issues du monde végétal

Le monde végétal constitue une source inépuisable de ressources naturelles grâce au métabolisme secondaire permettant aux végétaux de synthétiser des métabolites leur assurant la survie et leur permettant une adaptation à leur environnement. Cela se traduit par exemple par la production de pigments conférant une couleur aux pétales afin d'attirer les insectes et oiseaux pollinisateurs, ou de toxines permettant

d'éloigner les prédateurs. Cette richesse métabolique connaît des applications dans tous les domaines, de la médecine à la cosmétique en passant par l'industrie textile.

D'abord empiriques, les savoirs populaires trouvent, de plus en plus, une explication rationnelle grâce aux études ethnopharmacologiques et phytochimiques. Le ginseng (*Panax ginseng*), par exemple, est une racine utilisée depuis des siècles pour le bien-être et tonus général. Des études ont confirmé son pouvoir adaptogène, permettant à l'organisme humain une meilleure résistance au stress, grâce à la présence de ginsénosides. Ainsi, des remèdes à de très nombreux maux peuvent être trouvés dans la nature. Cela vaut également pour des maladies plus graves, puisque de nombreux anticancéreux ont été identifiés dans des ressources naturelles.

En 2007, 60% des anticancéreux utilisés étaient d'origine naturelle³⁹. La pervenche de Madagascar, *Catharantus roseus*, pour ne citer qu'elle, produit des métabolites secondaires de la famille des alcaloïdes, dont la vinblastine et la vincristine, qui, bien que présentes en faible quantité dans leur plante d'origine, ont donné lieu à deux anticancéreux majeurs dans le traitement des lymphomes et leucémies. Elles sont aujourd'hui obtenues par hémisynthèse à partir d'autres alcaloïdes à la structure moins complexe qui sont également leurs précurseurs naturels, présents en plus grandes quantités dans la plante : la catharantine et la vindoline. Un analogue synthétique de la vinblastine, la vinorelbine, a également été développé à partir de ces deux précurseurs et est utilisé dans le traitement du cancer du sein et du cancer du poumon à petites cellules.

De la même façon, pour se défendre contre les agents pathogènes rencontrés dans leur environnement, ou en réponse au stress oxydatif provoqué par la lumière du soleil et l'oxygène de l'air, les végétaux sont capables de produire des composés naturellement antimicrobiens et/ou antioxydants. Les molécules responsables de ces propriétés agissent souvent de manière synergique et peuvent se retrouver soit dans les huiles essentielles, lorsque la plante en produit (composés volatils), ou dans d'autres parties de plantes, lorsque ce sont des composés non volatils.

Parmi les familles de molécules responsables des activités antimicrobienne et antioxydante, on retrouve notamment les polyphénols (flavonoïdes, flavanols, stilbènes), les terpénoïdes (caroténoïdes, stérols)⁴⁰.

Souvent, des mélanges d'extraits de plantes sont incorporés dans les produits cosmétiques afin d'assurer une activité antimicrobienne ou antioxydante suffisante. Certains composés sont également commercialisés sous leur forme pure, par exemple l'acide rosmarinique, le resvératrol, le tocophérol ou l'acide benzoïque, et sont directement ajoutés aux formules. Le choix de l'extrait ou du composé actif incorporé joue un rôle déterminant. Il est en effet essentiel de déterminer et confirmer leur activité en tenant compte de la stabilité des composés actifs et des possibles interactions (synergiques ou antagonistes) entre les différents composés, notamment dans le cas d'extraits, dont la complexité implique que de nombreux composés ne participent pas à l'activité recherchée et peuvent ainsi limiter l'effet initialement recherché⁴⁰.

Il n'existe pas de réglementation concernant l'utilisation d'alternatives naturelles pour assurer la conservation des produits cosmétiques. Ne faisant pas partie de la liste positive des conservateurs autorisés, ces solutions alternatives de conservation ne peuvent pas être revendiquées et étiquetées comme telles. Souvent, ce sont les homologues naturels des conservateurs de synthèse autorisés qui sont utilisés, par exemple l'écorce de saule (*Salix alba*) contenant de l'acide salicylique ou encore les baies du sorbier (*Sorbus aucuparia*) contenant de l'acide sorbique.

Concernant les agents antioxydants, on trouve également de nombreuses ressources naturelles contenant des agents antioxydants communément utilisés tels que les carotènes (par exemple le β -carotène présent dans la carotte, *Daucus carota*) ou l'acide ascorbique (présent dans le cynorrhodon, fruit de l'églantier, *Rosa rugosa*)⁴⁰. Quelques exemples de ressources végétales connues pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes ainsi que leurs composés majoritaires ou composés actifs sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Exemples de ressources naturelles aux propriétés antimicrobiennes et antioxydantes

HE : huile essentielle ; E : extrait ; HV : huile végétale

Nom de l'extrait Nom scientifique	Propriétés	Composés majoritaires (HE) Molécules actives (E, HV)	Famille chimique	Référence(s)
Origan (HE) <i>Origanum</i> spp.	Antimicrobiennes	Carvacrol, thymol, γ -terpinène, <i>p</i> -cimène, linalol	Terpénoïdes	2, 41
Thym (HE) <i>Thymus</i> spp.	Antimicrobiennes	Thymol, <i>p</i> -cimène, γ -terpinène, carvacrol, géraniol	Terpénoïdes	2, 41
Cannelle (HE) <i>Cinnamomum</i> spp.	Antimicrobiennes	Aldéhyde cinnamique	Phénylpropanoïdes	2, 41
Clou de girofle (HE) <i>Syzygium aromaticum</i>	Antimicrobiennes	Eugénol	Propénylphénols	2, 41
Thé vert (E) <i>Camellia sinensis</i>	Antioxydantes	Acide gallique, catéchine, épigallocatechine	Polyphénols	2
Romarin (HE) <i>Rosmarinus officinalis</i>	Antioxydantes	1, 8-cinéole, α -pinène, acétate de bornyle, camphre	Terpénoïdes et dérivés Cétones	2, 41
Romarin (E) <i>Rosmarinus officinalis</i>	Antioxydantes	Acide rosmarinique	Polyphénols	2, 41
Curcuma (E) <i>Curcuma longa</i>	Antioxydantes	Curcumine	Polyphénols	2, 40
Germe de blé (HV) <i>Triticum aestivum</i>	Antioxydantes	Tocophérols Acide linoléique, acide linoléique	Tocophérols Acides gras insaturés	2
Tournesol (HV) <i>Helianthus annuus</i>	Antioxydantes	α -tocophérol Acide linoléique	Tocophérols Acides gras insaturés	2

Il est à noter que des ingrédients actifs utilisés pour leurs propriétés anti-vieillessement ou antiseptiques peuvent jouer le double rôle d'actif et de conservateur sans pour autant que ce rôle de conservateur soit revendiqué. Au niveau marketing, de tels produits pourront être étiquetés « sans conservateurs », puisque ceux-ci n'apparaîtront pas de manière explicite dans la liste des ingrédients.

Pour déterminer l'activité antimicrobienne ou antioxydante d'un produit naturel, de nombreuses méthodes existent et certaines parmi les plus importantes sont présentées ci-dessous. De même, il existe des méthodes pour vérifier l'efficacité d'un système conservateur dans les formules cosmétiques, ou la stabilité à l'oxydation des huiles entrant dans la composition d'un produit cosmétique.

1.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de produits naturels et de la conservation des produits cosmétiques

1.5.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne

De manière générale, trois méthodes principales sont mises en œuvre pour l'analyse de l'activité antimicrobienne de produits naturels. Les plus connues sont les méthodes de diffusion et de dilution, mais une troisième méthode dite « bioautographique » est également couramment utilisée⁴².

Toutes ces méthodes sont relativement faciles à mettre en œuvre sur le plan technique. En revanche, elles sont difficiles à uniformiser en raison de l'influence de plusieurs paramètres, notamment la composition du milieu de culture, le pH du milieu ou encore la méthode d'extraction du matériel végétal. Il est très difficile de contrôler la totalité de ces paramètres, c'est pourquoi il n'existe aucune méthode parfaitement standardisée.

Les **méthodes de diffusion** sont mises en œuvre dans un milieu solide : ne nécessitant pas de dispersion homogène dans de l'eau, elles consistent à déposer l'échantillon à étudier sur un disque de papier (méthode de diffusion sur disque), dans un puits d'agar-agar (méthode de diffusion en puits, schéma présenté en **Figure 9**), ou encore dans un cylindre en inox ou porcelaine (méthode de diffusion en cylindre), à le mettre en contact avec un milieu de culture dans lequel a été inoculé

une certaine quantité de la souche microbienne dont on souhaite évaluer la sensibilité à l'échantillon testé, et à mesurer le diamètre d'inhibition, par l'échantillon, de cette souche microbienne après incubation. Ainsi, plus l'activité antimicrobienne exercée par l'échantillon en question est importante, plus le diamètre d'inhibition est lui aussi important. Cette technique a été initialement développée pour quantifier les substances antibiotiques dans des extraits bruts, en revanche elle s'avère peu fiable pour les échantillons difficilement solubles dans le milieu de diffusion, d'autant plus qu'il n'existe pas de relation entre le pouvoir de diffusion et l'activité antimicrobienne des échantillons.

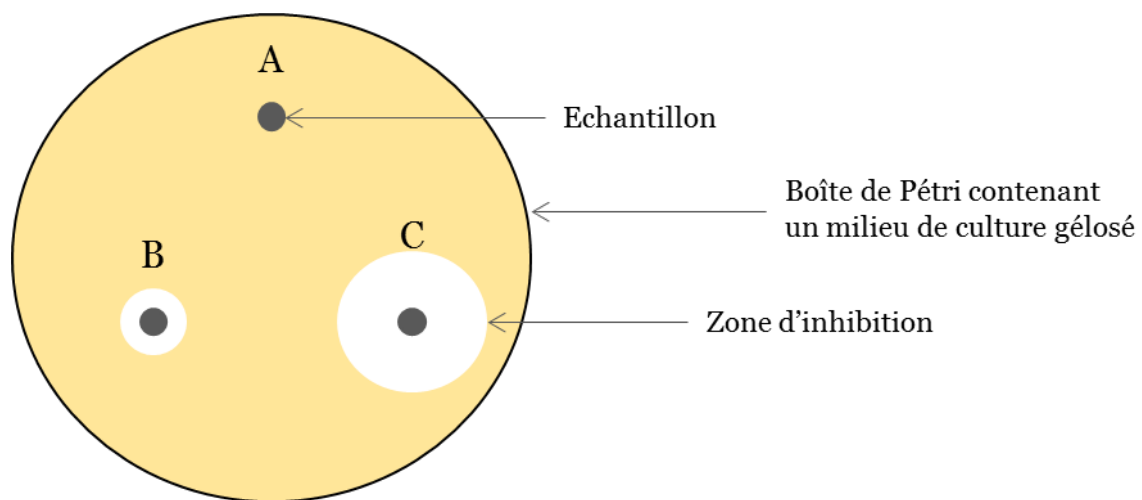


Figure 9 : Schéma d'un test d'activité antimicrobienne par diffusion en puits.
Exemple de 3 échantillons à activité nulle (A), modérée (B) ou forte (C).

Dans les **méthodes de dilution**, l'échantillon à analyser est solubilisé ou dispersé de manière homogène dans un solvant adéquat, dans l'objectif de déterminer sa concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis d'une souche microbienne. Une quantité connue de micro-organismes est inoculée dans le milieu et c'est la mesure de la turbidité de la solution par spectrophotométrie après incubation qui sera indicatrice de l'activité antimicrobienne de l'échantillon. Ce principe, beaucoup plus précis et permettant une meilleure comparabilité des échantillons analysés en raison de leur solubilisation homogène, est généralement mis en œuvre dans le criblage préliminaire d'activité antimicrobienne d'extraits naturels. Il sera présenté de manière plus précise dans le cadre de cette étude.

La troisième méthode dite « **bioautographique** » est également couramment utilisée pour l'analyse de l'activité antimicrobienne : elle permet de combiner l'analyse de l'effet antimicrobien avec des techniques de chromatographie sur couche mince, dites planaires⁴³. La bioautographie peut être réalisée par contact, immersion ou de manière directe. Cette combinaison entre une analyse chimique et une analyse biologique est une entité de l'approche par EDA (*effect-directed analysis*) ou analyse dirigée par l'effet. Cette approche a vu le jour au courant des années 2000 dans le cadre de la recherche de substances organiques toxiques dans des matrices environnementales, et combine des analyses biologiques, des procédés de fractionnement et des méthodes d'analyses chimiques⁴⁴. Le fractionnement peut être réalisé grâce à l'HPTLC, qui permet la séparation de mélanges complexes puis une détection biologique spécifique. Ainsi, l'HPTLC-EDA est utilisée dans des domaines très variés, et trouve par exemple son application en enzymologie dans des tests d'inhibition enzymatique, en immunologie pour la détection de composés spécifiques grâce à l'utilisation d'anticorps couplés à des ligands spécifiques, ou encore en microbiologie pour la détection spécifique d'une activité antimicrobienne l'HPTLC-EDA⁴⁵. Cette méthode a également été mise en œuvre dans le cadre de cette étude.

1.5.2. Évaluation de l'activité antioxydante de produits naturels

Il existe de très nombreuses techniques pour évaluer l'activité antioxydante de substances ou d'extraits naturels. Étant donné la multitude de mécanismes d'oxydation et leur complexité, ces méthodes sont très difficiles à standardiser et il n'existe pas de test idéal. Afin d'avoir une indication précise du potentiel antioxydant d'un échantillon, une possibilité est de combiner plusieurs méthodes.

Les méthodes les plus connues ainsi que leur principe, leurs avantages et leurs inconvénients sont présentés dans le **Tableau 2**. Elles sont basées sur l'utilisation de radicaux libres (TEAC, DPPH, ORAC, TRAP) ou d'ions métalliques (Folin-Ciocalteu, FRAP)³⁴.

Tableau 2 : Exemples de tests d'activité antioxydante – Principe, avantages et inconvénients³⁴

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients	Références
TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) Capacité antioxydante en équivalent Trolox	Mesure colorimétrique du transfert d'électrons d'un antioxydant vers le radical-cation ABTS, exprimée en TEAC.	Méthode simple à mettre en oeuvre, utile en <i>screening</i> et en routine	Interférences antioxydants/radicaux libres possibles, radical ABTS non représentatif car absent des systèmes biologiques	46-49
Test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	Mesure colorimétrique (absorbance à 517 nm) de la capacité réductrice d'un antioxydant en présence du radical libre DPPH, exprimée en IC ₅₀ (concentration nécessaire pour réduire le DPPH de 50%)	Test complet, peu coûteux (DPPH commercial), applicable à des échantillons simples et complexes et à d'autres techniques (bioautographie par exemple)	Interférences possible, relativement sélectif (polyphénols essentiellement), relativement long (20 min – 6h)	46,50
Indice ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) Capacité d'absorption des radicaux oxygénés	Mesure d'inhibition des radicaux hydroxyles formés par le générateur hydrophile AAPH, grâce à la décroissance de fluorescence de la fluorescéine. Expression en TEAC (comparaison avec Trolox en parallèle)	Méthode standardisée et communément acceptée	Méthode relativement coûteuse (équipement cher), longue et sensible au pH	49
Indice TRAP (Total Radical trapping Antioxidant Parameter) Pouvoir antioxydant total	Mesure de l'oxygène consommé lors d'une peroxydation lipidique. Décomposition thermique de l'AAPH en présence d'un indicateur de fluorescence. Valeur TRAP exprimée par comparaison avec le Trolox.	Méthode simple, reproductible et sensible	Interférences entre antioxydants et indicateurs fluorescents, période de latence	46
Indice FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	Test de la réduction du fer : mesure de la réduction d'un complexe ferrique en Fe ²⁺ par l'antioxydant (mesure d'absorbance à 594 nm).	Test rapide, peu coûteux, répétable, applicable aux solutions biologiques et aux antioxydants purs	Fiabilité moyenne selon le potentiel redox des composés testés, pH bas parfois incompatible	46,51
Indice de Folin-Ciocalteu Dosage des phénols totaux	Mesure des polyphénols totaux (exprimés en équivalent acide gallique) et de la capacité réductrice d'un échantillon grâce au réactif de Folin-Ciocalteu. Absorbance à 720 nm proportionnelle au taux de composés phénoliques.	Méthode simple et sensible, reproductible	Interférences possibles car réactif non spécifique, non applicable aux composés et matrices lipophiles	46,52

Les résultats des tests d'activité antimicrobienne ou antioxydante effectués sur des ingrédients cosmétiques tels qu'un extrait naturel ne peuvent pas être transposés à des formulations cosmétiques puisqu'il est essentiel de tenir compte de l'environnement et de la matrice dans lesquels ils se trouveront une fois formulés.

1.6. *Évaluation de l'efficacité d'un système de conservation cosmétique*

Il est essentiel d'évaluer l'efficacité du système conservateur mis en œuvre dans les produits formulés. De plus, avant la mise sur le marché de toute formulation cosmétique, la réglementation européenne impose aux fabricants de démontrer l'efficacité du système conservateur incorporé dans le produit.

Au niveau antimicrobien, le risque microbiologique doit tout d'abord être apprécié selon la norme NF EN ISO 29621:2017⁵³. Les produits identifiés comme étant à faible risque microbiologique suite à l'application de cette norme ne nécessitent pas d'essais microbiologiques. En revanche, les produits identifiés comme présentant un risque microbiologique doivent être évalués selon la norme NF EN ISO 11930:2012, qui décrit précisément la procédure à suivre pour l'évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique⁵⁴. Les tests alors réalisés sont appelés « challenge-tests » et permettent de déterminer la durée de vie d'un produit cosmétique. Ces challenge-tests sont également décrits dans la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur. 5.1.3. *Efficacy of antimicrobial preservation*, efficacité de la conservation antimicrobienne) et américaine (USP <51> *Antimicrobial Effectiveness Testing*, évaluation de l'efficacité antimicrobienne) et consistent à contaminer artificiellement le produit cosmétique avec des micro-organismes que l'on retrouve habituellement dans les cosmétiques ou au niveau de l'épiderme (notamment *S. aureus*, *A. brasiliensis*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*), en nombre connu. Un suivi de l'évolution de la population microbienne est réalisé après 7, 14 et 28 jours et exprimé en réduction logarithmique, afin de déterminer si les critères d'acceptation du challenge-test sont remplis ou non.

Il existe également des méthodes pour vérifier l'efficacité d'un antioxydant dans une formulation cosmétique. Par exemple, un test de vieillissement permet d'évaluer le comportement de formules cosmétiques dans des conditions normales de stockage.

En revanche, ce procédé est long et on lui préfère des tests de vieillissement accélérés, plus compatibles avec les contraintes de temps liées au développement d'un produit³⁰. En ce sens, la norme NF EN ISO 6886:2016 décrit un essai d'oxydation accéléré, permettant de déterminer la stabilité à l'oxydation des corps gras incorporés dans une formulation cosmétique et d'établir une comparaison entre les antioxydants qui y sont ajoutés⁵⁵. La méthode Rancimat⁵⁶ en est un parfait exemple, mais il faut noter que les conditions extrêmes, notamment de température, mises en œuvre lors de ce type de tests, sont peu représentatives des conditions normales de stockage des produits cosmétiques.

1.7. *Quelles autres solutions pour la conservation des cosmétiques ?*

Outre l'utilisation de conservateurs de synthèse et leurs alternatives, d'autres méthodes sont utilisées par les fabricants pour prolonger la durée de vie des produits cosmétiques. Parmi les méthodes déjà citées, les produits peuvent contenir un pourcentage d'alcool supérieur ou égal à 20 % (lotions toniques ou après-rasage), ou à l'inverse être anhydres pour limiter au maximum la contamination microbienne.

Par ailleurs, certains produits formulés sans ou à l'aide de très peu de conservateurs doivent impérativement être conservés au réfrigérateur, et ont une durée de vie limitée. Un pH relativement bas (inférieur ou égal à 3) peut également être une solution pour limiter l'utilisation de conservateurs, c'est le cas par exemple des produits contenant des alpha-hydroxyacides de fruits (AHAs), majoritairement issus des *Citrus*, et contenant de l'acide citrique ou malique.

De plus, en fonction de leur activité de l'eau a_w , également appelée « humidité relative d'équilibre » ou encore « eau libre », les produits peuvent également être contrôlés d'un point de vue microbiologique⁵⁷. En effet, ce paramètre correspond à la part d'eau libre dans un produit et va directement influencer l'activité des micro-organismes dans ce produit. Ainsi, une humidité relative d'équilibre de 80 % correspond à une activité de l'eau de 0,8⁵⁸. Selon la norme ISO 29621, les produits possédant une activité de l'eau inférieure ou égale à 0,75 peuvent être considérés comme étant à faible risque microbiologique⁵³. C'est par exemple le cas des pommades pour les lèvres ou des rouges à lèvres.

Au niveau du packaging et du conditionnement des produits cosmétiques, des solutions permettant de renforcer leur conservation existent également. Les produits à usage unique ou ceux ne pouvant être ouverts sont également à l'abri d'une contamination microbienne. Par exemple, les flacons-pompes « airless » permettent de conserver le produit à l'abri de l'oxygène et de délivrer la dose souhaitée sans qu'il n'y ait le moindre contact du produit avec son environnement. Des matériaux constitués de polymères naturellement anti-UV peuvent également être utilisés pour le conditionnement en vue de retarder les phénomènes d'oxydation liés à la lumière³⁴. Cependant, il faut prendre en considération le coût (quantité importante de packaging et/ou packaging sophistiqué) et surtout l'impact environnemental (produits à usage unique) de telles alternatives.

1.8. La cosmétique « bio »

Les produits cosmétiques « bio » sont de plus en plus présents dans les rayons des supermarchés et parfumeries. Qu'est-ce qui définit un produit cosmétique certifié « biologique » ? Dans la plupart des cas, il répond à des critères précis et à un cahier des charges strict en termes de production, de fabrication et de conservation. De nombreux labels se partagent le marché des produits cosmétiques biologiques. Au niveau national, ils sont très nombreux. Citons par exemple Ecocert Greenlife et Cosmébio en France, BDIH en Allemagne, ICEA en Italie ou encore *Soil Association* au Royaume-Uni. Bien que ne représentant que 2,3 % du marché cosmétique mondial selon les données les plus récentes⁵⁹, le marché des cosmétiques biologiques est en développement constant et COSMEBIO évalue la croissance annuelle à 10 % jusqu'en 2019. Au niveau européen, ce marché représente 3,8 % du marché cosmétique global, contre 3 % en France.

Dans une jungle de marques et labels bio, le consommateur peut se retrouver un peu perplexe, ne sachant plus à quel référentiel se fier pour avoir un produit cosmétique biologique de qualité optimale. C'est dans ce contexte que l' AISBL (Association Internationale Sans But Lucratif) COSMOS (*COSMetic Organic Standard*) a été fondée par les cinq labels européens précités, afin d'harmoniser les critères de certification biologique des produits cosmétiques au niveau européen, et le référentiel COSMOS-standard a vu le jour en 2010⁶⁰. Les produits conformes à ce

référentiel peuvent ainsi prétendre à une double certification. Par ailleurs, d'autres organismes certificateurs peuvent être homologués pour certifier eux aussi selon le référentiel COSMOS-standard.

Les critères définis pour répondre aux exigences du référentiel sont décrits dans douze chapitres et concernent aussi bien le *sourcing*, la production, la commercialisation et le contrôle des produits cosmétiques. Une attention particulière est portée à l'utilisation de produits issus de l'agriculture biologique, dans un respect total de la biodiversité, une utilisation responsable des ressources naturelles avec un respect de l'environnement, des procédés de fabrication et de production propres et respectueux de la santé humaine et de l'environnement, et une intégration du concept de chimie verte. En septembre 2016, le label comptait plus de 1700 produits et plus de 1500 ingrédients certifiés en Europe⁶¹. Le label différencie les produits certifiés COSMOS ORGANIC et COSMOS NATURAL, selon leur pourcentage d'ingrédients certifiés biologiques.

Par ailleurs, au niveau international, une autre AISBL a créé en 2008 un autre label de certification biologique des produits cosmétiques du même nom que l'organisation : NATRUE⁶². Ce label, qui compte plus de 160 marques à son actif à travers le monde garantit une composition à 100 % d'origine naturelle des produits, et contenant au minimum 95 % d'ingrédients issus de l'agriculture biologique. En septembre 2016, ce label recensait plus de 4800 produits certifiés à travers le monde, toutes marques et tous pays confondus⁶³.

2. La biodiversité végétale : quels enjeux pour la préserver et quel intérêt dans l'industrie cosmétique ?

Les ressources biologiques offertes par la Terre représentent un patrimoine exceptionnel et sont déterminantes pour l'humanité puisqu'elles contribuent à son développement économique et social. Quels sont les enjeux liés à la conservation de cette richesse naturelle ?

2.1. Introduction à la biodiversité

La biodiversité, ou diversité biologique, représente, selon l'article 2 de la Convention sur la diversité biologique (CBD ou *Convention on Biological Diversity*), la « variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes »⁶⁴. La CBD a été adoptée le 22 mai 1992, et ouverte à la signature le 5 juin 1992, lors du Sommet de la Terre à Rio de Janeiro. Cette conférence mondiale sur l'environnement et le développement, organisée par l'ONU (Organisation des Nations Unies), a permis de réunir 110 chefs d'Etats et de gouvernements et 178 pays. Elle représente une évolution majeure pour le droit international relatif à la biodiversité, puisqu'elle a permis la mise en place de stratégies à l'échelle nationale pour la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité. En effet, la CBD comporte trois objectifs majeurs : préserver la biodiversité, utiliser ses éléments de manière durable, et partager de manière juste et équitable les ressources découlant de l'exploitation des ressources génétiques. Elle est entrée en vigueur le 29 décembre 1993 avec un total de 168 signatures et constitue ainsi un document clé du développement durable⁶⁵.

La dixième conférence des parties (COP 10) de la CBD s'est tenue en octobre 2010 à Nagoya, au Japon. Elle a été cruciale pour l'avenir de la biodiversité puisqu'elle a permis l'adoption du protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation⁶⁶, avec pour objectif de contribuer à la protection et à l'utilisation durable de la biodiversité. Un plan stratégique de préservation de la biodiversité pour 2020 a également été établi.

Celui-ci comporte vingt objectifs répartis en cinq thèmes stratégiques : le traitement des causes sous-jacentes de la perte de biodiversité, la réduction des pressions exercées sur la diversité biologique, l'amélioration de l'état de la biodiversité par des actions de sauvegarde, la mise en valeur des bénéfices de la biodiversité et une mise en œuvre du plan optimisée grâce à une planification participative et une gestion des connaissances et des ressources⁶⁷.

Bien que le concept de biodiversité s'applique aux organismes vivants dans leur globalité, seule la biodiversité végétale sera abordée ici. Les espèces végétales ne sont pas réparties de manière équitable sur la surface de la Terre, et de nombreuses menaces pèsent sur des espèces et écosystèmes parfois fragiles, provoquant parfois leur disparition. Certaines zones ont ainsi éveillé un intérêt tout particulier.

2.2. Les « hotspots » de biodiversité : origine et évolution

Norman Myers, spécialiste mondial de la biodiversité, a introduit en 1988 le terme de *hotspot*, ou « point chaud » de biodiversité, concernant essentiellement les plantes vasculaires, les mieux répertoriées à la fin des années 80⁶⁸. Il a recensé dix zones géographiques dans les forêts tropicales à travers le monde caractérisées d'une part par un très fort endémisme végétal, et d'autre part, un fort degré de menace pesant sur ces espèces. *Conservation International* (CI), une ONG de protection de la nature, a été la première à promouvoir et développer ce concept en l'adoptant comme modèle institutionnel. Elle a immédiatement adopté l'idée de préserver ces zones à la biodiversité exceptionnelle, devenue également un des enjeux principaux du développement durable lors du sommet de la Terre à Rio de Janeiro en 1992. Depuis, CI a réévalué le concept et défini des critères quantitatifs pour désigner les *hotspots* : ceux-ci ne se limitent plus seulement aux forêts tropicales mais à l'ensemble de la biodiversité, doivent posséder plus de 1500 espèces endémiques, et avoir perdu plus de 70 % de leur habitat d'origine. Aujourd'hui, de très nombreuses ONG militent pour que ces zones bénéficient d'actions de conservation prioritaires et CI recensait en 2004 34 *hotspots* mondiaux de biodiversité⁶⁹, avant l'ajout d'un 35^{ème} *hotspot* en 2011⁷⁰ (**Figure 10**).



Figure 10 : Les 35 *hotspots* mondiaux selon *Conservation International*⁷⁰

Ces 35 *hotspots* représentent 17,3 % de la surface terrestre, mais répondent tous aux critères définis par CI. Par ailleurs, le Fonds de Partenariat pour les Ecosystèmes Critiques (CEPF), une initiative de financement soutenue notamment par CI, participe activement à la protection des *hotspots* les plus menacés en finançant des actions sélectionnées au moyen d'appels à projets. Les projets financés doivent viser à protéger la biodiversité et respecter les objectifs définis pour les *hotspots* concernés. Ainsi, plus de 1900 partenaires ont à ce jour été soutenus par le CEPF⁷¹, qui a par ailleurs récemment communiqué la découverte du 36ème *hotspot* sur la plaine côtière nord-américaine⁷².

2.3. Le Bassin méditerranéen : un « *hotspot* » aux ressources exceptionnelles

Selon le CEPF, le Bassin méditerranéen se classe deuxième au niveau mondial par sa taille, puisqu'il s'étend sur environ deux millions de kilomètres carrés et 34 pays : d'Ouest en Est du Portugal à la Jordanie et du Nord au Sud de l'Italie au Cap-Vert. Pas moins de 22 500 espèces végétales y ont été découvertes, dont 11 700 en sont endémiques, ce qui en fait le troisième *hotspot* au niveau mondial en termes de biodiversité⁶⁹.

Cette région étant également très active au niveau culturel, linguistique et socio-économique, l'activité humaine et notamment le tourisme constitue une des principales menaces qui compromettent fortement l'équilibre naturel de cette diversité. En insistant sur la nécessité de maintenir les zones déjà fragilisées à l'état sauvage, et grâce à son partenariat avec les acteurs engagés dans la conservation de la biodiversité et des écosystèmes dans le bassin méditerranéen, le CEPF contribue à stopper les menaces pesant sur cet équilibre en réduisant l'impact de l'activité humaine⁷³.

En raison de l'extinction massive des *espèces*, les stratégies de conservation de la biodiversité du CEPF sont un enjeu crucial pour l'avenir du bassin méditerranéen, qui, bien que ne représentant que 2 % de la surface du globe, abrite à lui seul 20 % de la biodiversité végétale mondiale. Le département des Alpes-Maritimes, par exemple, répertorie à lui seul près de 2300 espèces, soit environ 60 % de la flore de France métropolitaine et près de 30 % de la flore européenne. La situation géographique du département, entre mer et montagne, lui confère un relief irrégulier, des conditions climatiques variables, des sols très diversifiés, et explique cette richesse floristique exceptionnelle⁷⁴.

Connaissant l'immense potentiel végétal à valoriser dans la région méditerranéenne et les enjeux cosmétiques, l'idée de mettre en valeur le patrimoine végétal régional d'une part, et de le mettre à profit de l'industrie cosmétique d'autre part, a germé. De cette idée est né un projet collaboratif : le projet NATUBAVAL.

3. Le projet « NATUBAVAL »

3.1. La genèse du projet

C'est dans un contexte global de méfiance de la part des consommateurs vis-à-vis de l'utilisation de produits chimiques dans les produits cosmétiques, de conscience de la part des industriels de la nécessité de proposer des alternatives naturelles, évaluées comme plus « sûres », et de l'importance de la préservation de la biodiversité végétale qu'est née l'idée du projet NATUBAVAL. Celle-ci a germé au sein de la société SOFIA Cosmétiques (Société Française d'Ingénierie Appliquée aux Cosmétiques), spécialisée dans l'élaboration, le développement, la fabrication à façon et le conditionnement de produits cosmétiques, qui s'est heurtée, comme de nombreux fabricants cosmétiques, au refus de l'utilisation par les consommateurs de produits cosmétiques contenant des parabènes en guise de conservateurs. Son président directeur général a alors réuni une équipe afin de donner forme à cette idée et aboutir à la naissance d'un projet de valorisation du patrimoine végétal à travers la recherche et le développement de nouveaux ingrédients naturels valorisables en tant que conservateurs, l'idée a pu prendre forme et conduire à la signature d'un accord de consortium entre différents acteurs issus directement de la filière cosmétique ou végétale, ou indirectement en y participant.

3.2. Les objectifs, acteurs et partenaires du projet

Le projet s'est tout d'abord articulé autour de sept grandes étapes afin de lui donner une certaine structure et surtout un point de départ et des objectifs précis permettant d'évaluer sa progression :

§ La présélection d'une cinquantaine d'espèces végétales

Cette étape préliminaire a été définie dans le but de donner un certain cadre au projet et de délimiter son étendue, l'objectif étant d'aboutir à une présélection d'espèces sur la base de recherches bibliographiques et de leurs utilisations traditionnelles. Les plantes ainsi sélectionnées doivent constituer une base de travail et donner un point de départ au projet.

§ L'extraction de ces plantes ou d'une partie d'entre elles à l'aide de méthodes respectueuses de l'environnement

L'objectif de cette étape est de réaliser des extraits dans des conditions définies et surtout éco-compatibles, afin de réaliser une empreinte phytochimique des plantes étudiées dans le cadre du projet.

§ L'étude des propriétés conservatrices des extraits obtenus

Cette étape consiste en un criblage des extraits disponibles, et plus particulièrement en l'évaluation de leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, sur des cibles définies et avec des méthodes précises.

§ La purification des extraits prometteurs et la confirmation de leur activité

L'objectif de l'étape précédente étant de trouver des extraits aux propriétés antimicrobiennes et antioxydantes prometteuses, cette étape doit permettre de confirmer ces activités en purifiant les extraits d'intérêt et en soumettant des fractions de ces extraits aux mêmes tests d'activité.

§ L'évaluation en situation galénique des extraits d'intérêt

Les extraits d'intérêt doivent être évalués en situation galénique, c'est-à-dire dans des formules types afin de projeter leur éventuelle activité au sein d'un produit cosmétique.

§ La fabrication de lots pilotes des actifs ayant passé les tests galéniques avec succès

Les extraits d'intérêt ayant fait leurs preuves en situation galénique doivent ensuite être évalués dans des produits cosmétiques « tests » (pilotes) afin d'être soumis à l'évaluation de clients et de confirmer la faisabilité au niveau industriel du projet.

§ La fabrication industrielle et la mise sur le marché des actifs validés

Si les fabrications pilotes rencontrent le succès attendu, un développement industriel peut être envisagé tout comme la mise sur le marché du ou des actifs découvert(s) et validés dans le cadre du projet.

Ces étapes ont ensuite été réparties entre les différents acteurs et membres du consortium, tout en sachant qu'une évolution serait possible selon les résultats obtenus, les éventuels succès ou difficultés rencontrées. La durée initiale du projet a été fixée à trois ans, avec un lancement officiel au début de l'année 2011.

Les principaux acteurs du projet sont au nombre de cinq, à savoir les signataires de l'accord de consortium NATUBAVAL, qui se situent tous dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur :

- § L'Institut de Chimie de Nice, laboratoire de recherche de l'Université Nice Sophia Antipolis associé au CNRS (ICN UMR 7272 CNRS), situé à Nice (Alpes-Maritimes), et plus particulièrement le groupe MVBV (Métabolome et Valorisation de la Biodiversité Végétale) de l'équipe « Arômes – Parfums – Synthèse – Modélisation »
- § SOFIA Cosmétiques, sous-traitant en cosmétologie situé à Carros (Alpes-Maritimes)
- § Naturex, groupe international spécialisé dans l'extraction végétale et le développement des ingrédients naturels, dont le siège est situé à Avignon (Vaucluse)
- § La société Acphytaroma, spécialisée dans l'ingénierie de distillation et d'extraction de matières premières végétales et située à Cabris (Alpes-Maritimes)
- § La société Zea Mais Consultancy, spécialisée dans le consulting en matière de ressources naturelles, située à Montauroux (Var)

Le projet NATUBAVAL a été soumis en 2009 à l'APRF (Appel à Projets Recherche Finalisée), dispositif mis en place par le Conseil Régional PACA⁷⁵ permettant le financement de projets collaboratifs innovants portés par des acteurs régionaux et labellisés par des PRIDES (Pôles Régionaux d'Innovation et de Développement Economique Solidaire). Labellisé par le pôle de compétitivité PASS (Parfums Arômes Senteurs Saveurs)⁷⁶, le projet a été retenu par le Conseil Régional et son financement a été possible grâce au soutien de la région PACA et de l'Union Européenne via le

FEDER (Fonds Européen de Développement Economique et Régional) sous le numéro 2009_26268/2010_07953.

Pour mener à bien ce projet, les principaux acteurs de NATUBAVAL ont pu compter sur l'aide précieuse de partenaires industriels, associatifs ou universitaires, ainsi que sur les services de prestataires grâce auxquels diverses étapes du projet ont pu être facilitées.

3.3. Les objectifs des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse et présentés ici reposent sur les quatre premières étapes décrites dans le projet NATUBAVAL. L'objectif des travaux réalisés à l'Institut de Chimie était de réaliser l'analyse phytochimique des extraits végétaux obtenus à partir des espèces végétales d'intérêt, la purification des extraits présentant des propriétés conservatrices intéressantes et l'identification des éventuels actifs.

La première partie de ces travaux (**Chapitre II**) a tout d'abord consisté en une analyse phytochimique et une évaluation d'activité biologique des extraits issus des plantes préselectionnées. Cela a permis l'identification d'extraits d'intérêt, qui ont été purifiés afin de découvrir les fractions actives. Ces recherches ont abouti à l'identification d'un actif issu d'un extrait dont les résultats étaient particulièrement prometteurs.

La seconde partie de ces travaux (**Chapitre III**) a alors consisté à optimiser l'extrait d'intérêt afin de lui conférer les caractéristiques recherchées pour qu'il soit incorporable dans une formule cosmétique et reproductible à l'échelle industrielle, le tout en conservant son activité d'intérêt.

Une dernière partie (**Chapitre IV**) a consisté en l'évaluation d'une alternative au développement d'un ingrédient cosmétique conservateur constitué d'un seul extrait, à savoir des mélanges d'extraits, afin d'identifier d'éventuelles interactions entre différents extraits.

L'ensemble des démarches expérimentales mises en œuvre est présenté dans la **Partie Expérimentale**.

Notons que les résultats présentés dans ce travail de thèse sont le fruit des recherches effectuées à l'Institut de Chimie de Nice, ou ses partenaires, et qu'ils se limitent à l'aspect analytique sans aborder les aspects de formulation cosmétique. Ceux-ci ont été étudiés dans le cadre d'une collaboration entre l'ICN et la société SOFIA Cosmétiques et sont consultables indépendamment de ce travail⁷⁷.

Globalement, l'objectif principal de cette thèse est de démontrer le réel intérêt de la valorisation du patrimoine végétal de la région méditerranéenne, en particulier de la région PACA, dans l'industrie cosmétique, et de présenter la stratégie adoptée afin de développer un nouvel ingrédient naturel exploitable en tant que conservateur à l'échelle industrielle.

CHAPITRE II

RECHERCHE DE NOUVEAUX EXTRAITS NATURELS AUX PROPRIÉTÉS CONSERVATRICES

C'est grâce à la volonté de ses acteurs de valoriser le patrimoine végétal méditerranéen et de proposer de nouvelles alternatives naturelles aux conservateurs cosmétiques de synthèse que le projet NATUBAVAL a vu le jour. Ce chapitre présente et discute la stratégie mise en œuvre et les résultats obtenus durant la première phase du projet, de la présélection des espèces végétales ayant fait l'objet de cette étude à la sélection des extraits d'intérêt potentiellement candidats pour la phase suivante, en passant par leur extraction, leur analyse phytochimique et l'évaluation de leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes.

1. Présélection des espèces végétales d'intérêt

Les espèces végétales mises en œuvre dans cette étude sont toutes issues du bassin méditerranéen, conformément à la volonté initiale du projet qui était de valoriser le patrimoine végétal de la région PACA. L'accès privilégié à des bases de données répertoriant plusieurs milliers de plantes localisées notamment dans la région méditerranéenne française et s'étendant du littoral à l'arrière-pays a permis de mettre en relation les connaissances botaniques avec les savoirs traditionnels et populaires relatifs à cette flore. Les données ethnobotaniques et bibliographiques ont ainsi permis la présélection d'environ deux cent espèces végétales.

Cette présélection a été réalisée par Francis Hadji-Minaglou, pharmacien à Grasse (06) et spécialisé en herboristerie et ethnobotanique, qui a mis à profit du projet NATUBAVAL ses connaissances liées à l'utilisation traditionnelle des espèces végétales. En effet, les médecines traditionnelles sont un des aspects majeurs auxquels s'intéresse l'ethnopharmacologie, discipline qui se définit comme une *étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale, et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, mises en œuvre par les cultures traditionnelles pour modifier l'état des organismes vivants, à des fins thérapeutiques, curatives, préventives ou diagnostiques*⁷⁸. Les savoirs thérapeutiques et remèdes traditionnels constituent un véritable pilier pour la phytochimie et un point de départ pour de très nombreuses études scientifiques⁷⁹. Les plantes connues pour une utilisation traditionnelle justifiée par des vertus antimicrobiennes et/ou antioxydantes ont ainsi été identifiées comme étant de potentiels candidats pour le projet NATUBAVAL.

Par ailleurs, de nombreuses plantes méditerranéennes étant déjà connues pour de telles propriétés et ayant déjà fait l'objet d'études poussées, l'objectif a été de se concentrer sur des plantes potentiellement intéressantes d'un point de vue ethnopharmacologique, mais dont l'activité antimicrobienne et/ou antioxydante n'avait pas encore été explicitement décrite, et les molécules responsables de cette activité, pas encore identifiées comme étant directement responsables de cette activité. L'intérêt de cette approche se trouve également dans la possibilité de mettre en relation les activités mises en évidence lors de l'utilisation traditionnelle des plantes et leur composition chimique.

Une analyse bibliographique et la disponibilité saisonnière des plantes ont alors orienté le choix des espèces candidates pour la première phase du projet NATUBAVAL. Parmi une liste d'environ 200 espèces végétales, ce sont ainsi dix-sept plantes qui ont été sélectionnées (**Tableau 3**). Tous les prélèvements initiaux ont été effectués entre le printemps 2010 et l'automne 2011, par Jean-Pierre Ghérardi (Biophyto) ou Claude Monin (Acphytaroma), sur au moins huit sites différents, tous situés dans le département des Alpes-Maritimes, et soumis à des botanistes pour identification.

2. Extraction des matières premières végétales

Les paramètres d'extraction du matériel végétal ont été définis de manière à être simples à mettre en œuvre et reproductibles pour cette première étape de criblage. En vue des dernières étapes du projet, l'objectif a également été d'avoir un protocole transposable au niveau industriel, le tout dans un souci environnemental en privilégiant l'utilisation de solvants écoresponsables, d'où l'utilisation d'un mélange éthanol-eau. Toutes les matrices végétales ont dans un premier temps été extraites dans des conditions similaires, notamment la nature et le pourcentage des solvants utilisés ainsi que le protocole d'extraction, afin de comparer les différents extraits obtenus entre eux.

Tableau 3 : Espèces végétales étudiées dans le cadre du projet NATUBAVAL

Nom botanique	Nom vernaculaire	Partie traitée	Période de récolte	Lieu de récolte
<i>Cistus albidus</i> L.	Ciste blanc	Rameaux	2010	Parc Départemental Estienne d'Orves
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Lentisque	Rameaux	2010	Parc Départemental Estienne d'Orves
<i>Salvia verbenaca</i> L.	Sauge à feuille de verveine	Sommités	2010	Parc Départemental Estienne d'Orves
<i>Ruta chalepensis</i> L.	Rue de Chalep	Sommités	2010	Parc Départemental Estienne d'Orves
<i>Coronilla emerus</i> L.	Coronille	Sommités fleuries	2010	Cabris
<i>Laurus nobilis</i> L.	Laurier noble	Rameaux	2010	Parc Départemental Estienne d'Orves
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Thym	Sommités fleuries	05/2010	Tinée, Valdeblore
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Romarin	Rameaux	10/2010	St Jeannet
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Millepertuis	Sommités fleuries	2010	<i>Non communiqué</i>
<i>Myrtus communis</i> L.	Myrte	Sommités fleuries	2010	<i>Non communiqué</i>
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Cyprès	Rameaux	2010	<i>Non communiqué</i>
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	Santoline	Sommités fleuries	06/2010	Cabris
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Cade	Rameaux	08/2010	Rimplas
<i>Juniperus communis</i> L.	Genévrier commun	Rameaux avec fruits	08/2010	Rimplas
<i>Satureja montana</i> L.	Sarriette des montagnes	Sommités fleuries	11/2011	Isola 2000
<i>Alliaria petiolata</i> (M.Bieb.) Cavara & Grande	Herbe à ail	Parties aériennes	06/2010	Brénon Var
<i>Helichrysum stoechas</i> L.	Immortelle	Parties aériennes	06/2010	Lit du Var (confluent Vésubie)

Concernant les proportions des solvants d'extraction, les conditions choisies permettent l'extraction d'un maximum de métabolites tout en balayant une large gamme de polarité. Ainsi, l'eau permet l'extraction des composés les plus polaires, tels que les acides aminés et les hydrates de carbone, et l'éthanol facilite l'extraction des composés un peu moins polaires à peu polaires, notamment les métabolites secondaires d'intérêt comme les polyphénols et terpénoïdes, ou encore les pigments végétaux et acides gras. Les principales caractéristiques des extraits obtenus à partir des matières premières végétales présélectionnées sont présentées dans la **Partie Expérimentale, 2.2.**

3. Empreinte chromatographique des extraits bruts

3.1. Analyse des extraits bruts par HPLC-ELSD-DAD

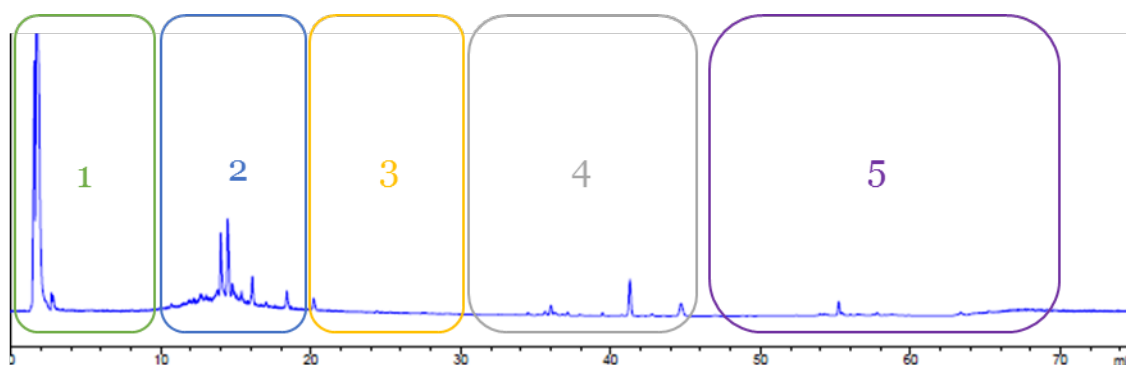
L'HPLC, notamment pour sa diversité d'applications et sa robustesse, est une technique chromatographique de choix pour l'analyse de substances naturelles.

Pour cette étude, c'est la chromatographie en phase inverse qui a été mise en œuvre en raison de ses nombreuses possibilités d'utilisation. En effet, les extraits naturels étant de composition complexe, avec des constituants de polarité variable, des analyses HPLC-ELSD-DAD ont permis d'obtenir une première empreinte chromatographique de chacun des extraits, dans le but d'identifier les grandes familles de métabolites primaires et secondaires qui y sont représentées, et ainsi de comparer ces extraits entre eux.

La méthode mise en œuvre a été optimisée à partir des méthodes préalablement utilisées pour l'analyse d'extraits naturels au laboratoire. La phase stationnaire en phase inverse a été choisie pour sa capacité à analyser des métabolites de polarité et de poids moléculaire variables⁸⁰. De même, la phase mobile utilisée est celle permettant d'obtenir les meilleurs résultats pour visualiser les familles de métabolites présentes dans des extraits naturels bruts. Le gradient de solvants de la phase mobile (eau, acétonitrile et isopropanol) a été adapté à la gamme de polarité analysée, et l'ajout d'acide formique aux solvants a permis l'obtention d'une meilleure résolution.

Ainsi, la méthode analytique mise au point se veut générale puisqu'elle permet l'analyse d'une grande variété de métabolites. Des standards commerciaux de polarité variable ont également été analysés dans les mêmes conditions dans l'optique d'associer les métabolites contenus dans les extraits bruts analysés à plusieurs grandes familles de métabolites primaires et secondaires, et ainsi déterminer les zones d'éluion caractéristiques des familles de métabolites cibles, telles que les polyphénols et les terpénoïdes.

La **Figure 11** montre un exemple de chromatogramme HPLC-ELSD obtenu pour *L. nobilis*. Le chromatogramme représenté montre l'analyse qualitative de l'extrait brut, permettant d'évaluer la polarité des composés présents.



Zones d'éluion :

- 1 Hydrates de carbone
- 2 Flavonoïdes polaires
- 3 Terpénoïdes
- 4 Acides gras, triglycérides, composés hydrocarbonés
- 5 Pigments, cires végétales

Figure 11 : Exemple de chromatogramme HPLC-ELSD (Extrait de *L. nobilis*) et zones d'éluion caractéristiques

Colonne Luna C18 Phenomenex, 150 x 4,6 mm ; 5 µm.

Solvants A : H₂O ; B : MeCN ; C : n-propanol

Gradient 0-5 min : 5 % B, 5-35 min : 5-100 % B, 35-45 min : 100 % B, 45-50 min : 0-60 % C, 50-60min : 60 % C, puis retour aux conditions initiales

En effet, les premières minutes d'éluion en mode isocratique aqueux témoignent de la présence de nombreux composés pas du tout ou très peu retenus par la colonne tels que les hydrates de carbone, très polaires (zone 1). Les flavonoïdes glycosylés, quant à eux, sont sensiblement moins retenus par la colonne que leurs homologues aglycones et éluent après 10 à 20 minutes en raison du gradient d'acétonitrile (zone 2), moins polaire. Ainsi, les terpénoïdes (zone 3), beaucoup moins polaires,

sont élués entre 20 et 30 minutes, lorsque la concentration en acétonitrile est plus importante dans la phase mobile.

Enfin, les acides gras, triglycérides et composés hydrocarbonés (zone 4), apolaires, présentent une forte rétention sur la colonne et ne sont élués qu'après 30 minutes, lorsque la concentration d'acétonitrile tend à son maximum. La phase d'élution suivante avec une concentration fixe d'acétonitrile et d'isopropanol permet l'élution des composés les plus apolaires retenus par la colonne, qui, dans le cas des extraits végétaux, sont souvent des pigments ou cires végétales (zone 5).

Finalement, les composés de type polyphénols et terpénoïdes semblent se situer entre 10 et 30 minutes d'élution principalement. La méthode développée permet, pour tous les extraits, une séparation plutôt satisfaisante des composés présents, avec une résolution plus qu'acceptable par rapport à la complexité de tels extraits végétaux. L'HPLC demeure une technique séparative de choix pour l'analyse des extraits naturels, notamment en phase inverse. Afin de confirmer et surtout compléter les informations livrées par les analyses HPLC, les extraits bruts ont également été soumis à des analyses par HPTLC.

3.2. Analyses des extraits bruts par HPTLC

L'HPTLC est une technique complémentaire de l'HPLC permettant une analyse rapide et précise d'un grand nombre d'extraits et offrant de nombreux avantages, notamment en termes de reproductibilité, de coût et de facilité de mise en œuvre. Cette technique de chromatographie sur couche mince semi-automatisée permet l'analyse en parallèle de plusieurs extraits végétaux, et leur comparaison grâce aux empreintes chromatographiques générées. Une fois une méthode mise en place, elle peut être aisément reproduite pour valider par exemple l'identité végétale de différents lots de matières premières naturelles au niveau industriel ou encore pour le dosage d'actifs et/ou de contaminants.

Il s'agit donc d'une technique de choix pour l'analyse d'extraits végétaux, pour lesquels on trouve de nombreuses sources d'adultération ou de falsification, nuisant à leur qualité et la sécurité d'utilisation des consommateurs⁸¹.

Outre sa simplicité de mise en œuvre, l'HPTLC détient l'avantage d'être en grande partie automatisée (notamment au niveau des dépôts, du développement et du trempage dans la solution de dérivation), ce qui permet une grande précision ainsi qu'une certaine reproductibilité des analyses. La phase stationnaire la plus courante, qui a également été choisie pour cette étude, est le gel de silice. Cela est dû à sa grande surface spécifique, son fort pouvoir d'absorption, son inertie chimique et son prix. Il est également possible de conférer des propriétés hydrophobes au gel de silice grâce à diverses fonctionnalisations : par exemple, la greffe de groupes octadécyles C18 permet d'obtenir une phase inverse. Dans cette étude, c'est la phase normale qui a été mise en œuvre.

Les phases mobiles utilisées pour le développement des échantillons sont directement liées à la polarité des composés d'intérêt et à la force d'éluion des solvants mis en œuvre. Les combinaisons possibles sont alors très nombreuses, ce qui peut nuancer la reproductibilité de la technique. En revanche, de nombreuses phases mobiles sont citées comme références dans la Pharmacopée Européenne, par exemple, et permettent l'identification des espèces végétales répertoriées. Ne connaissant pas la composition des extraits étudiés, le choix des phases mobiles a été effectué en se basant sur les métabolites secondaires d'intérêt dans cette étude, à savoir les composés phénoliques et les terpénoïdes⁸¹.

L'analyse des extraits bruts dans des « conditions polaires ou apolaires » permet ainsi la mise en évidence de manière différentielle des composés présents dans les différents extraits, et facilite leur visualisation après dérivation. De très nombreux réactifs de révélation sont décrits et connus. Certains sont considérés comme généraux et permettent simplement d'identifier la présence de composés ou familles de composés, alors que d'autres sont plus spécifiques et révèlent de précieuses informations sur la nature des composés présents. L'utilisation de standards commerciaux se révèle alors très utile.

3.2.1. Analyse des composés phénoliques

La phase mobile choisie pour la mise en évidence des composés phénoliques est constituée d'acétate d'éthyle, d'acide formique, d'acide acétique glacial et d'eau, ce

qui permet de favoriser la séparation des composés polaires, qui apparaissent entre la ligne de dépôt et le front de solvant. De plus, cette phase mobile est adaptée à la mise en évidence des glycosides de flavonoïdes⁸². Les composés apolaires, quant à eux, ne sont pas du tout retenus par la plaque et se retrouvent au niveau du front de solvant. Cette phase mobile est communément utilisée pour identifier les glycosides de flavonoïdes et les composés phénoliques. Dans cette étude, c'est le révélateur NP/PEG, spécifique des composés phénoliques, qui a été choisi comme réactif de dérivation. Une lecture de la plaque à une longueur d'onde de 365 nm permet alors de caractériser les différentes sous-familles de composés phénoliques, qui présentent une fluorescence de couleur variable selon leur structure. Le **Tableau 4** présente des exemples de couleurs de bandes observées après révélation au réactif NP/PEG, à 365 nm, en fonction de la sous-famille à laquelle appartiennent les composés étudiés.

Tableau 4 : Révélation au réactif NP/PEG – Exemples de couleurs de la fluorescence observée à 365 nm en fonction de la sous-famille de flavonoïdes⁸²

Sous-famille	Exemples de molécules	Couleur des <i>spots</i> après révélation à 365 nm
Acides carboxyliques phénoliques	Acide caféique, acide chlorogénique	Bleu
	Scopolétine	Bleu
Coumarines	Quercétine, myricétine*	Orange-jaune
Flavonols	Kaempférol, isorhamnétine*	Jaune-vert
	Lutéoline*	Orange
Flavones	Apigénine*	Jaune-vert

La **Figure 12** montre l'analyse par HPTLC de *S. chamaecyparissus*, *C. albidus* et *R. chalepensis*, ainsi que des standards phénoliques utilisés : la rutine et la quercétine. Les extraits présentent une composition en composés phénoliques variable, représentée par les *spots* colorés grâce à la visualisation sous UV (366 nm). Dans certains cas, la comparaison des analyses des extraits avec celle des standards donne des informations comparables à celles fournies par l'HPLC puisqu'en plus des rapports frontaux (R_f), il est possible de comparer la couleur des taches, ce qui peut prédire une éventuelle correspondance entre un standard et un composé présent dans l'extrait analysé. Sur cette figure, il est notamment possible de déceler la

présence de quercétine dans l'extrait de *S. chamaecyparissus* et de rutine dans l'extrait de *R. chalepensis*. Les *spots* de couleur bleue, verte et/ou orange observés dans les extraits étudiés indiquent la présence de plusieurs types de flavonoïdes, en particulier dans les extraits de *S. chamaecyparissus* et de *R. chalepensis*. Ces informations peuvent être confirmées au moyen d'une analyse densitométrique, permettant de mesurer directement l'absorbance des *spots* sur la plaque HPTLC. Ces analyses ne sont pas présentées ici car les empreintes chromatographiques se veulent uniquement informatives.

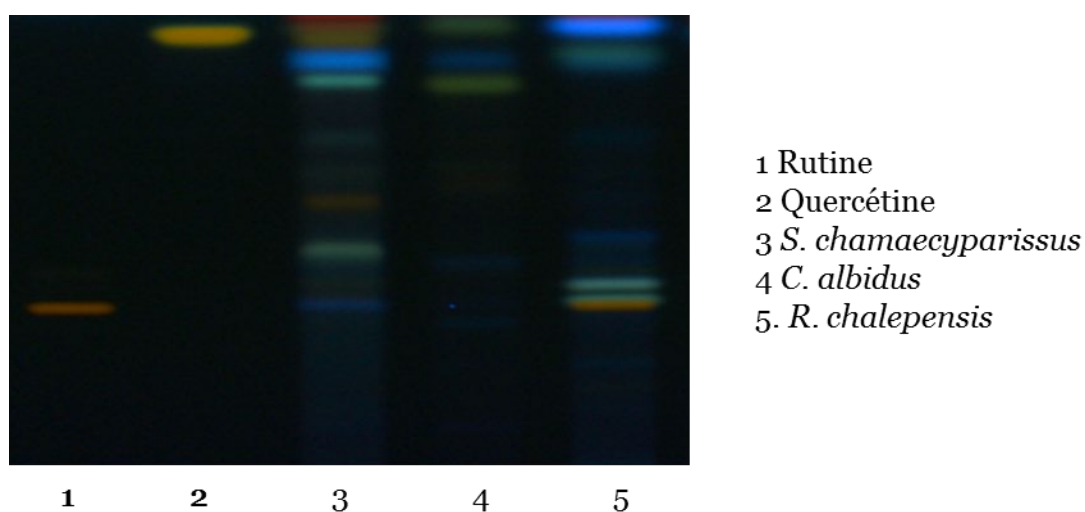


Figure 12 : Exemples d'empreintes chromatographiques HPTLC de standards commerciaux et d'extraits bruts

Plaque Merck silica gel 60G F₂₅₄, 10x20 cm

Phase mobile EtOAc:HCOOH:CH₃COOH:H₂O 100:11:11:26 (v/v/v/v)

Révélation NP/PEG, lecture UV 366 nm

De la même manière, des analyses ont été réalisées pour l'autre famille de molécules d'intérêt dans le cadre du projet NATUBAVAL, à savoir les terpénoïdes.

3.2.2. Analyse des terpénoïdes

Cette famille de composés étant généralement moins polaire que les composés phénoliques, la phase mobile mise en œuvre a été choisie en conséquence afin de favoriser la rétention des composés les plus apolaires, permettant ainsi leur séparation sur la plaque HPTLC. Les composés polaires sont retenus par la plaque et se retrouvent au niveau des dépôts.

Le révélateur à l'anisaldéhyde sulfurique est normalement considéré comme un réactif universel, mais dans ce cas, il permet la détection spécifique des composés de type terpénoïdes et stérols végétaux. La figure 3 montre l'analyse des terpénoïdes et stérols végétaux de *S. chamaecyparissus*, *C. albidus*, *R. chalepensis* et *C. emerus*, en comparaison avec un standard commercial d'acide oléanolique.

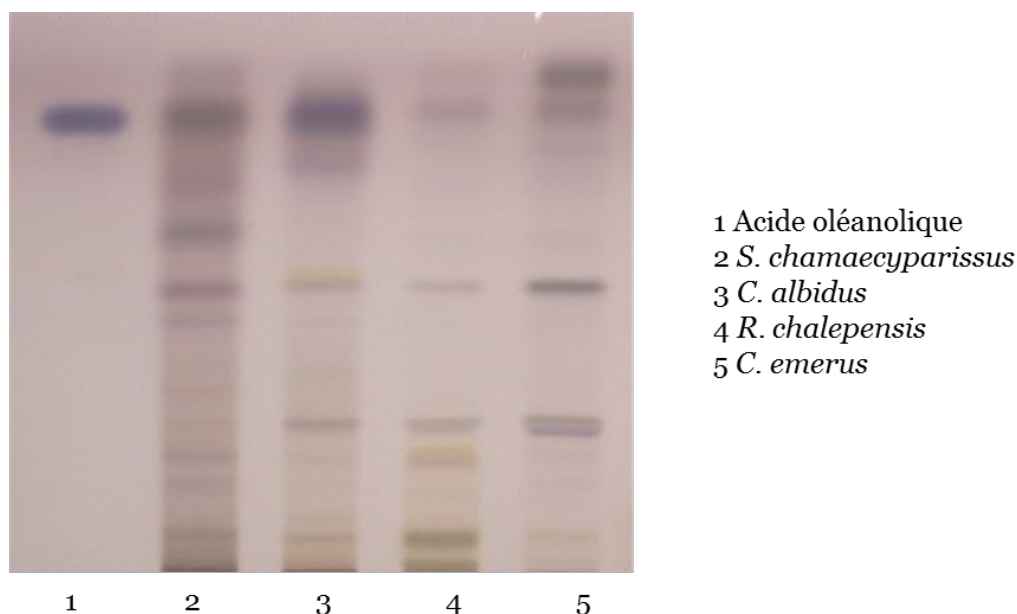


Figure 13 : Exemples d'empreintes chromatographiques HPTLC d'un standard commercial et d'extraits bruts
 Plaque Merck silica gel 60G F₂₅₄, 10x20 cm
 Phase mobile 1-butanol:H₂O:HCOOH 100:80:20 (v/v/v)
 Révélation anisaldéhyde sulfurique, lecture lumière blanche WRT

Les cartographies obtenues sont toujours relativement complexes et très variées. En revanche, elles présentent une réelle complémentarité avec l'HPLC, puisque l'analyse par HPTLC permet l'analyse spécifique des familles de molécules observées sur un chromatogramme HPLC.

Finalement, les deux techniques d'analyse se sont montrées très utiles dans l'analyse d'un grand nombre d'extraits, puisqu'elles permettent chacune d'obtenir des cartographies propres à chaque extrait. L'HPLC a permis une analyse plus globale et l'obtention d'informations sur les principales familles de métabolites présentes dans les extraits, tandis que l'HPTLC a permis une analyse plus spécifique des familles de

molécules d'intérêt. Cette seconde technique a également permis la visualisation de plusieurs extraits sur une même plaque, ce qui est un avantage considérable lorsque, comme ici, des analyses multiples de type *screening* sont réalisées.

En conclusion, l'analyse des différentes cartographies livre de précieuses informations quant à la composition chimique des extraits bruts. L'objectif suivant a été d'évaluer l'activité biologique de la totalité des extraits en vue d'identifier les extraits d'intérêt pour la poursuite du projet.

4. Évaluation biologique des extraits bruts

Les extraits bruts ont été soumis à des tests d'activité antimicrobienne et antioxydante afin d'évaluer leur potentiel d'utilisation en tant que conservateurs.

4.1. Activité antimicrobienne

Parmi les principales méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne d'extraits naturels (**Chapitre I, 1.5.1.**), deux méthodes ont été mises en œuvre dans le cadre du projet NATUBAVAL : la méthode par dilution et la bioautographie. Le principal avantage de la méthode par dilution est la possibilité de solubiliser totalement l'échantillon à évaluer grâce à un solvant ou un mélange de solvants adéquat. Elle permet également de tester un grand nombre d'échantillons, distribués sur une plaque 96 puits à fond plat, avec plusieurs répétitions pour une plus grande précision. Cette capacité d'analyse à haut débit a été un critère de choix pour l'utilisation de cette méthode.

En effet, les méthodes par diffusion sont plus adaptées à l'évaluation de l'activité antimicrobienne d'antibiotiques ou de composés purs dont l'activité antimicrobienne a préalablement été confirmée. Par ailleurs, le coût de revient d'une détermination de CMI (concentration minimale inhibitrice) sur un nombre d'extraits importants était trop élevé. Dans une optique de criblage, c'est donc une évaluation à l'aide de la méthode par dilution qui semblait la plus pertinente et la plus adaptée.

La bioautographie, quant à elle, a été mise en œuvre dans un second temps et de manière complémentaire à l'évaluation grâce à la méthode par dilution, afin de

déterminer le type de molécules responsables de l'activité antimicrobienne pour les extraits les plus prometteurs.

4.1.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne par spectrophotométrie

Le protocole développé pour la réalisation des tests d'activité antimicrobienne des extraits bruts (**Partie Expérimentale, 2.4.**) a été mis au point et optimisé par la société Nixe. Toutes les analyses relatives à l'activité antimicrobienne ont été réalisées par les soins de la société Nixe en tant que prestataire de services du projet NATUBAVAL.

Chacun des dix-sept extraits bruts a été préparé dans des conditions identiques et testé contre les micro-organismes suivants : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis* (anciennement *A. niger*) et *Candida albicans*. Deux concentrations différant d'un facteur 10 (2 % et 0,2 %, concentrations massiques) ont été choisies de manière à encadrer les concentrations généralement mises en œuvre lors de l'ajout de conservateurs dans une formule cosmétique. Cela permet également d'avoir une marge d'évaluation suffisamment importante pour éliminer les échantillons qui ne sont actifs à aucune de ces deux concentrations. Une fourchette de concentrations au sein de laquelle les échantillons sont supposés être inhibiteurs vis-à-vis d'une ou plusieurs souches microbiennes a ainsi été définie. La concentration de 0,2 % est ainsi la concentration supposée la plus basse à laquelle l'on pourrait espérer observer une efficacité antimicrobienne. Puisque le témoin utilisé est une molécule pure évaluée à sa concentration d'usage, il a été choisi d'encadrer cette concentration pour l'évaluation des mélanges complexes que sont les extraits naturels. Il semble donc cohérent d'observer une activité accrue à 2 %, puisque les extraits naturels sont le siège de synergies ou au contraire d'antagonismes entre les différents métabolites qui les composent.

Un parabène commercial a également été mis en œuvre, et a été testé à sa concentration d'usage (0,4 %), constituant ainsi le témoin positif de cette expérience. Afin de comparer l'activité antimicrobienne des extraits bruts évalués avec des extraits commercialisés pour leurs propriétés antimicrobiennes, deux extraits commerciaux ont également été évalués : un extrait de l'algue rouge *Asparagopsis*

armata (Ysaline, Nividiskin) et un extrait de *Podocarpus totara* (Totarol, Biocosmethic).

Un témoin négatif dans lequel le mélange de solvants ayant permis de solubiliser les extraits bruts (éthanol:eau 60:40 v/v) remplace le volume d'échantillon et sert de base pour le calcul des pourcentages d'inhibition des extraits évalués. Enfin, un témoin de référence de la croissance des souches microbiennes dans lequel de l'eau distillée stérile remplace le volume d'échantillon permet de vérifier que ce témoin négatif ne possède pas d'activité microbicide. Les DO obtenues pour le témoin négatif et le témoin de référence sont identiques et ne seront pas présentées.

Pour chaque échantillon, les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition de chaque souche microbienne, calculés à partir des valeurs d'absorbance relevées à différents temps (24 h, 48 h et 72 h) à une longueur d'onde de 620 nm, selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \frac{A_X}{A_T} \cdot 100$$

A_X : Absorbance moyenne de l'échantillon

A_T : Absorbance moyenne du témoin négatif

Ces résultats sont présentés sous forme de bilan dans le **Tableau 5**. Seuls les résultats obtenus pour les extraits bruts préparés à une concentration de 2 % sont présentés car ils sont plus représentatifs qu'à une concentration de 0,2 %.

Tableau 5 : Activité antimicrobienne des extraits bruts (2 %)

Extrait	Activité antimicrobienne à 2 %							
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Aspergillus brasiliensis</i>		<i>Candida albicans</i>	
	24 h	48 h	48 h	72 h	48 h	72 h	24 h	48 h
<i>C. albidus</i> L.	+++	++	-	~	+++	~	++	~
<i>P. lentiscus</i> L.	++	++	++	~	~	-	-	-
<i>S. verbenaca</i> L.	++	-	-	-	+	-	-	-
<i>R. chalepensis</i> L.	+++	+++	-	-	++	+	~	~
<i>C. emerus</i> L.	++	-	-	-	++	+	-	-
<i>L. nobilis</i> L.	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++
<i>T. vulgaris</i> L.	+++	+++	-	-	+++	~	-	+
<i>R. officinalis</i> L.	+++	+++	-	-	~	~	-	-
<i>H. perforatum</i> L.	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++
<i>M. communis</i> L.	++	+++	-	-	++	-	+	~
<i>C. sempervirens</i> L.	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>S. chamaecyparissus</i> L.	+++	+++	-	-	+++	+++	++	~
<i>J. oxycedrus</i> L.	+++	+++	~	+	+++	~	+	~
<i>J. communis</i> L.	+++	+++	-	-	+	-	-	-
<i>S. montana</i> L.	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. petiolata</i> (M.Bieb.) Cavara & Grande	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>H. stoechas</i> L.	+++	+++	-	-	~	-	-	-
Témoin positif (0,4 %)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ysaline (100 mg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-
Totarol (100 mg/mL)	+++	+++	++	++	+++	+++	-	~

+++ : activité ≥ 90% ≤ activité ≤ 100% ; ++ : 70% ≤ activité ≤ 90% ; + : 60% ≤ activité ≤ 70% ; ~ : 40% ≤ activité ≤ 60% ; - : activité ≤ 40%

Ysaline : extrait d'*Asparagopsis armata*; Totarol : extrait de *Podocarpus totara*

Il est à noter que les temps pris en considération ne sont pas les mêmes pour chaque souche puisque celles-ci n'ont pas toutes les mêmes vitesses de croissance. Ainsi, la bactérie à gram positif *S. aureus* et la levure *C. albicans* sont des souches à croissance rapide : elles se multiplient dès qu'elles se trouvent dans un environnement favorable, par exemple un milieu de culture adapté. Les valeurs obtenues peuvent alors être interprétées dès 24 h d'incubation, et on considère que leur croissance atteint un maximum à partir de 48 h d'incubation. À partir de 48 h d'incubation, elles atteignent un plateau et commencent à décliner lorsque toutes les réserves du milieu sont épuisées. En revanche, concernant le champignon microscopique *A. brasiliensis* et la bactérie à gram négatif *P. aeruginosa*, la croissance est beaucoup moins rapide. Au cours de leur multiplication, ces deux souches doivent d'abord s'adapter au milieu de culture, d'où une vitesse de développement plus longue. C'est pourquoi seules les valeurs obtenues à partir de 48 h et jusqu'à 72 h d'incubation sont prises en compte.

Les valeurs obtenues ont été interprétées de la manière suivante pour réaliser le tableau-bilan : pour être significatif, le pourcentage d'inhibition doit être égal ou supérieur à 60 %. En-deçà de cette valeur, l'inhibition est considérée comme moyenne (entre 40 et 60 % d'inhibition : ~) ou encore très faible voire nulle (entre 0 et 40 % d'inhibition : -). Les valeurs négatives témoignent d'une stimulation de la croissance microbienne par l'échantillon en question, ce qui représente un effet antagoniste à l'activité recherchée. C'est la raison pour laquelle il n'a pas été possible de déterminer une concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les extraits analysés. En effet, une telle détermination n'est pas réalisable dans le cas d'échantillons stimulant la croissance microbienne, comme cela peut être le cas pour certains extraits. Ce paramètre n'est cependant pas pris en compte et les valeurs négatives sont dans ce cas assimilées à des valeurs nulles.

Les valeurs d'intérêt, c'est-à-dire comprises entre 60 et 100 % d'inhibition pendant toute la durée d'évaluation, ont été classées en trois catégories (inhibition plutôt forte comprise entre 60 et 70 % : +, forte, entre 70 et 90 % : ++ ou très forte à totale, au-dessus de 90 % : +++). Plus le pourcentage d'inhibition se rapproche de 100, plus l'effet microbicide est important. Les valeurs supérieures à 100 % d'inhibition ont été ramenées à 100 %, le pourcentage synonyme d'une inhibition totale.

Au vu des propriétés recherchées, il a été décidé de ne pas accorder davantage d'intérêt aux extraits n'ayant pas de pouvoir d'inhibition notable aux concentrations évaluées.

D'après le **Tableau 5**, les résultats obtenus montrent que seuls deux extraits ne présentent pas d'activité antimicrobienne appréciable contre les quatre souches microbiennes testées, à savoir *C. emerus* et *S. montana*. Ces résultats sont plutôt intéressants, puisque les quinze autres extraits sont tous actifs contre au moins une souche microbienne : *S. aureus*. En revanche, l'activité contre *P. aeruginosa* est globalement faible voire inexistante. Concernant *A. brasiliensis*, l'activité est comparable à celle du témoin positif pour trois extraits, à savoir *L. nobilis*, *H. perforatum* et *S. chamaecyparissus*, et plutôt intéressante pour deux autres extraits : *R. chalepensis* et *C. emerus*. Enfin, seuls *L. nobilis* et *H. perforatum* présentent une activité marquée contre *C. albicans*. Moins marquants, *C. albidus* et *S. chamaecyparissus* présentent une activité notable après 24 h d'incubation, mais qui n'est pas confirmée après 48 h d'incubation.

Concernant les extraits commercialisés pour leurs propriétés antimicrobiennes, il est intéressant de constater que l'extrait d'algue rouge Ysaline ne présente aucune activité dans les conditions d'évaluation de l'activité antimicrobienne mises en œuvre. Cela peut être lié simplement à un manque de solubilité de l'actif dans le mélange éthanol/eau mis en œuvre pour la préparation d'échantillon, ou à une concentration trop faible. La concentration des solutions mises en œuvre a été volontairement fixée à 100 mg/mL, contre 200 mg/mL pour les autres extraits bruts, justement parce que les propriétés antimicrobiennes sont revendiquées et parce qu'on devrait donc pouvoir s'attendre à les retrouver lors de ces essais. En revanche, le Totarol présente une activité contre trois des quatre souches évaluées, ce qui confirme les revendications de son fabricant dans ces conditions. Il faut tout de même noter que l'activité de certains extraits, bien que plus concentrés, est supérieure à celle du Totarol, notamment contre *A. brasiliensis* et *C. albicans*.

Il est à noter qu'une des limites de cette méthode d'évaluation est la couleur des extraits, qui exerce dans certains cas une influence sur la lecture de la densité optique. C'est notamment le cas lorsque des valeurs supérieures à 100 % sont

obtenues. Ces valeurs sont liées à l'évolution de la couleur des extraits au cours du temps d'incubation, l'absorbance évoluant elle aussi en conséquence. Dans l'idéal, un recours à la néphélométrie, permettant de mesurer la teneur en particules en suspension dans un milieu⁵, aurait permis de corriger la DO en tenant compte du trouble observé ; ainsi, les résultats obtenus auraient pu être encore plus précis. Néanmoins, les extraits ayant tous été préparés dans des conditions identiques, puis filtrés avant les analyses, cette modification de la DO liée à la couleur des extraits a été considérée comme minime et sans réelle influence sur le résultat final.

Afin de limiter l'étude à un nombre restreint d'extraits, les extraits sélectionnés pour leur potentiel antimicrobien sont ceux présentant une activité inhibitrice notable et stable (au moins 60 % sur les deux temps de lecture) contre au moins deux souches microbiennes, l'objectif final du projet NATUBAVAL étant de développer un conservateur au spectre antimicrobien le plus large possible. Les extraits sélectionnés avec ces critères sont alors *R. chalepensis*, *L. nobilis*, *H. perforatum* et *S. chamaecyparissus*.

Une autre approche aurait consisté à étudier tous les extraits présentant une activité antimicrobienne, même faible, en partant du principe de synergie lié à la composition complexe de tels extraits végétaux. Cependant, l'objectif est dans ce cas d'appliquer une approche en « entonnoir », visant à réduire le nombre de candidats afin de sélectionner, de manière idéale, un extrait cible pour la suite cette étude.

Dans le but de compléter les tests d'activité antimicrobienne réalisés sur plaques 96 puits, une méthode par bioautographie (HPTLC-EDA) a également été développée et appliquée à quelques extraits sélectionnés parmi les candidats initiaux.

4.1.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne d'une sélection d'extraits bruts contre *A. brasiliensis* par HPTLC-EDA

Une évaluation complémentaire de l'activité antimicrobienne par HPTLC-EDA a été mise en œuvre suite à la mise en évidence de quelques extraits d'intérêt lors de l'analyse par spectrophotométrie. L'objectif de cette approche est d'analyser non pas les extraits bruts en tant que tels, mais de mettre en évidence les composés ou

familles de composés responsables de l'activité antimicrobienne après séparation chromatographique.

Par ailleurs, cette approche a également pour objectif d'établir, si possible, une corrélation entre les cartographies HPTLC de ces extraits et leur activité antimicrobienne.

Cette expérience a été réalisée avec *A. brasiliensis* en raison de la sensibilité de cette souche microbienne à cinq des extraits évalués. Les plaques HPTLC, après dépôt des échantillons d'intérêt, ont été transmises à la société Nixe. Après pulvérisation d'une suspension de spores d'*A. brasiliensis*, les plaques ont été incubées le temps nécessaire à la croissance des spores microbiennes (**Partie Expérimentale, 2.4.2.**). La **Figure 14** présente les résultats obtenus sur cinq des extraits de départ : *S. chamaecyparissus*, *C. albidus*, *R. chalepensis*, *C. emerus* et *C. sempervirens*.

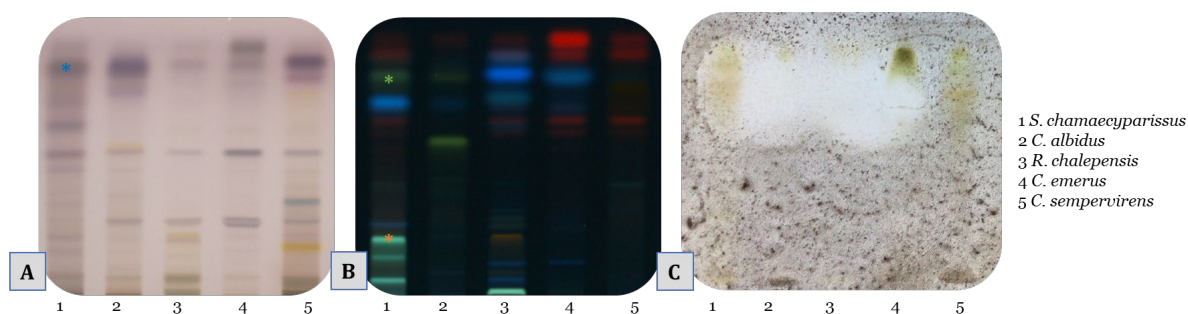


Figure 14 : Activité antifongique par HPTLC-EDA et empreintes chromatographiques

Plaques HPTLC Merck silica gel 60F₂₅₄, 10x20 cm.

Phase mobile : EtOAc:H₂O:CH₃COOH:HCOOH 100:26:11:11 (v/v/v/v)

Révélation A : anisaldéhyde sulfurique (WRT) ; B : NP/PEG (366 nm) ; C : *A. brasiliensis* (WR)

Standards : *acide glycyrrhizique ; *rutine ; *quercétine

Des empreintes chromatographiques de ces mêmes extraits ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour l'analyse par HPTLC-EDA, avec une première révélation à l'anisaldéhyde sulfurique (**A**) et une seconde au NP/PEG (**B**). Les résultats obtenus ont été comparés à l'analyse par HPTLC-EDA (**C**). Les zones de croissance microbienne observées en C sont plus ou moins importantes, et il est particulièrement intéressant d'observer des zones d'inhibition exemptes de croissance microbienne, ces dernières pouvant être corrélées avec la présence de composés responsables d'une activité fongicide contre *A. brasiliensis*.

Cette analyse révèle de précieuses informations sur le type de molécules pouvant être responsables de l'activité antifongique des extraits bruts. En effet, l'on peut constater que celles-ci se trouvent uniquement dans la partie supérieure de la plaque, dans des zones où se trouvent par exemple les *spots* correspondant à l'acide glycyrrhizique (*) et la quercétine (*), qui sont relativement peu polaires. En revanche, les composés les plus polaires de type rutine (*) ne semblent présenter aucune activité antifongique. Pour les extraits **1** à **4**, il semblerait que l'activité antimicrobienne puisse provenir à la fois de composés de type terpénoïdes révélés à l'anisaldéhyde sulfurique et de composés de type polyphénols révélés au NP/PEG. En revanche, *C. sempervirens* (5) ne présente pas d'activité antifongique, ce qui correspond aux essais préalablement réalisés (**Tableau 5**).

En raison de la complexité chimique des extraits et de la taille de la zone d'inhibition de croissance, il est difficile de distinguer si une seule ou plusieurs molécules sont responsables de l'activité antifongique. Cette méthode se veut donc indicatrice du type de molécules responsables d'une telle activité et peut être utilisée de manière complémentaire à l'analyse avec la méthode par dilution en plaques 96 puits. Elle pourrait notamment se révéler encore plus utile sur des extraits moins complexes ou sur des fractions d'extraits.

En plus de l'activité antimicrobienne, l'activité antioxydante des dix-sept extraits bruts de départ a été évaluée dans un second temps afin de couvrir l'ensemble de l'activité biologique étudiée. La confrontation de l'ensemble des résultats obtenus devait en effet permettre d'aboutir à la sélection d'un ou plusieurs extraits d'intérêt majeur pour le développement d'un nouveau conservateur naturel et faisant l'objet d'une étude plus approfondie dans le cadre du projet NATUBAVAL.

4.2. *Activité antioxydante*

L'évaluation de l'activité antioxydante des dix-sept extraits bruts a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du laboratoire GREEN du Pr. Chémat de l'Université d'Avignon (UMR 408 INRA-UAPV). Les méthodes choisies et les protocoles mis en œuvre ont été développés et optimisés par Anne-Sylvie Tixier-Fabiano (**Partie Expérimentale, 2.5**). Deux méthodes ont été appliquées aux

extraits étudiés : l'indice de Folin-Ciocalteu, n'étant pas une mesure de l'activité antioxydante en tant que telle, mais permettant le dosage des phénols présents dans les échantillons et ainsi une estimation de la quantité de composés potentiellement antioxydants, et le test DPPH, permettant la détermination de la capacité antioxydante des échantillons.

4.2.1. Détermination de la teneur en phénols totaux : indice de Folin-Ciocalteu

L'indice de Folin-Ciocalteu (**Partie Expérimentale, 2.5.1.**) a été déterminé sur les échantillons à l'aide d'une courbe d'étalonnage d'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique (EAG) par g d'extrait et sont présentés dans le **Tableau 6**. Ainsi, les extraits présentant l'équivalent acide gallique le plus important sont *P. lentiscus*, *H. perforatum*, *M. communis* et *J. communis* pour des valeurs comprises entre 89,19 mg/g et 117,37 mg/g. Par comparaison au témoin positif 1, qui est un extrait commercial à base d'extrait de romarin dont l'activité antioxydante a été démontrée (Natrox RO Organic), ces valeurs sont supérieures, ce qui semble plutôt prometteur. En revanche, *C. emerus* et *S. officinalis* semblent être des extraits à faible teneur en EAG. Les autres extraits présentent des valeurs moyennes, comprises entre 33,70 mg/g pour *S. chamaecyparissus* et 78,29 mg/g pour *T. vulgaris*.

Pour être explicites, ces valeurs ne peuvent pas être interprétées seules, c'est pourquoi une évaluation de la capacité antioxydante des extraits bruts a été réalisée dans un second temps afin de déterminer leur potentiel antioxydant.

4.2.2. Détermination de la capacité antioxydante : test DPPH

Le test DPPH étant facile à mettre en œuvre et visuel tout en étant quantitatif, il s'est avéré être une méthode de choix pour le criblage de l'activité antioxydante des dix-sept extraits brut, tout en étant complémentaire avec la détermination de la teneur en phénols totaux des extraits. L'objectif du protocole mis en œuvre (**Partie Expérimentale, 2.5.2.**) est d'évaluer la capacité de chaque échantillon à réduire le radical stable qu'est le DPPH. Le test DPPH consiste à déterminer, pour chaque échantillon, l'IC₅₀ ou concentration inhibitrice médiane. Cette valeur correspond à la

concentration d'extrait permettant la réduction de 50 % de la concentration initiale en DPPH. Ainsi, plus cette valeur est faible, plus la capacité antioxydante de l'échantillon évalué est forte.

Tableau 6 : Teneur en phénols (EAG) et capacité antioxydante (IC₅₀ DPPH) des extraits bruts

Extrait	EAG (mg/g)	IC₅₀ DPPH (µg/mL)
<i>C. albidus</i>	43,97	160,00
<i>P. lentiscus</i>	117,37	103,00
<i>S. verbenaca</i>	44,64	134,00
<i>R. chalepensis</i>	43,45	180,00
<i>C. emerus</i>	20,73	1708,00
<i>L. nobilis</i>	55,72	140,00
<i>T. vulgaris</i>	78,29	110,00
<i>R. officinalis</i>	75,97	108,00
<i>H. perforatum</i>	92,56	119,00
<i>M. communis</i>	89,19	104,00
<i>C. sempervirens</i>	78,27	121,00
<i>S. chamaecyparissus</i>	33,70	118,00
<i>J. oxycedrus</i>	66,32	122,00
<i>J. communis</i>	107,04	107,00
<i>S. montana</i>	69,77	122,00
<i>A. petiolata</i>	45,14	174,00
<i>S. officinalis</i>	15,46	3162,00
<i>H. stoechas</i>	71,96	111,00
Témoin positif 1	85,45	-
Témoin positif 2	-	8,70

Témoin positif 1 : Natrox RO Organic

Témoin positif 2 : vitamine E commerciale

Les résultats obtenus sont également présentés dans le **Tableau 6**. La concentration inhibitrice médiane est exprimée en quantité d'extrait (µg) par volume (mL) de solution. Ainsi, on observe que les valeurs les plus basses (IC₅₀ comprise entre 103 µg/mL et 108 µg/mL) sont obtenues pour *P. lentiscus*, *M. communis*, *R. officinalis* et *J. communis*. En comparant ces valeurs à celles obtenues avec l'indice de Folin-Ciocalteu, on constate que trois des quatre extraits ayant la plus forte capacité antioxydante sont également les plus riches en composés phénoliques. Cela confirme par conséquent l'existence d'une relation entre la teneur en phénols et l'activité antioxydante des échantillons. En effet, *C. emerus* et *S. officinalis*, dont la

teneur en EAG était la plus faible, sont les extraits dont l'IC₅₀ du DPPH est la plus élevée (jusqu'à 3162 µg/mL). Les autres extraits se situent entre ces deux extrêmes, avec des IC₅₀ comprises entre 110 µg/mL et 174 µg/mL.

L'objectif étant d'étudier des extraits possédant à la fois une activité antimicrobienne et une activité antioxydante, il est intéressant d'observer les valeurs obtenues pour les extraits d'intérêt d'un point de vue de leur activité antimicrobienne, à savoir *R. chalepensis*, *L. nobilis*, *H. perforatum* et *S. chamaecyparissus*. Ainsi, on constate que leur teneur en EAG est comprise entre 33,70 mg/g et 92,56 mg/g et leur IC₅₀, entre 118 µg/mL et 180 µg/mL. Par rapport au témoin positif 1, dont la teneur en EAG est de 85,45 mg/g, ces valeurs sont plus faibles ou équivalentes, ce qui semble assez intéressant.

Le témoin positif 2, dont l'IC₅₀ est de 8,7 µg/mL, est, quant à lui, un composé antioxydant pur : la vitamine E. En comparaison avec ce témoin, les valeurs d'IC₅₀ sont toutes nettement plus faibles, ce qui semble normal puisque ce composé est actif à faible concentration, alors que les échantillons évalués dans cette étude sont des extraits bruts complexes, constitués de dizaines de molécules en mélange : les molécules actives sont par conséquent moins concentrées puisque diluées.

De plus, des interactions antagonistes peuvent avoir lieu entre les différentes molécules ou familles de molécules.

Par ailleurs, puisque l'HPTLC-EDA s'applique également à la détection d'une activité antioxydante, le principe du test DPPH a été appliqué sur une sélection d'extraits avec une analyse par HPTLC pour tenter de déterminer les types de composés responsables de l'activité antioxydante des extraits bruts.

4.2.3. Évaluation de l'activité antioxydante d'une sélection d'extraits bruts par HPTLC-EDA

De même que pour l'activité antimicrobienne, l'activité antioxydante a été évaluée par HPTLC-EDA à l'aide du DPPH, qui joue ici le rôle de révélateur. Afin de comparer les résultats avec des empreintes chromatographiques préalablement obtenues, des analyses HPTLC ont été réalisées sur les mêmes extraits que pour

l'analyse HPTLC-EDA avec *A. brasiliensis*: *S. chamaecyparissus*, *C. albidus*, *R. chalepensis*, *C. emerus* et *C. sempervirens*. Une phase mobile permettant à la fois une bonne séparation des composés de type terpénoïdes et des composés de type polyphénols a été mise en œuvre. Ainsi, trois révélations (anisaldéhyde sulfurique, NP/PEG et DPPH) sont comparées sur la **Figure 15**.

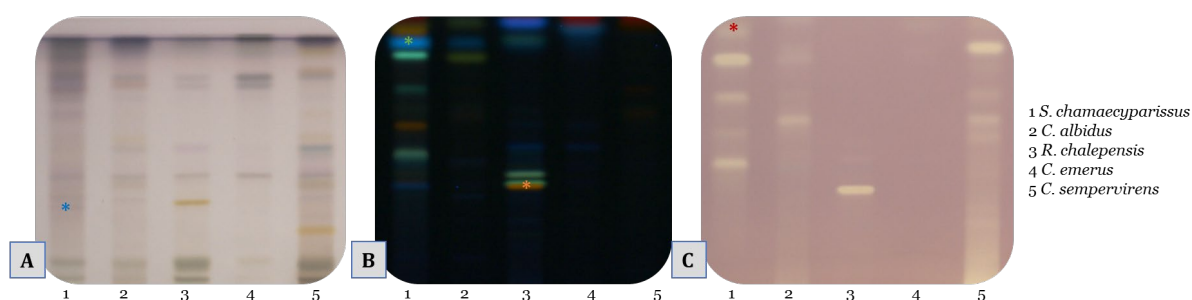


Figure 15 :Activité antioxydante par HPTLC-EDA et empreintes chromatographiques

Plaques HPTLC Merck silica gel 60F₂₅₄, 10x20 cm

Phase mobile : EtOAc:MeOH:H₂O 100:13,5:10 (v/v/v)

Révélation A : anisaldéhyde sulfurique (WRT) ; B : NP/PEG (366 nm) ; C : DPPH (WR)

*Standards : *acide glycyrrhizique ; *rutine ; *quercétine ; *tocophérol*

De manière générale, l'analyse HPTLC-EDA à l'aide du DPPH (C) confirme de manière visuelle les résultats obtenus en plaques de microtitration (**Tableau 6**) : *S. chamaecyparissus* (1) et *C. sempervirens* (5) sont les extraits les plus actifs parmi les cinq analysés et ceux possédant le plus de molécules antioxydantes. *C. albidus* (2) et *R. chalepensis* (3) semblent présenter une activité inférieure aux deux extraits précités, avec tout de même quelques molécules antioxydantes. *C. emerus* (4) ne présente aucune activité antioxydante, et aucune molécule antioxydante n'est visible sur la plaque.

De plus, pour *S. chamaecyparissus* (1), on observe de manière cohérente que ce sont plutôt les molécules de type polyphénols révélées au NP/PEG (B), et non les molécules de type terpénoïdes (A), qui semblent être responsables de l'activité antioxydante (C). Pour *C. albidus* (2), cette corrélation est moins marquée mais tout de même visible. Pour *C. sempervirens* (5), cette corrélation semble plus difficile à mettre en évidence en raison de la « traînée » antioxydante répartie sur la quasi-totalité de la distance de migration. Il semblerait qu'il y ait de nombreuses molécules

responsables de l'activité antioxydante de l'extrait, et qu'il s'agisse essentiellement de molécules de type terpénoïdes, puisqu'aucune molécule n'apparaît de manière visible avec le révélateur NP/PEG. Pour *R. chalepensis* (**3**), une molécule en particulier semble être responsable de l'activité antioxydante et au vu du *spot* identifié comme étant la rutine (*), tout laisse à penser qu'il s'agirait de cette molécule. Enfin, concernant *C. emerus*, l'absence de molécules à la révélation NP/PEG (**B**) est en parfaite corrélation avec l'absence d'activité antioxydante (**C**).

Finalement, cette méthode se révèle tout à fait complémentaire des tests d'activité antioxydante effectués en plaques de microtitration puisqu'elle permet une révélation directe et spécifique des molécules responsables de l'activité antioxydante. Ainsi, connaissant la capacité antioxydante d'un extrait brut, elle peut permettre d'identifier rapidement le type de molécules qui en sont responsables et de comparer différents extraits bruts entre eux. Cela confirme le réel potentiel de l'HPTLC-EDA dans le criblage d'échantillons complexes lors de la recherche d'une activité biologique.

5. Sélection des extraits d'intérêt

Après avoir établi des empreintes chromatographiques par HPLC et par HPTLC des dix-sept extraits bruts et déterminé leur potentiel antimicrobien et antioxydant, l'objectif a été de recouper l'ensemble des informations obtenues au moyen des analyses chromatographiques et des tests d'activité biologique afin de sélectionner une ou plusieurs espèces candidates à la poursuite du projet NATUBAVAL.

Afin de faire un choix parmi les espèces présélectionnées pour leur activité antimicrobienne prometteuse et leur activité antioxydante non moins intéressante, à savoir *R. chalepensis*, *L. nobilis*, *H. perforatum* et *S. chamaecyparissus*, une recherche bibliographique a été menée sur ces espèces végétales afin de mettre en relation les résultats obtenus avec l'état de l'art. Celle-ci a été effectuée en tenant compte des résultats antérieurs à 2014, date à laquelle le projet NATUBAVAL a pris fin, et a permis d'obtenir des informations concernant d'éventuelles activités antimicrobiennes (contre une des souches microbiennes évaluées dans le cadre du projet), antioxydantes ou de propriétés conservatrices avérées des plantes précitées.

Concernant *R. chalepensis*, c'est surtout son huile essentielle qui a été étudiée pour son activité antimicrobienne, en particulier antifongique⁸³. Par ailleurs, des composés de la famille des alcaloïdes et des coumarines ont été isolés et identifiés à partir des racines et des feuilles de *R. chalepensis* et une activité antimicrobienne contre plusieurs souches microbiennes a été rapportée, dont *S. aureus* et *C. albicans*⁸⁴. Enfin, une activité antioxydante, en particulier anti-radicalaire, a été identifiée sur des extraits éthanoliques et aqueux de *R. chalepensis*⁸⁵. En revanche, aucune étude exprimant de manière spécifique le potentiel conservateur de la plante n'a été identifiée.

L. nobilis est une espèce végétale dont les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes ont déjà souvent été étudiées, que ce soit pour son huile essentielle ou pour d'autres types d'extraits⁸⁶. Par exemple, une lactone sesquiterpénique isolée des feuilles de laurier noble a montré une activité contre *S. aureus* et *C. albicans*⁸⁷. L'huile essentielle de feuilles possède de plus des propriétés antimicrobiennes contre *S. aureus* et antioxydantes⁸⁸. Enfin, une approche visant à évaluer le potentiel conservateur antimicrobien de l'huile essentielle de *L. nobilis* seule et combinée à d'autres huiles essentielles dans des formules cosmétiques a été décrite⁸⁹.

H. perforatum est très connue pour son action sur le système nerveux central, et plus particulièrement son action antidépressive, vraisemblablement due à une synergie entre l'hyperforine contenue dans les fleurs et les fruits de la plante, qui posséderait également des propriétés antimicrobiennes, et d'autres constituants². Les composés phénoliques issus d'extraits d'*Hypericum* se sont révélés à la fois antioxydants et antimicrobiens contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*^{90,91}.

Enfin, concernant *S. chamaecyparissus*, une étude rapporte l'activité antimicrobienne de son huile essentielle contre *C. albicans*⁹². Une autre étude suggère l'éventuelle utilisation de cette même huile essentielle comme conservateur alimentaire antioxydant⁹³. En revanche, aucune étude ne mentionne une quelconque activité antimicrobienne d'un extrait de santoline contre les souches microbiennes d'intérêt dans cette étude, ou d'activité antioxydante.

Ainsi, les extraits de *R. chalepensis*, *L. nobilis* et *H. perforatum* ayant déjà fait l'objet de recherches au sujet de leur activité antimicrobienne et/ou antioxydante, c'est *S. chamaecyparissus* qui a été sélectionnée comme espèce phare du projet NATUBAVAL. En effet, cela permet de répondre à une des volontés du projet, à savoir son caractère innovant, l'objectif étant de travailler sur une plante dont les propriétés d'intérêt n'ont pas encore été décrites dans la littérature, ou ne sont pas protégées par un brevet.

L'étape suivante de cette étude a alors consisté à étudier de manière plus approfondie les propriétés de l'extrait brut de *S. chamaecyparissus*, et à optimiser cet extrait en vue du développement d'un nouveau conservateur naturel pour l'industrie cosmétique.

CHAPITRE III

ÉTUDE ET OPTIMISATION DE L'EXTRAIT DE *S. CHAMAECYPARISSUS* : DÉVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU CONSERVATEUR NATUREL

Les étapes initiales du projet NATUBAVAL ayant permis la sélection d'une espèce végétale d'intérêt en vue de la poursuite du projet, l'objectif suivant a été d'étudier l'extrait de *S. chamaecyparissus*. Des recherches bibliographiques ont, dans un premier temps, permis de créer une carte d'identité de cette plante en recueillant des données botaniques, phytochimiques et ethnopharmacologiques sur la santoline.

1. Présentation de *S. chamaecyparissus*

1.1. Origine et description botanique

S. chamaecyparissus est connue sous plusieurs appellations vernaculaires : santoline petit-cyprès, aurone femelle, ou *cotton lavender* en anglais. Elle sera nommée ici « santoline ». Il en existe plusieurs synonymes, dont *Santolina incana* Poiret et *Santolina tomentosa* Lam.⁹⁴.

La santoline est un sous-arbrisseau ramifié (**Figure 16, Figure 17**) de la famille des Astéracées, originaire du pourtour du bassin méditerranéen^{94,95}. Elle se trouve naturellement sur les coteaux arides ou les zones sauvages rocailleuses du sud de la France, mais est également cultivée depuis de nombreuses années pour une utilisation avant tout ornementale en tant que massif, haie basse ou couvre-sol.



Figure 16 : *Santolina chamaecyparissus* (plante entière en fleurs)⁹⁶



Figure 17 : *S. chamaecyparissus* (plante entière, photo personnelle)

Il s'agit d'une plante de type vivace, au feuillage tomenteux vert cendré à gris argenté persistant (**Figure 18**), dont la hauteur à l'âge adulte atteint 50 cm. Les feuilles sont découpées en lobes fins et disposées sur quatre rangs⁹⁷. La période de floraison de la santoline s'étend de juin à août et ses inflorescences se présentent sous forme de capitules de couleur jaune dont le diamètre est d'environ 1 cm (**Figure 19**). Cette plante aime les endroits ensoleillés, avec un sol pauvre et drainant. Elle se multiplie relativement facilement par bouture ou semis.



Figure 18 : *S. chamaecyparissus* (feuilles)⁹⁶



Figure 19 : *S. chamaecyparissus* (sommités fleuries)⁹⁶

1.2. Utilisations traditionnelles

La santoline est reconnue pour ses propriétés médicinales par la Pharmacopée française, puisqu'elle figure dans la « Liste A des plantes médicinales utilisées traditionnellement », plus particulièrement ses feuilles et sommités fleuries⁹⁸.

En Afrique du Nord, elle est utilisée de manière traditionnelle comme remède anthelminthique et comme antispasmodique⁹⁹. En Navarre, dans la péninsule ibérique, les inflorescences sont utilisées sous forme d'infusion pour plusieurs applications : le traitement des troubles digestifs, en ophtalmologie pour le nettoyage oculaire, et pour traiter les céphalées et les catarrhes. Selon les dires de la médecine populaire, cette infusion serait un « remède à tout »¹⁰⁰.

1.3. Phytochimie de l'huile essentielle de santoline

De nombreuses études se sont intéressées à la composition de l'huile essentielle de santoline, qui présente une variabilité intraspécifique (selon la sous-espèce étudiée) et géographique (selon la localisation de la plante)¹⁰¹. Ainsi, les composés majoritaires de plusieurs sous-espèces d'origine espagnole se sont révélés être le 1,8-cinéole, représentant entre 2 et 18 % de l'huile essentielle, l'artémisia cétone (0,1 – 28 %), le camphre (traces – 43 %), le bornéol (1 – 28 %), le copaénol (traces – 15 %), le cubénol (1 – 17 %) et l'alloaromadendrène (19 %). Des variations saisonnières ont également été observées. Des alcools sesquiterpéniques non identifiés ont par exemple été déterminés comme composés majoritaires durant la saison estivale, alors qu'en hiver les composés majoritaires sont des monoterpènes (1,8-cinéole,

camphre, myrtanal et bornéol). Une huile essentielle d'origine française a révélé une composition légèrement différente en termes de répartition des composés majoritaires, qui ont été identifiés comme étant l'artémisia cétone (8 – 34 %), le myrcène, le β -phellandrène (8 – 18 %), ou encore la longiverbénone (9 – 18 %). En résumé, la composition de l'huile essentielle de *S. chamaecyparissus* est globalement toujours la même mais les composés sont présents dans des proportions très variables, pouvant parfois être majoritaires et dans d'autres cas minoritaires, voire absents selon la sous-espèce, la saison et/ou l'origine du spécimen étudié.

Bien que la composition chimique de l'huile essentielle de santoline ait déjà été souvent étudiée, peu d'études se sont intéressées à d'autres types d'extraits. L'approche mise en œuvre dans ce travail a alors consisté à étudier de manière plus approfondie l'extrait brut de départ afin de déterminer le ou les composés chimiques responsables de l'activité antimicrobienne et/ou antioxydante de la santoline. Pour ce faire, l'extrait brut a été soumis à un fractionnement bioguidé, les fractions obtenues ayant subi les mêmes tests d'évaluation de leur activité biologique que les extraits bruts de départ en vue de déterminer la(les) fraction(s) responsable(s) de l'activité antimicrobienne et/ou antioxydante de la plante.

2. Fractionnement bioguidé de l'extrait de santoline

2.1. Fractionnement de l'extrait brut

L'extrait brut de départ a été fractionné dans l'objectif d'analyser de manière plus précise sa composition chimique et d'identifier le ou les actif(s) ou les familles d'actifs responsable(s) de son activité biologique. Pour ce faire, un gradient d'élution de polarité croissante de cinq solvants ou mélanges de solvants a été appliqué à l'extrait déposé sous forme sur une colonne ouverte de gel de silice en phase normale.

Cinq fractions ont ainsi été obtenues : tout d'abord, une première fraction cyclohexane (F1), puis une fraction cyclohexane/acétate d'éthyle (F2), une fraction acétate d'éthyle (F3), une fraction acétate d'éthyle/méthanol (F4), et enfin, une fraction méthanol (F5).

Après concentration par évaporation puis lyophilisation, les fractions ont été pesées, puis analysées par HPLC-DAD-ELSD afin d'apprécier la qualité de la séparation et la composition chimique de chaque fraction. La **Figure 20** montre les chromatogrammes HPLC-ELSD obtenus pour les fractions par comparaison avec l'extrait brut de départ.

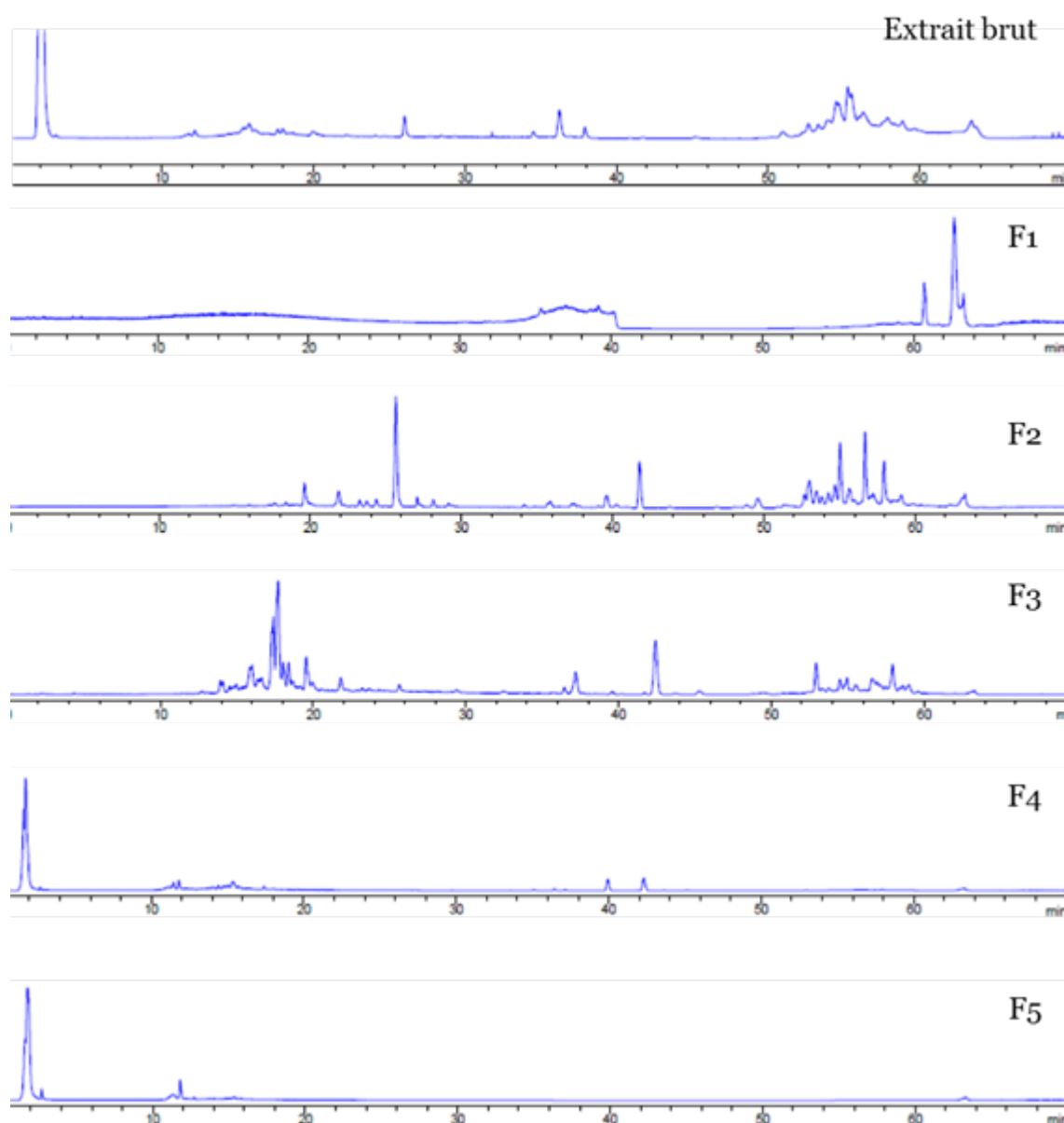


Figure 20 : Chromatogrammes HPLC-ELSD des fractions obtenues à partir de l'extrait brut de santoline

F1 cyclohexane (8 mg) ; F2 cyclohexane:acétate d'éthyle 1:1 v/v (249 mg) ;
F3 acétate d'éthyle (88 mg) ; F4 acétate d'éthyle:méthanol 1:1 v/v (781 mg) ;
F5 méthanol (412 mg)

Ces derniers permettent d'observer une bonne séparation des différents types de composés selon leur polarité, c'est-à-dire que la purification est plutôt efficace puisqu'elle a permis de retrouver un même type de composés dans une seule, voire deux fractions au maximum. Par exemple, la fraction F1 a permis l'élimination des composés de type pigments et cires végétales, et les fractions F4 et F5, celle des composés très polaires de type hydrates de carbone, que l'on retrouve dans le « volume mort » de la colonne lors de l'analyse HPLC. Cela n'est pas toujours le cas : en effet, un second fractionnement sur phase inverse C18 a été réalisé à partir du même extrait brut mais la séparation entre les différents types de molécules s'est révélée beaucoup moins satisfaisante, c'est pourquoi les résultats obtenus ne seront pas présentés, et le travail n'a pas été poursuivi sur ces fractions.

Les fractions ont ensuite été soumises à l'évaluation de leur activité antimicrobienne afin de confirmer l'activité de l'extrait brut de départ et surtout de déterminer la ou les fractions responsables de l'activité en question.

2.2. Étude de l'activité antimicrobienne des fractions obtenues

En raison de la très faible quantité obtenue pour la fraction F1 (8 mg), celle-ci a été écartée et n'a pas été soumise aux tests d'activité biologique. Les autres fractions ont été évaluées selon un protocole similaire à celui appliqué aux extraits bruts (**Partie Expérimentale, 2.4.**).

Les fractions ont été diluées dans du DMSO pour des raisons de solubilité, à une concentration de 100 mg/mL en partant du principe qu'elles ne représentent chacune qu'une part de l'extrait brut de départ, donc que les actifs, s'ils sont présents, sont potentiellement plus concentrés. Aussi, pour cette même raison, la concentration mise en œuvre dans les tests d'activité est dans ce cas de 0,4 % (concentration massique), soit la même concentration que le témoin positif méthylparabène. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Activité antimicrobienne des fractions de santoline (0,4 %)

Fraction	Activité antimicrobienne à 0,4 %							
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Aspergillus brasiliensis</i>		<i>Candida albicans</i>	
	24 h	48 h	48 h	72 h	48 h	72 h	24 h	48 h
F2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
F3	-	-	-	-	+++	+++	+++	~
F4	-	~	-	-	+	-	-	-
F5	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrait brut (2 %)	+++	+++	-	-	+++	+++	++	~
Témoin positif (0,4 %)	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++

+++ : activité $\geq 90\% \leq$ activité $\leq 100\%$; ++ : $70\% \leq$ activité $\leq 90\%$; + : $60\% \leq$ activité $\leq 70\%$; ~ : $40\% \leq$ activité $\leq 60\%$; - : activité $\leq 40\%$

Les résultats obtenus pour l'extrait brut de santoline ont été reportés en bas de tableau afin de comparer ces résultats à ceux obtenus pour les fractions. La fraction F2 présente une activité particulièrement intéressante et surtout comparable à celle du témoin positif, puisqu'elle est active contre les quatre souches microbiennes testées : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. brasiliensis* et *C. albicans*. La fraction F3, quant à elle, est active contre une seule souche, à savoir *A. brasiliensis*, et modérément active contre *P. aeruginosa*. Les fractions F4 et F5 ne présentent aucune activité notable contre les souches évaluées, si ce n'est une activité modérée contre *A. niger* pour F4.

Par conséquent, la fraction F2 est une fraction d'intérêt majeur. Elle présente un composé majoritaire éluant à 26 min (**Figure 21**, encadré rouge), absent des autres fractions, qui pourrait être responsable d'une partie de l'activité antimicrobienne observée.

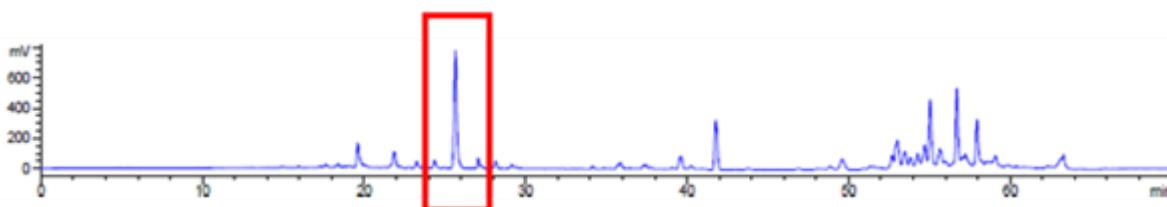


Figure 21 : Composé majoritaire de la fraction F2 de santoline ($t_R = 26$ min)

La fraction F3, en revanche, bien qu'active contre deux souches, ne présente pas de composé largement majoritaire, on peut en conclure que plusieurs composés sont responsables de l'activité observée.

L'activité antimicrobienne de la fraction F2 étant particulièrement intéressante, il a été décidé de se focaliser essentiellement sur le potentiel antimicrobien de la santoline pour la poursuite des activités.

L'activité antioxydante observée est également intéressante, mais ne se démarque pas autant que l'activité antimicrobienne, en particulier au niveau des fractions de

l'extrait. Celles-ci ont, en effet, également été soumises aux tests d'activité antioxydante appliqués aux extraits bruts, mais les résultats ne se sont pas avérés concluants, c'est pourquoi cet aspect n'a pas été approfondi et ces résultats ne seront pas présentés dans cette étude. L'activité antioxydante de la santoline est alors considérée comme une valeur ajoutée, complémentaire à l'activité antimicrobienne préalablement identifiée.

3. Étude de la fraction active F2

3.1. Isolement du composé majoritaire

Afin de déterminer la nature du composé majoritaire présent dans la fraction F2 de l'extrait de santoline, ce dernier a été purifié par HPLC semi-préparative. Pour ce faire, une colonne de diamètre plus important a été utilisée et le gradient mis en œuvre a été optimisé afin de permettre une séparation optimale du composé d'intérêt et dans l'objectif d'isoler une sous-fraction la plus pure possible. La phase mobile contenant le composé d'intérêt a ensuite été récoltée en sortie de colonne, en se basant sur la simple détection UV, l'ELSD étant destructif. Après plusieurs injections successives, la sous-fraction correspondant au composé majoritaire a été concentrée à l'évaporateur rotatif, pesée puis analysée sur la colonne analytique dans les conditions standards afin de vérifier qu'il s'agisse bien du composé d'intérêt identifié au temps de rétention de 26 min.

Cependant, lors du suivi HPLC-DAD-ELSD de la purification de la sous-fraction contenant le composé d'intérêt, il a été constaté que celui-ci se dégradait au cours du temps. Une nouvelle purification a alors été effectuée dans les mêmes conditions concernant le gradient d'élution et la préparation de l'échantillon, mais en prenant des précautions particulières concernant la phase mobile et la concentration de la sous-fraction afin d'éviter une nouvelle dégradation du composé d'intérêt : ainsi, la purification a été faite à l'aide de solvants non acidifiés après un rinçage conséquent de la colonne et de l'HPLC afin d'éliminer un maximum de traces d'acide formique, et la sous-fraction récoltée a été concentrée à l'évaporateur rotatif après chaque injection afin que le composé isolé soit le moins possible au contact de l'eau.

Une analyse par HPLC-DAD-ELSD de la sous-fraction isolée réalisée à l'aide du gradient d'analyse standard appliqué aux extraits bruts et fractions a permis de vérifier qu'il s'agissait bien du composé d'intérêt éluant au temps de rétention $t_R = 26$ minutes, et qu'il ne contenait pas d'impuretés majeures.

La sous-fraction contenant le composé d'intérêt a ensuite été soumise à des techniques d'élucidation structurale (RMN 1D et 2D et spectrométrie de masse) afin d'être caractérisé.

3.2. Caractérisation structurale du composé majoritaire de F2

L'analyse du spectre UV du composé isolé a permis de situer le maximum d'absorption aux alentours de 310 nm.

Des analyses par RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) ont permis d'identifier les corrélations entre les différents atomes constituant le composé d'intérêt et de déterminer ainsi sa structure. Le **Tableau 8** récapitule l'ensemble des corrélations observées. Les spectres 1D et 2D du composé isolé sont présentés dans la partie expérimentale (**Partie Expérimentale, 2.6.3.**).

Les signaux observés à δ_H 2,1 (3H, singulet, H-15) et δ_C 20,5 (C-15) ont permis d'identifier un groupe acétoxy. Les signaux δ_H et δ_C (C2-C3-C4-C5, carbones quaternaires avec des déplacements chimiques compris 64,8 et 80,5) ont suggéré la présence d'une chaîne polyacétylène, cette interprétation ayant pu être confirmée grâce à l'analyse HBMC. Finalement, les analyses structurales ont permis d'identifier le composé d'intérêt comme étant de l'acétate de (5*S*,7*Z*)-7-(hexa-2,4-diyne-1-ylidene)-1,6-dioxaspiro[4,4]nona-2,8-dien-4-yl, dont la structure est présentée dans la **Figure 22**.

Tableau 8 : Attribution des signaux RMN ^1H et ^{13}C (J en Hz) et corrélations 2D du composé majoritaire isolé de la fraction F2 de santoline

C	δ (ppm)	Type de C	δ H (ppm)	Multiplicité (JHz)	COSY	HMBC
1	4,8	CH ₃	2,0	s	-	C7, C8, C2, C11, C5, C3
2	80,5	C _q	-	-	-	-
3	64,8	C _q	-	-	-	-
4	75,2	CH	5,7	d (2,5*)	H13, H12	C15, C13, C9, C10, C12
5	70,3	C _q	-	-	-	-
6	83,1	CH	5,1	br s	-	C7, C8, C2, C11, C5, C3
7	168,9	C _q	-	-	-	-
8	126,1	CH	6,8	d (5,7)	H9	C7, C9, C10
9	133,8	CH	6,3	dd (5,7;1,6)	H8	C7, C8, C10, (C6, C4, C5)
10	117,3	C _q	-	-	-	-
11	77,7	C _q	-	-	-	-
12	100,8	CH	5,2	dd (2,5;3,0)	H13, H4	C10, C4
13	148,6	CH	6,6	d (3,0)	H12, H4	C8, C12, C4
14 (OAc)	170,5	C _q	-	-	-	-
15 (OAc)	20,5	CH ₃	2,1	s	-	C15, C13, C8, C12, C4

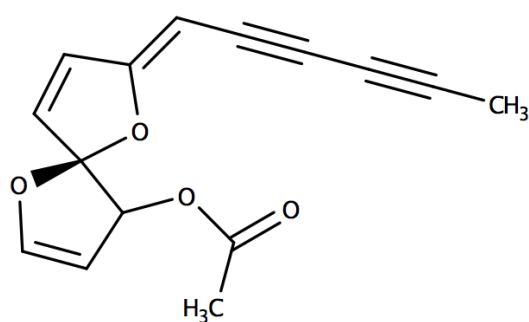


Figure 22 : Composé d'intérêt isolé à partir de la fraction F2 de santoline

Une analyse par UPLC-ESI-HRMS (**Figure 23**) de l'extrait brut a permis de confirmer ces données. En effet, le composé d'intérêt a été identifié au temps de rétention de 8,96 minutes (flèche rouge) avec un rapport m/z égal à 257,0816, soit à la formule chimique $C_{15}H_{13}O_4$ pour $[M+H]^+$. Cela équivaut à la formule chimique du composé d'intérêt : $C_{15}H_{12}O_4$, avec une masse moléculaire égale à 256,0816 g/mol.

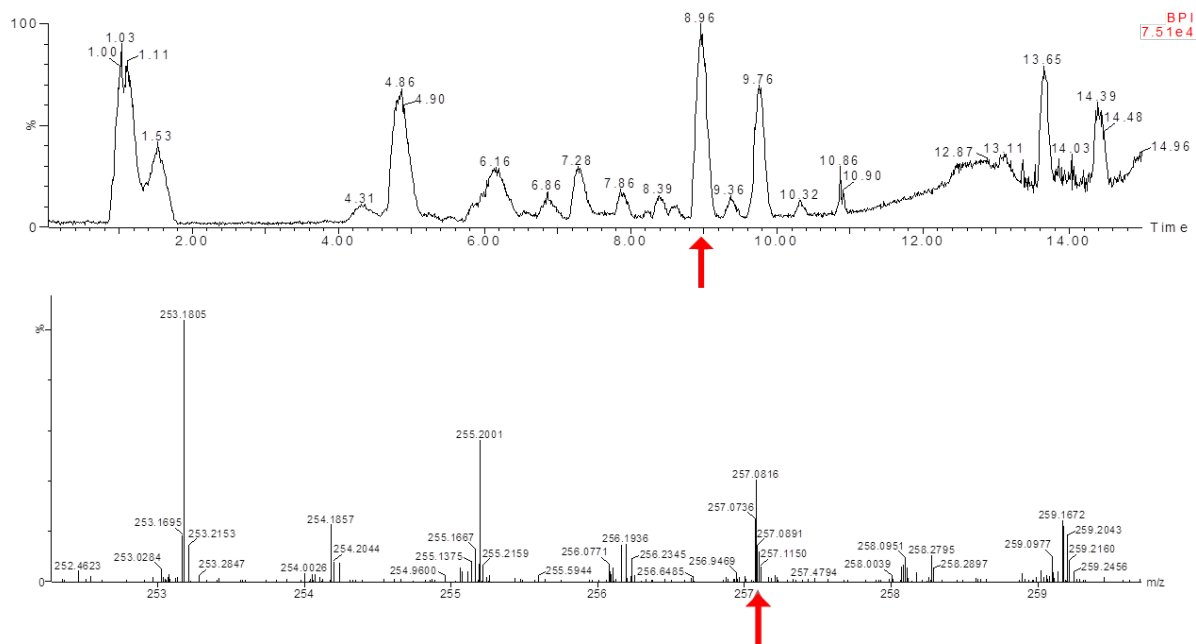


Figure 23 : Analyse UPLC-ESI-HRMS de l'extrait brut de santoline et masse moléculaire du composé isolé

Des recherches bibliographiques ont permis de découvrir que le composé d'intérêt appartient à la famille des polyacétylènes^{102,103}, plus particulièrement des diacétylènes, et qu'il est déjà connu comme métabolite secondaire synthétisé par de nombreuses plantes appartenant à la famille des Astéracées¹⁰³. Sa présence a plus particulièrement été rapportée chez la santoline et d'autres espèces du genre *Santolina*, notamment *S. oblongifolia* et *S. rosmarinifolia*¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Plus connu sous le nom de spirokétal énol, le composé d'intérêt sera appelé « SKE » pour la suite de cette étude.

Le genre *Santolina* a fait l'objet de nombreuses études, notamment à partir de la fin des années 1970 et au cours des années 1970 et est caractérisé par la présence de dérivés acétyléniques¹⁰⁷.

En revanche, parmi la littérature disponible mentionnant le SKE au moment de cette étude, aucune publication ne faisait référence à une quelconque évaluation de son activité antimicrobienne.

3.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne du spirokétal énole (SKE)

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne du SKE, l'idéal aurait été de le mettre en œuvre dans des tests d'activité de la même manière que pour les extraits bruts et fractions. Cependant, son instabilité, en particulier en milieu aqueux, a rendu cette manipulation impossible, puisque les tests d'activité antimicrobienne en plaques 96 puits se déroulent en milieu aqueux. Par conséquent, il n'a pas été possible d'évaluer le potentiel antimicrobien du SKE de manière directe.

Aussi, dans le but d'établir une corrélation entre la teneur en SKE de l'extrait brut de santoline et son activité biologique, une première méthode de dosage quantitative absolue par HPLC-ELSD a été développée, mais n'a pas abouti en raison de problèmes de répétabilité de la méthode. Une seconde méthodologie de quantification relative du SKE par HPLC-DAD à une longueur d'onde de 310 nm, correspondant au maximum d'absorption du SKE, a alors été développée. Pour ce faire, une courbe de calibration a été réalisée en utilisant comme standard de l'acide cinnamique commercial (**Figure 24**), dont le temps de rétention est proche de celui du SKE.

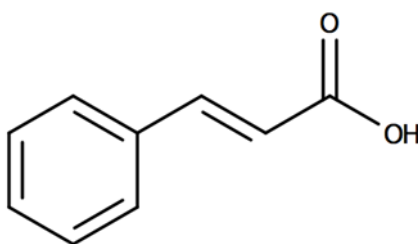


Figure 24 : Acide (*E*)-cinnamique
(CAS 140-10-3)

Après injection des extraits à quantifier en triplicat, la concentration en SKE est ainsi exprimée en milligrammes d'équivalent acide cinnamique par gramme d'extrait brut.

3.3.1. Activité antimicrobienne de la santoline et évaluation de la teneur intraspécifique en SKE

Afin de confirmer la pertinence de cette quantification et de valider l'activité antimicrobienne du SKE, plusieurs extraits de santoline obtenus dans le cadre du projet NATUBAVAL ont été comparés. Les échantillons mis en œuvre proviennent d'origines géographiques variées au sein de la région PACA (**Figure 25**), à savoir Cabris (Alpes-Maritimes), Isola (Alpes-Maritimes), le Mont Coudon (Var) et le Mont Caume (Var) et ont été récoltés à des périodes variables.



Figure 25 : Localisation géographique des différentes stations de prélèvement de la santoline¹⁰⁸

1 : Cabris (alt. 550 m) ; **2** : Isola (alt. 719 m)
3 : Mont Coudon (alt. 702 m) ; **4** : Mont Caume (alt. 804 m)

Les extraits ont été obtenus de la même manière que les extraits bruts initiaux du projet NATUBAVAL. Leur activité antimicrobienne a été évaluée de la même manière que celle des candidats de départ, et leur teneur en SKE a été évaluée grâce à la méthodologie de dosage préalablement développée. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Corrélation entre activité antimicrobienne et teneur en SKE pour des extraits de santoline provenant de trois origines géographiques différentes

Période de récolte	Lieu de récolte	Activité antimicrobienne (bilan final à 2 %)				[SKE] (EAC mg/g)
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>	
Été 2010	Cabris	+++	-	+++	~	7,86 ± 0,20
Hiver 2011- 2012	Isola Village	+++	-	+++	+++	9,09 ± 0,20
Automne 2012	Isola Village	++	++	+++	+++	17,60 ± 0,91
Printemps 2011	Mont Coudon	~	-	-	-	0,30 ± 0,04
Été 2011	Mont Caume	~	-	-	-	Traces

+++ : activité ≥ 90% ≤ activité ≤ 100% ; ++ : 70% ≤ activité ≤ 90%
+ : 60% ≤ activité ≤ 70% ; ~ : 40% ≤ activité ≤ 60% ; - : activité ≤ 40%

L'extrait de santoline présenté en première ligne, provenant de Cabris, est celui évalué dans le cadre du criblage initial et constitue l'extrait de référence de santoline pour cette étude. Les résultats présentés en termes d'activité antimicrobienne sont le bilan des valeurs au dernier temps pris en compte (48 h ou 72 h selon les souches microbiennes) et à une concentration de 2 %.

Ainsi, il est intéressant de constater que plus la teneur en SKE de l'extrait évalué est élevée, plus l'activité antimicrobienne de l'extrait en question est importante. Par exemple, pour les deux extraits d'Isola Village, l'activité passe de trois souches à quatre souches microbiennes lorsque la teneur en SKE passe de 9,09 mg/g à 17,60 mg/g. L'extrait de santoline provenant du Mont Coudon ne présente non seulement qu'une activité antimicrobienne modérée contre *S. aureus*, mais également une concentration en SKE très faible. Il en est de même pour l'extrait du

Mont Caume, ne présentant que des traces non quantifiables de SKE et une activité modérée contre *S. aureus*.

Les données observées ont pu être confirmées par des analyses HPLC-ELSD, les extraits du Mont Coudon et du Mont Caume ne présentant aucun pic au temps de rétention du SKE identifié à $t_R = 26$ minutes sur le chromatogramme de référence (santoline de Cabris), tandis que l'extrait d'Isola Village présente bien le même pic que sur le chromatogramme de référence.

De plus, il est particulièrement intéressant d'observer une corrélation entre la présence de SKE et l'activité antimicrobienne des extraits de santoline contre *A. brasiliensis* et *C. albicans*. En effet, une telle activité est observée uniquement dans les extraits contenant du SKE, et augmente lorsque la concentration en SKE augmente pour devenir maximale lorsque la concentration en SKE est supérieure à 9,1 mg d'EAC par gramme d'extrait.

En revanche, l'activité des extraits contre *S. aureus* semble être indépendante de la présence de SKE, puisque tous les extraits sont actifs contre cette souche, qu'ils contiennent du SKE ou non.

Enfin, il est difficile de conclure quant à une éventuelle corrélation entre la présence de SKE et l'activité antimicrobienne contre *P. aeruginosa*, puisqu'un seul extrait présente une activité contre cette souche, avec une concentration en SKE de 17,6 mg d'EAC par gramme d'extrait.

Avec ces résultats, il n'est pas possible de déterminer si le SKE est seul responsable de l'activité antimicrobienne contre les souches pour lesquelles aucune activité n'est observée en absence de SKE, mais de confirmer l'existence d'une corrélation entre la concentration en SKE et l'activité antimicrobienne globale des extraits.

Les résultats ainsi obtenus permettent de confirmer la pertinence de cette méthodologie de dosage pour des extraits de santoline avec des lieux et des périodes de récolte de la matière première variables. L'objectif suivant a alors été d'évaluer l'influence d'autres paramètres sur la teneur en SKE et l'activité antimicrobienne des

extraits, en vue d'optimiser l'extrait brut de santoline de référence et de développer un nouvel ingrédient naturel pouvant jouer le rôle de conservateur antimicrobien.

3.3.2. Activité antimicrobienne de trois espèces du genre *Santolina* et évaluation de la teneur interspécifique en SKE

Par ailleurs, le SKE ayant été identifié dans plusieurs espèces du genre *Santolina*, Afin de comparer la teneur en actif et d'en déduire l'éventuelle activité d'autre espèces du genre *Santolina*, deux autres espèces ont été étudiées : *S. rosmarinifolia* (également appelée *S. viridis*), la santoline à feuilles de romarin ou santoline verte, et *S. pinnata* ssp. *neapolitana*, la santoline à feuilles de lavande. Les matières premières végétales ont été extraites dans les mêmes conditions que les extraits bruts précédents, et leur teneur en SKE a été évaluée à l'aide de la méthode de dosage préalablement développée.

Les résultats obtenus, en comparaison avec l'extrait de référence présenté en première ligne, sont présentés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Comparaison de la teneur en SKE ente la santoline et deux autres espèces du genre *Santolina*

Extrait	Activité antimicrobienne (bilan final à 2 %)				[SKE] (EAC mg/g)
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>	
<i>S. chamaecyparissus</i>	+++	-	+++	~	7,86 ± 0,20
<i>S. rosmarinifolia</i>	++	-	+++	-	3,97 ± 0,22
<i>S. pinnata</i>	+++	-	-	-	4,57 ± 0,32

+++ : activité ≥ 90% ≤ activité ≤ 100% ; ++ : 70% ≤ activité ≤ 90%
+ : 60% ≤ activité ≤ 70% ; ~ : 40% ≤ activité ≤ 60% ; - : activité ≤ 40%

Les données déjà observées dans la littérature, en particulier concernant *S. rosmarinifolia*¹⁰⁴ sont confirmées, puisque la présence de SKE est avérée. En revanche, cette espèce ne présente une activité similaire à *S. chamaecyparissus* que contre *A. brasiliensis*. L'activité contre *S. aureus* est également présente, mais un peu moins importante que celle observée pour *S. chamaecyparissus*, et il n'y a aucune activité détectée contre *C. albicans*. De même, le SKE est présent chez

S. pinnata mais cette espèce n'est active que contre *S. aureus*. Cette variabilité de l'activité antimicrobienne peut s'expliquer par une éventuelle différence au niveau de la composition chimique des extraits étudiés. Cependant, ne faisant pas l'objet de cette étude, celle-ci n'a pas été étudiée plus en détails, l'objectif étant de valider la pertinence du dosage de l'actif et la corrélation entre l'activité antimicrobienne des extraits et la concentration en actif. *S. chamaecyparissus* demeure l'espèce la plus concentrée en SKE avec les paramètres appliqués pour l'extraction et l'évaluation de l'activité antimicrobienne, cette espèce sera donc conservée pour la suite de l'étude.

En observant le **Tableau 9** et le **Tableau 10**, il est intéressant de remarquer que la présence de SKE (hors traces) est toujours corrélée à une activité contre *A. brasiliensis*. Ainsi, il est possible d'en conclure que l'on peut anticiper l'activité antimicrobienne des extraits évalués lorsque le SKE est présent dans l'extrait, et que cette activité est plus importante (en termes de nombres de souches contre lesquelles on observe une activité) lorsque la concentration en SKE augmente. Il est alors envisageable de s'affranchir des tests d'activité antimicrobienne, puisque l'objectif ici est d'aboutir à un extrait brut optimisé avec une concentration maximale en SKE.

L'objectif final du projet NATUBAVAL étant de développer un extrait techniquement réalisable à l'échelle industrielle et qui puisse jouer le rôle d'ingrédient conservateur dans une formule cosmétique, l'idée suivante a été d'obtenir un extrait brut le plus concentré possible en SKE. Les paramètres mis en œuvre pour l'extraction de la matière première ont alors été appréciés et ajustés en vue d'évaluer leur impact sur la teneur en actif et d'optimiser l'extrait brut de départ.

En vue de l'optimisation de l'extrait brut de santoline, la volonté a été de travailler toujours avec la même matière première, produite dans des conditions identiques afin de ne faire varier que les paramètres évalués ou adaptés dans le cadre de cette optimisation. Afin de pallier les besoins futurs en matière première végétale, des essais de mise en culture par bouturage ont été réalisés par Jean-Pierre Ghérardi (Biophyto) suite à l'identification de la santoline comme principale plante d'intérêt du projet NATUBAVAL. Après bouturage (**Figure 26**), les plants obtenus ont été mis en terre aux Jardins du Musée International de la Parfumerie situés à Grasse (06) (**Figure 27**).



Figure 26 : Boutures réalisées pour les essais de mise en culture de la santoline
Automne 2011 (photo Biophyto)



Figure 27 : Mise en terre des plants bouturés de santoline aux jardins du MIP
Avril 2012, Grasse (photo Biophyto)



Figure 28 : Evolution des plants de santoline aux jardins du MIP
Printemps 2014, Grasse (photo Biophyto)

C'est cette matière première qui a été utilisée pour tous les essais liés à l'optimisation de l'extrait brut de santoline. Pour les quantités de matière première mises en œuvre dans ces essais (une dizaine de kilogrammes tout au plus), cela n'a pas posé de problème, mais il faut remarquer que lors d'une industrialisation, selon les quantités de matière première nécessitées et la dimension des cultures à disposition, il n'est pas toujours possible de travailler sur des lots choisis ne provenant que d'une origine géographique ou d'un cultivar particulier. Il convient alors de mettre en place en amont, dès la réception des lots de plantes sourcés depuis diverses origines géographiques, une méthodologie de contrôle afin de valider rapidement leur teneur en actif avant extraction.

Tout d'abord, afin d'évaluer l'influence d'une production à l'échelle industrielle ou tout du moins semi-industrielle, un premier pilote (qui sera appelé pilote 1 dans la suite de cette étude) a été réalisé par la société Naturex à partir de la santoline mise en culture aux jardins du MIP. Une évaluation de l'activité antimicrobienne ainsi qu'un dosage de l'actif dans cet extrait ont été réalisés et sont présentés dans le **Tableau 11** de manière comparative avec l'extrait de référence.

Tableau 11 : Activité antimicrobienne et teneur en actif du premier essai pilote issu de la santoline des jardins du MIP

Extrait	Activité antimicrobienne (bilan final à 2 %)				[SKE] (EAC mg/g)
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>	
Référence	+++	-	+++	~	7,86 ± 0,20
Pilote 1	+++	-	+++	-	5,84 ± 0,09

+++ : activité ≥ 90% ≤ activité ≤ 100% ; ++ : 70% ≤ activité ≤ 90%
+ : 60% ≤ activité ≤ 70% ; ~ : 40% ≤ activité ≤ 60% ; - : activité ≤ 40%

On peut ainsi constater qu'entre l'extrait de référence et le pilote 1, l'activité antimicrobienne contre *S. aureus* et *A. brasiliensis* est conservée, en revanche l'activité modérée de l'extrait de référence contre *C. albicans* est perdue chez l'extrait pilote. Cet essai se révèle néanmoins très intéressant puisque l'activité principale de l'extrait brut et surtout sa teneur en actif est conservée lors d'une transposition semi-industrielle des conditions opératoires. La légère baisse de la teneur en SKE peut être liée à la variabilité des conditions opératoires et notamment à une durée de concentration plus longue liée à une plus grande quantité d'extrait, donc une exposition à des températures plus élevées un peu plus longue. Ce premier pilote ayant ainsi pu être validé, les essais d'optimisation de l'extrait brut de santoline ont alors pu véritablement démarrer.

4. Optimisation de l'extrait brut de santoline

Dans cette partie consacrée à l'optimisation de l'extrait brut de référence de santoline, l'influence de différents paramètres a été étudiée. Dans un premier temps, l'influence de la partie de la plante traitée lors de l'extraction a été appréciée.

4.1. Optimisation de la matière première végétale : partie de la plante traitée

Dans tous les extraits réalisés et évalués jusqu'à ce stade de l'étude, la partie de la plante traitée était constituée des parties aériennes. Cette démarche était volontaire et le choix s'est porté sur une extraction des parties aériennes dans leur totalité afin d'obtenir des extraits contenant un maximum et une certaine diversité de

métabolites secondaires. Cependant, en fonction de la période de récolte de la plante, celles-ci peuvent présenter, en plus des tiges et des feuilles, des boutons floraux en croissance, des hampes florales pourvues de fleurs en floraison ou en fin de floraison.

Afin d'évaluer l'influence de ce paramètre, différents extraits ont été réalisés dans les mêmes conditions que l'extrait brut de référence, et leur teneur en SKE a été évaluée à l'aide de la méthode de dosage préalablement développée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Dosage de l'actif dans des extraits obtenus à partir de différentes parties de plantes

Extrait	Période de récolte	[SKE] (EAC mg/g)
Référence	Juin 2010	7,86 ± 0,20
Tiges + feuilles + fleurs		32,51 ± 0,05
Tiges + feuilles	Juillet 2013	30,83 ± 1,52
Hampes florale		9,65 ± 0,75
Tiges + feuilles + fleurs		28,18 ± 1,01
Tiges + feuilles	Août 2013	35,05 ± 2,21
Hampes florales		1,31 ± 0,07
Tiges + feuilles + hampes florales		32,79 ± 2,19
Tiges + feuilles	Septembre 2013	57,93 ± 2,99

Les extraits évalués ont été réalisés à partir de matériel végétal prélevé pendant la période de floraison de la santoline, et plus particulièrement entre juillet à septembre 2013. La matière première prélevée en juin et en juillet a conduit à la réalisation de trois extraits : un premier contenant la totalité de la matière première (tiges, feuilles et fleurs), un second constitué uniquement de tiges et de feuilles, et un troisième constitué des hampes florales seules.

On constate que le premier et le second extrait du mois de juillet présentent une concentration en SKE relativement proche (32,51 et 30,83 mg/g d'EAC), tandis que cette dernière passe de 28,18 à 35,05 mg/g d'EAC pour les extraits du mois d'août. La concentration en SKE des extraits de hampes florales est, quant à elle, considérablement plus faible, puisqu'elle n'atteint que 9,64 mg/g d'EAC au mois de

juillet, et chute encore plus drastiquement en août avec seulement 1,31 mg/g d'EAC. En septembre, la période de floraison touchant à sa fin et les hampes florales ne portant plus de fleurs fraîches, seuls deux extraits ont été réalisés : tiges, feuilles et hampes florales, et tiges et feuilles sans hampes florales. Les hampes florales seules n'ont pas été analysées en raison de leur concentration quasiment nulle en SKE dans l'extrait du mois d'août.

On remarque une nette augmentation de la teneur en SKE pour l'extrait de tiges et feuilles du mois de septembre (57,93 mg/g d'EAC contre 32,79 mg/g d'EAC pour le premier extrait), qui présente également la valeur la plus importante jusqu'alors observée parmi tous les extraits de santoline analysés. En conclusion, il est préférable d'écartier les hampes florales des parties aériennes afin de garantir une teneur maximale en SKE. En revanche, il est difficile de conclure quand à une éventuelle relation entre ces résultats et la teneur en SKE de l'extrait de référence, puisque ce dernier ne provient pas de la même matière première.

La corrélation entre l'activité antimicrobienne et la concentration en SKE des extraits ayant été préalablement démontrée, l'optimisation de l'extrait brut de santoline a été poursuivie en adaptant un seul paramètre : le solvant ou système de solvants utilisé pour l'extraction de la matière première.

D'autres paramètres, tels que le procédé utilisé pour l'activation de l'extraction de la matière première végétale, auraient également pu faire l'objet d'une optimisation. En effet, de nombreuses méthodes d'activation permettant l'extraction des matières premières végétales existent et possèdent chacune leurs avantages et inconvénients. Parmi elles, l'UAE (*Ultrasound-Assisted Extraction*) ou extraction assistée par ultrasons, ou encore la MAE (*Microwave-Assisted Extraction*) ou extraction assistée par micro-ondes. Cependant, l'objectif principal du projet NATUBAVAL n'étant pas d'évaluer plusieurs méthodes d'extraction ou d'innover dans ce sens, mais plutôt de rester dans l'optique d'une faisabilité et reproductibilité technique au niveau industriel, en privilégiant des méthodes écoresponsables, il a été décidé d'étudier la capacité d'optimisation de la méthode d'extraction initialement mise en œuvre dans le criblage de départ, soit l'extraction solide-liquide par macération.

4.2. Optimisation du solvant d'extraction

Dans un premier temps, l'influence d'une modification du système de solvants jusqu'alors utilisé pour l'extraction a été évaluée, à savoir l'eau et l'éthanol. Le protocole d'extraction appliqué a été le même, avec comme seule variable la composition des solvants. Sept extraits ont ainsi été obtenus à partir de la santoline mise en culture aux jardins du MIP, puis analysés par HPLC-DAD pour doser l'actif : 100 % eau, eau:éthanol 80:20 v/v, eau:éthanol 60:40 v/v, eau:éthanol 40:60 v/v, eau:éthanol 20:80 v/v, 100 % éthanol, 100 % éthanol absolu (99 %). Les résultats du dosage du SKE sont présentés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Influence du solvant d'extraction sur la teneur en actif
Extraits obtenus à l'aide d'un mélange eau/éthanol
à concentration croissante en éthanol (0-100 %)

Extrait	[SKE] (EAC mg/g)
Référence	7,86 ± 0,20
100 % eau	0,00
20 % éthanol	0,00
40 % éthanol	0,29 ± 0,02
60 % éthanol	2,93 ± 0,42
80 % éthanol	19,92 ± 1,20
100 % éthanol	15,04 ± 1,37
100 % éthanol abs.	8,54 ± 0,37

En observant les résultats obtenus, on constate que la concentration la plus importante en actif, et par conséquent l'extrait le plus intéressant dans cet objectif d'optimisation est celui constitué à 80 % d'éthanol. Par conséquent, la combinaison eau/éthanol mise en œuvre dès le départ (éthanol:eau 75:25 v/v) semble pertinente, puisque l'eau ou l'éthanol seuls ne permettent pas une extraction optimale du SKE, lorsqu'il est extrait. De même, les autres combinaisons éthanol/eau ne permettent pas d'obtenir une quantité équivalente ou supérieure en SKE.

Afin d'explorer la piste du solvant utilisé pour l'extraction, d'autres solvants ont été utilisés afin d'obtenir de nouveaux extraits de santoline, toujours dans les mêmes

conditions opératoires, et de réaliser un dosage de l'actif. Ainsi, six extraits supplémentaires ont été réalisés à l'aide des solvants suivants : acétone, acétate d'éthyle (EtOAc), tétrahydrofurane (THF), 2-méthyltétrahydrofurane (2-MeTHF), méthanol (MeOH) et dichlorométhane (CH₂Cl₂). Les concentrations en SKE observées sont présentées dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Influence du solvant d'extraction
Extraits obtenus à l'aide de différents solvants organiques

Extrait	[SKE] (EAC mg/g)
Référence	7,86 ± 0,20
Acétone	33,28 ± 1,34
EtOAc	20,62 ± 0,05
THF	7,81 ± 0,39
2-MeTHF	14,69 ± 0,95
MeOH	38,85 ± 1,09
CH ₂ Cl ₂	41,58 ± 0,83

Parmi les solvants évalués, tous semblent permettre une meilleure extraction de l'actif en comparaison avec le témoin de référence (7,86 mg/g EAC), sauf le THF qui présente une concentration en SKE similaire (7,81 mg/g EAC). Cependant, deux solvants se démarquent plus particulièrement, à savoir le méthanol et le dichlorométhane, puisqu'ils permettent d'obtenir une concentration particulièrement élevée en SKE (respectivement 38,85 et 41,58 mg/g d'EAC. En revanche, pour des raisons de toxicité (classification comme solvant CMR : cancérigène, mutagène, reprotoxique) et d'éco-incompatibilité évidentes, le dichlorométhane a été écarté.

En effet, selon le portail des substances chimiques de l'INERIS (Institut national de l'environnement industriel et des risques)¹⁰⁹ et l'ECHA (*European Chemicals Agency*, Agence européenne des produits chimiques)¹¹⁰, il fait partie des solvants indésirables, en particulier pour son caractère cancérigène et son impact environnemental néfaste. Le méthanol, bien qu'également toxique par voie orale et par inhalation pour l'organisme humain¹¹¹ est préférable au dichlorométhane et

considéré comme « acceptable » en chimie verte. De plus, au niveau industriel, c'est un solvant couramment utilisé, à condition d'en contrôler toutes traces résiduelles dans les produits commercialisés afin de répondre aux lignes directrices de l'ICH Q3C relatives aux solvants résiduels. Ces derniers sont considérés comme des « entités chimiques clairement identifiées », et plus généralement des « données utilisées pour l'évaluation de la sécurité pour la santé humaine d'un ingrédient à usage cosmétique » faisant partie des recommandations de l'ANSM aux « fabricants ou aux responsables de la mise sur le marché relatives à l'évaluation de la sécurité pour la santé humaine d'un ingrédient ou d'une combinaison d'ingrédients à usage cosmétique »¹¹². Non obligatoire dans le domaine cosmétique, le suivi de cette recommandation confère néanmoins un gage supplémentaire de qualité aux produits commercialisés.

Finalement, bien qu'il ne soit pas forcément recommandé pour l'obtention d'ingrédients cosmétiques, le méthanol reste compatible d'un point de vue technique et réglementaire et constitue le solvant le plus intéressant dans le cadre de l'optimisation du système de solvants mis en œuvre pour l'extraction de la matière première. L'éthanol aurait été le solvant idéal d'un point de vue « chimie verte » et réglementation cosmétique, et surtout une alternative préférable au méthanol, mais n'a malheureusement pas aussi bien répondu que le méthanol à l'objectif d'optimisation de l'extrait brut de santoline.

4.3. Validation du méthanol comme solvant d'extraction

Afin de confirmer le choix du méthanol comme solvant d'extraction pour l'obtention d'un extrait optimisé, des essais ont été réalisés au laboratoire à partir de la santoline des jardins du MIP, en suivant le protocole d'extraction original à l'exception du solvant d'extraction, ici constitué uniquement de méthanol. Les trois extraits obtenus ont été analysés, leur teneur en SKE a été évaluée et les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Validation du méthanol comme solvant d'extraction

Extrait	[SKE] (EAC mg/g)
Référence	7,86 ± 0,20
<i>Référence MeOH</i>	38,85 ± 1,09
MeOH 1	52,89 ± 2,17
MeOH 2	31,14 ± 0,79
MeOH 3	46,87 ± 2,83

Malgré des différences notables parmi les résultats obtenus, l'on peut constater que la concentration en actif reste élevée lorsque le méthanol constitue le solvant d'extraction de la matière première. Globalement, la concentration en actif est entre quatre et six fois supérieure à celle de l'extrait de référence. Cela confirme donc le réel intérêt du méthanol, qui a alors été choisi comme solvant d'extraction pour la réalisation d'un second pilote industriel.

4.4. Réalisation d'un second pilote industriel

Ce second pilote industriel (qui sera appelé pilote 2 pour la suite de l'étude) a également été réalisé par la société Naturex à partir de la santoline issue des jardins du MIP. L'extrait obtenu a été dosé en actif et il a été décidé de réaliser également des tests d'activité antimicrobienne, afin de permettre une meilleure comparaison avec l'extrait de référence et le premier essai pilote. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 16**.

Tableau 16 : Activité antimicrobienne et teneur en actif du second essai pilote MeOH issu de la santoline des jardins du MIP

Extrait	Activité antimicrobienne (bilan final à 2 %)				[SKE] (EAC mg/g)
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>	
Référence	+++	-	+++	~	7,86 ± 0,20
Référence MeOH	N/A	N/A	N/A	N/A	38,85 ± 1,09
Pilote 2	+++	~	+++	+	32,62 ± 0,71

+++ : activité ≥ 90% ≤ activité ≤ 100% ; ++ : 70% ≤ activité ≤ 90%
 + : 60% ≤ activité ≤ 70% ; ~ : 40% ≤ activité ≤ 60% ; - : activité ≤ 40%

Il est très intéressant de constater que la concentration en actif du pilote 2 est presque aussi élevée que celle de l'extrait de référence obtenu au MeOH, et plus de 4 fois supérieure à l'extrait de référence de santoline. De plus, par rapport au premier pilote qui n'était véritablement actif que contre deux souches microbiennes (*S. aureus* et *A. brasiliensis*) et de manière modérée, l'activité contre *S. aureus* et *A. brasiliensis* est conservée pour le second pilote, additionnée d'une activité (+) contre *C. albicans*, et d'une activité modérée contre *P. aeruginosa*, ce qui est observé pour la première fois avec un extrait brut de *S. chamaecyparissus*.

Ainsi, ce pilote méthanol semble très pertinent en vue du développement à l'échelle industrielle d'un extrait conservateur de santoline. En revanche, un problème majeur, du moins d'un point de vue cosmétique, s'est posé en vue de l'incorporation d'un tel extrait dans une formule cosmétique : sa couleur. En effet, la cosmétique dite « blanche » constitue une grande partie du marché. Ainsi, une coloration des produits non volontaire, n'est pas vendeuse d'un point de vue marketing et surtout peu attirante pour le consommateur. Un extrait végétal brut contient par nature des pigments tels que la chlorophylle, un pigment caractéristique des feuilles, responsables d'une couleur intense. Une incorporation dans une crème par exemple, même à faible concentration, aurait pour conséquence l'obtention d'une crème avec une couleur verdâtre. C'est pourquoi la décoloration a constitué la seconde phase d'optimisation de l'extrait brut de santoline, dans l'objectif d'obtenir une couleur d'extrait acceptable pour une incorporation en cosmétique.

5. Optimisation de la couleur : décoloration de l'extrait brut de santoline

Les essais de décoloration de l'extrait brut de santoline ont été réalisés à l'aide de deux méthodes : la distillation moléculaire et la décoloration au charbon actif.

5.1. Décoloration par distillation moléculaire

Cette première méthode de décoloration s'est particulièrement développée au cours des années 1940¹¹³ et est utilisée notamment dans les domaines de la parfumerie et de la cosmétique. Dans le cas des matières premières cosmétiques, elle est par exemple utilisée à des fins de désodorisation (afin d'éliminer des odeurs indésirables) ou de purification (afin d'éliminer des impuretés). Il s'agit d'une technique de distillation sous vide poussé à haute température, qui possède comme principal avantage de ne nécessiter qu'un temps de contact très court – de l'ordre de quelques secondes – entre l'échantillon à décolorer et le dispositif de distillation. Le temps de chauffe de l'échantillon à décolorer est par conséquent très court, ce qui permet d'éviter la dénaturation des molécules sensibles à la chaleur^{113,114}.

Les essais de décoloration par distillation moléculaire ont été réalisés par la société Newonat sur les deux pilotes de santoline, cette technique nécessitant une quantité minimale d'extrait d'une centaine à quelques centaines de grammes afin de garantir une bonne reproductibilité de la méthode. Les extraits bruts étant solides à température ambiante et très visqueux à chaud, ils n'ont pas pu être traités en l'état en distillation moléculaire. Ils ont donc été solubilisés dans un mélange de solvants constitué d'un solvant dit « lourd » qui ne distille pas, et d'un solvant dit « léger », qui distille et qui a pour but de jouer le rôle de support pour l'extrait, et en particulier l'actif. Les solvants mis en œuvre ont été choisis après concertation par Naturex et Newonat, tous deux spécialistes en la matière.

5.1.1. Essais sur le pilote 1

L'extrait brut a été solubilisé dans un mélange d'huile de tournesol et de triglycérides à chaîne moyenne (TCM). Étant très difficilement soluble dans les solvants testés, deux phases ont été obtenues : une phase insoluble solide à température ambiante, et

une phase huileuse noire (dite mélange 1). La phase insoluble a pu être partiellement solubilisée dans un macrogol, le PEG 600 (polyéthylène glycol de masse moléculaire 600 g/mol), pour constituer le mélange 2.

Un premier essai (essai 1) a été réalisé sur le mélange 1 et a permis d'obtenir un distillat et un résidu non distillé (**Figure 29**). Le distillat se présente sous la forme d'un liquide translucide de couleur jaune-orangée contenant les TCM (solvant léger) et les molécules volatiles. Le résidu de l'essai 1 se présente sous la forme d'une huile de couleur verte, contenant l'huile de tournesol (solvant lourd) et les molécules non volatiles de l'extrait, dont les pigments.

Un second essai (essai 2) a ensuite été réalisé sur le mélange 2. En revanche, en raison du grand nombre de particules insolubles, aucun distillat n'a pu être obtenu. Seul un résidu solide de couleur verte (**Figure 29**) a été obtenu. Celui-ci contient le PEG 600 ainsi que les molécules insolubles dans le mélange 1, dont également des pigments comme l'indique sa couleur.



Figure 29 : Essais de décoloration par distillation moléculaire sur le pilote 1
Essai 1 : distillat et résidu ; Essai 2 : résidu

La **Figure 30** récapitule les essais effectués sur le pilote 1.

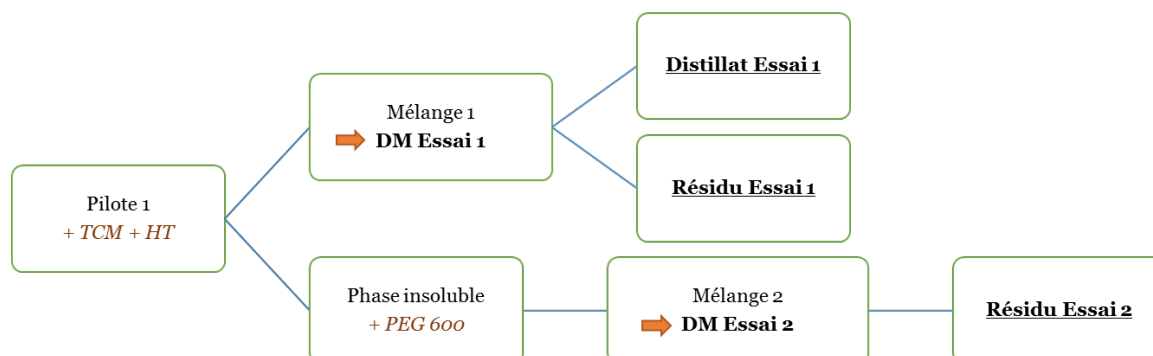


Figure 30 : Schéma explicatif des essais de décoloration moléculaire réalisés sur le pilote 1

TCM : triglycérides à chaîne moyenne, *PEG* : polyéthylène glycol ; *HT* : huile de tournesol ; *DM* : distillation moléculaire

La couleur du distillat montre que la décoloration a bien fonctionné. Une analyse qualitative par HPLC-ELSD du distillat et des deux résidus obtenus a permis de confirmer la présence de l'actif, bien qu'en faible quantité, dans le distillat. L'actif semblait cependant absent des deux résidus, ou alors sous forme de traces. Le distillat a alors été soumis à des tests d'activité antimicrobienne, réalisés dans les mêmes conditions de test que celles appliquées aux autres extraits dont l'activité antimicrobienne a été évaluée. Le **Tableau 17** montre l'activité antimicrobienne du distillat en comparaison avec celle de l'extrait de santoline de référence.

Tableau 17 : Activité antimicrobienne du distillat obtenu par distillation moléculaire sur le pilote 1

Extrait	Activité antimicrobienne (bilan final à 2 %)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
Référence	+++	-	+++	~
Distillat pilote 1	-	-	-	-

+++ : activité $\geq 90\%$; ++ : $70\% \leq$ activité $\leq 90\%$
 + : $60\% \leq$ activité $\leq 70\%$; ~ : $40\% \leq$ activité $\leq 60\%$; - : activité $\leq 40\%$

Ainsi, le distillat obtenu suite à la décoloration par distillation moléculaire du pilote 1 ne présente aucune activité antimicrobienne contre les quatre souches testées. Ce résultat est cependant à nuancer car la préparation d'échantillon a été effectuée dans les mêmes conditions que pour un extrait brut classique, à 200 mg/mL. Or le distillat se trouvant sur support TCM, l'actif se retrouve fortement dilué, ce qui peut expliquer l'absence d'activité antimicrobienne.

En conclusion, l'extrait pilote 1 ne s'est pas avéré optimal pour une utilisation en l'état pour une décoloration par distillation moléculaire. Les essais de solubilisation dans les différents solvants ont donné des résultats moyennement satisfaisants, l'extrait n'a donc pas pu être traité dans les meilleures conditions. Malgré tout, une partie de l'extrait, contenant une faible quantité d'actif, a pu être décoloré. Bien que les résultats soient décevants en termes d'activité antimicrobienne, ils semblent plutôt prometteurs en termes de couleur. C'est pourquoi des essais complémentaires ont été réalisés sur le pilote 2 de santoline afin d'évaluer l'efficacité de la distillation moléculaire sur un extrait obtenu au méthanol.

5.1.2. Essais sur le pilote 2

Au vu des problèmes de solubilisation de l'extrait brut rencontrés dans le cadre des essais sur le pilote 1, le protocole a été adapté dans le but d'améliorer le rendement de la manipulation. Ainsi, deux mélanges ont été préparés à partir de l'extrait brut, qui a été divisé en deux parties : un premier mélange constitué de la première partie de l'extrait brut à décolorer, de TCM (solvant léger) et de PEG (solvant lourd), et un second mélange constitué de l'autre partie de l'extrait brut à décolorer, de TCM (solvant léger) et d'huile de tournesol (solvant lourd). Ce second mélange ayant mené à une partie insoluble comme dans les essais sur le pilote 1, celle-ci a été éliminée et le mélange 2 est donc constitué uniquement de la partie soluble.

Quatre essais ont été réalisés au total (**Figure 31**) : le premier essai (essai 1) a été effectué sur le mélange 1. Cependant, certaines particules étant insolubles dans le mélange de solvants, d'où un mauvais fonctionnement de la distillation moléculaire, aucun distillat n'a été obtenu. Le second (essai 2) a été réalisé sur le mélange 2 et s'est avéré plus fructueux, probablement grâce à l'élimination des insolubles, et a

permis d'obtenir un distillat, toutefois très coloré. Le troisième essai a été réalisé sur le résidu de l'essai 1 (essai 3), et a permis d'obtenir un distillat, lui aussi très coloré. Enfin, le quatrième essai a été réalisé sur le mélange des distillats des essais 2 et 3 (essai 4) et permet d'obtenir un distillat final de couleur orange, d'aspect trouble et chargé à température ambiante, contenant donc la totalité des molécules volatiles distillées lors des différents essais et les TCM en guise de support.

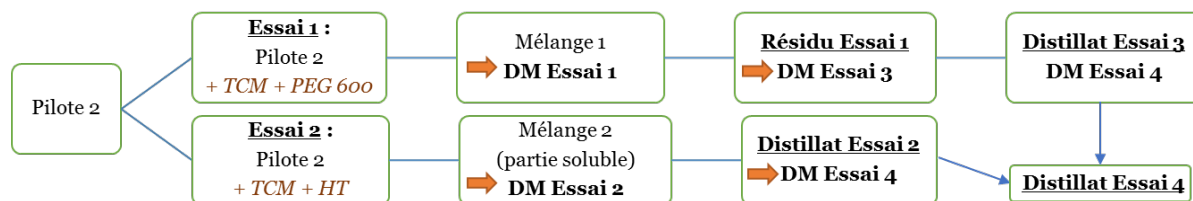


Figure 31 : Schéma explicatif des essais de décoloration moléculaire réalisés sur le pilote 2

TCM : triglycérides à chaîne moyenne, *PEG* : polyéthylène glycol ; *HT* : huile de tournesol ; *DM* : distillation moléculaire

Ce distillat issu de l'essai 4 a fait l'objet d'une analyse qualitative par HPLC-ELSD afin d'identifier si l'actif y était présent. Il semblait y être présent, mais également en faible quantité comme dans le cas du pilote 1. Ne sachant pas quelle était la proportion d'extrait dans le distillat, il n'était pas possible de réaliser un dosage classique du SKE par HPLC-DAD comme pour les extraits bruts. Un dosage des acides gras contenus dans les TCM par chromatographie en phase gazeuse aurait été une possibilité en ce sens. Connaissant la teneur en TCM dans le distillat, il aurait été possible d'ajuster la concentration mise en œuvre afin de réaliser un dosage de l'actif et une évaluation de l'activité antimicrobienne du distillat pertinents. Il aurait également été envisageable d'utiliser d'autres solvants et de tenter une optimisation du protocole de décoloration par distillation moléculaire, mais les résultats n'ayant pas été aussi satisfaisants qu'attendus, cette piste n'a pas été poursuivie.

En conclusion, la décoloration par distillation moléculaire des extraits pilote NATUBAVAL a permis d'éliminer les composés non volatils, en particulier les pigments responsables de la couleur de l'extrait. En revanche, elle n'a pas réellement permis de récupérer l'actif de manière significative, d'autant plus que celui-ci se

retrouve sur un support TCM difficile à éliminer dans le distillat obtenu à l'issue de la décoloration. En ce sens, la décoloration par distillation moléculaire ne semble pas présenter de réel intérêt par rapport à l'objectif initial de la décoloration, qui était l'obtention d'un extrait acceptable pour une application cosmétique en termes de couleur et plus concentré en actif que l'extrait brut de départ.

De plus, en termes de faisabilité, c'est une méthode perfectible, notamment en raison de la faible solubilité des extraits manipulés dans les solvants utilisés pour réaliser la distillation moléculaire. Il aurait donc été intéressant de poursuivre l'optimisation de cette méthode, en particulier concernant la mise au point de cette étape de solubilisation, en recherchant d'autres solvants compatibles avec la distillation moléculaire et permettant une meilleure solubilisation de l'extrait brut de départ. Par ailleurs, il est important de nuancer qu'un tel extrait sur support nécessiterait une compatibilité totale du solvant mis en œuvre, sous peine de devoir l'éliminer avant d'envisager toute étape de formulation.

Enfin, cette méthode de décoloration n'étant pas réalisable directement chez Naturex, sa réalisation nécessiterait forcément de passer une externalisation de la manipulation, non seulement plus coûteuse, mais également chronophage, ce qui n'est pas forcément compatible avec la volonté initiale du projet qui est de développer un ingrédient cosmétique productible dans sa totalité au sein de la société Naturex. La décoloration par distillation moléculaire n'a donc pas été retenue pour la suite du projet.

C'est pour ces raisons qu'une seconde technique de décoloration a été évaluée : la décoloration au charbon actif.

5.2. Décoloration au charbon actif

La décoloration au charbon actif est une technique ancienne utilisée également pour ses propriétés de purification. Connue depuis l'Antiquité¹¹⁵, elle est appliquée dans de nombreux domaines : les filtres à charbon permettent notamment la purification de l'air ou l'assainissement de l'eau. Au niveau médical, le charbon végétal actif est utilisé par exemple pour ses propriétés détoxifiantes. De plus, le charbon actif, en particulier d'origine végétale, est une solution reconnue comme étant écologique et qui trouve parfaitement sa place dans une démarche orientée vers un développement durable.

Relativement facile à mettre en œuvre sur le plan technique, cette méthode permet d'éliminer les molécules indésirables par adsorption sur le charbon activé en ajoutant simplement le charbon actif sous forme de poudre à l'extrait sous forme liquide. Le charbon actif retenant les composés indésirables peut, une fois la purification effectuée, être facilement éliminé par filtration. La réussite de cette méthode dépend néanmoins d'un facteur essentiel : il faut que les molécules qui souhaitent être conservées dans l'extrait final ne soient pas adsorbées par le charbon actif. La première étape a alors été de vérifier que l'actif reste bien présent une fois l'extrait mis en œuvre décoloré.

Le méthanol ayant été sélectionné comme solvant d'extraction dans le cadre de l'optimisation de l'extrait brut de santoline, les essais de décoloration présentés ici ne concernent que des extraits obtenus au méthanol. Afin de comparer une décoloration réalisée sur un extrait obtenu en laboratoire et sur un extrait pilote, les essais ont été réalisés sur un premier extrait décoloré directement suite à l'extraction de la matière première, et sur le pilote 2.

Les extraits décolorés ainsi obtenus, de couleur marron clair, ont été analysés par HPLC-ELSD et un dosage de l'actif par HPLC-DAD a également été réalisé. La **Figure 32** présente les chromatogrammes obtenus pour le pilote 2 brut et le pilote 2 décoloré.

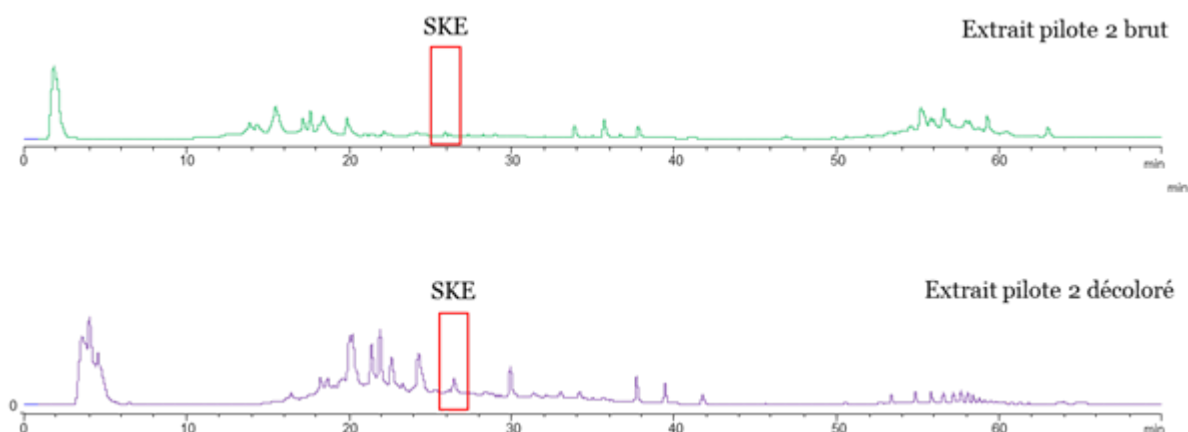


Figure 32 : Analyse qualitative par HPLC-ELSD de l'extrait pilote 2 avant et après décoloration au charbon actif

L'extrait décoloré présente toujours une composition relativement complexe, mais de nombreux composés apparaissent sous forme de pics beaucoup mieux résolus, témoignant d'une certaine purification de l'extrait. On peut notamment constater une nette diminution des composés apolaires éluant à partir de 50 minutes d'analyse, ce qui se traduit par exemple par l'élimination des pigments responsables de la couleur verte de l'extrait brut de départ.

Le **Tableau 18** présente les résultats du dosage de l'actif sur les extraits décolorés en comparaison avec les extraits bruts correspondant et l'extrait de santoline de référence.

Tableau 18 : Teneur en actif des extraits méthanoliques après décoloration au charbon actif

Extrait	[SKE] (EAC mg/g)
Référence	7,86 ± 0,20
<i>Référence MeOH</i>	38,85 ± 1,09
MeOH décoloré	48,59 ± 2,53
Pilote 2	32,62 ± 0,71
Pilote 2 décoloré	46,87 ± 2,83

Il est très intéressant de constater que dans les deux cas, la décoloration des extraits bruts permet une augmentation significative de la concentration en SKE, de l'ordre de 19 % dans le cas de l'extrait brut « laboratoire », et l'ordre de 15 % dans le cas de l'extrait pilote. Cela démontre que la décoloration des extraits méthanoliques de santoline au charbon actif permet une véritable concentration en actif, tout en optimisant la couleur des extraits ainsi obtenus par élimination des pigments responsables de leur couleur verte.

En conclusion, parmi les deux méthodes de décoloration évaluées, celle au charbon actif s'est révélée plus facile à mettre en œuvre et plus efficace en termes de concentration de l'actif, puisque celle-ci peut être déterminée directement à partir des extraits décolorés obtenus, ceux-ci étant concentrés et non sur un support dont on ne connaît pas la proportion comme c'est le cas dans la distillation moléculaire.

Par ailleurs, la technique de décoloration au charbon actif est compatible et surtout transposable au niveau industriel chez Naturex, puisqu'il s'agit d'une méthode couramment utilisée au niveau industriel pour la décoloration ou la purification d'extraits végétaux.

Finalement, le pilote méthanol décoloré au charbon actif semble très prometteur en vue du développement à l'échelle industrielle d'un ingrédient conservateur à base d'extrait de santoline. Cette étape de décoloration de l'extrait brut a permis de conclure l'optimisation de l'extrait brut de santoline. Pour finaliser le projet NATUBAVAL, deux étapes étaient encore nécessaires : l'optimisation d'un point de vue cosmétique de cet extrait brut, et l'évaluation de la faisabilité industrielle d'un tel ingrédient.

6. Optimisation cosmétique et faisabilité industrielle : conclusions et perspectives du projet NATUBAVAL

Les travaux rapportés dans cette thèse portent sur les premières phases du projet NATUBAVAL (**Chapitre I**), puisqu'ils couvrent en particulier les aspects liés à la sélection et la collecte des matières premières végétales, leur extraction et analyse, ainsi que l'évaluation de leurs activités biologiques, puis la sélection d'un extrait candidat pour la suite de l'étude, avec sa purification, l'identification d'un actif et l'optimisation de l'extrait brut de départ. Cependant, afin d'envisager d'en faire un ingrédient formulable en cosmétique, une autre étape d'optimisation a tout d'abord été indispensable. En effet, un extrait brut sous forme de pâte étant impossible à formuler, l'ajout d'un support cosmétique adéquat a permis de rendre l'ingrédient formulable et a permis de répondre aux objectifs définis pour les phases suivantes du projet.

Ce travail d'optimisation cosmétique a été accompli chez SOFIA Cosmétiques en parallèle des travaux d'optimisation phytochimique réalisés au sein du laboratoire. Il a notamment consisté à analyser la solubilité et la formulabilité des extraits bruts dans différents supports cosmétiques, solides ou liquides. En particulier, des essais ont été réalisés en utilisant la maltodextrine comme support solide, mais ne se sont pas montrés concluants : les extraits obtenus étaient épais, pâteux et très difficiles à manipuler pour une incorporation dans une formulation cosmétique. De plus, l'ajout de ce support n'a provoqué qu'une dilution de l'extrait, et par conséquent de l'actif. L'activité antimicrobienne de l'extrait sur support s'en est trouvée diminuée, la maltodextrine en soi n'ayant pas démontré de pouvoir antimicrobien.

L'objectif a alors été d'incorporer l'extrait de santoline dans un support cosmétique présentant un potentiel antimicrobien, dans le but d'augmenter l'activité antimicrobienne de l'ingrédient final. Des essais ont été réalisés avec plusieurs supports cosmétiques, dont trois ont été retenus en raison d'un fort potentiel antimicrobien des ingrédients ainsi générés : l'éthylhexylglycérine, un mélange d'éthylhexylglycérine et de caprylyl glycol, et le caprylyl glycol. L'étape suivante a alors consisté à évaluer l'activité antimicrobienne de ces trois ingrédients incorporés dans différentes formulations cosmétiques. Ces formulations ont ensuite été

soumises à des challenge-tests (**Chapitre I, 1.6.**) afin de garantir leur stabilité microbiologique.

Finalement, l'ingrédient constitué d'extrait de santoline et de caprylyl glycol a passé le challenge-test avec succès et constitue un bon candidat pour une utilisation en tant que conservateur cosmétique naturel. Ces essais ont permis de réaliser la transition entre les étapes de recherche purement phytochimiques réalisées au laboratoire et les étapes de transposition industrielle réalisées chez Naturex, l'objectif du projet étant de développer un ingrédient qui puisse être proposé à des clients issus de l'industrie cosmétique et qui puisse être incorporé en l'état dans des formulations cosmétiques. Ces travaux d'optimisation cosmétique ne sont pas présentés plus en détails ici car ils ont fait l'objet d'une thèse qui a couvert notamment les aspects cosmétiques du projet NATUBAVAL⁷⁷.

L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre du projet NATUBAVAL a conduit au dépôt d'un brevet international, publié le 24 septembre 2015 sous la référence WO 2015/140290 A1¹¹⁶ (**Annexe 2**) et fait l'objet d'une publication¹¹⁷ (**Annexe 3**).

Suite aux étapes d'optimisation de l'extrait brut de santoline afin d'obtenir un extrait stable, enrichi en actif, exploitable au niveau cosmétique et compatible avec les contraintes d'une production industrielle, le projet a été transféré à la société Naturex, qui a étudié de manière plus précise la faisabilité commerciale du projet.

Pour Naturex, les paramètres cruciaux à déterminer en vue d'une poursuite du projet et d'une industrialisation étaient les suivants : tout d'abord, l'identification d'une filière de plante, les ressources disponibles aux jardins du MIP étant suffisantes pour une production à petite échelle ou semi-industrielle (pilotes), mais pas pour une production à plus grand échelle. Ensuite, la détermination d'un prix estimatif de la matière première, du procédé de fabrication et de l'ingrédient brut fini.

Malheureusement, la perte en actif suite à des essais de décoloration au charbon actif à l'échelle industrielle s'est révélée trop importante. Le coût total des procédés industriels pour obtenir un ingrédient commercialisable, y compris des excipients nécessaires à sa réalisation, ainsi que le *sourcing* de la matière première dans le but

d'être compétitif de manière durable était trop élevé, ce qui a conduit à une suspension du projet et de la mise sur le marché.

Pour finaliser cette étude, et pour compléter les essais réalisés avec les supports cosmétiques, une alternative au développement d'un ingrédient conservateur constitué d'un seul extrait a été évaluée. En effet, d'autres extraits issus du criblage initial ont présenté des propriétés antimicrobiennes intéressantes, notamment l'extrait de *Ruta chalepensis*. Par ailleurs, le laboratoire disposant d'une extractothèque constituée de très nombreux extraits végétaux utilisés dans le cadre d'autres projets, d'autres candidats potentiellement intéressants pour une utilisation en tant que conservateurs antimicrobiens pouvaient se trouver parmi ces extraits. Il a alors semblé approprié d'évaluer des mélanges d'extraits afin d'observer l'intérêt de telles combinaisons. Cette solution alternative est présentée dans le **Chapitre IV**.

CHAPITRE IV

ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTIMICROBIEN DE MÉLANGES D'EXTRAITS : UNE ALTERNATIVE POUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN INGRÉDIENT COSMÉTIQUE CONSERVATEUR ?

1. Contexte et intérêt de cette alternative

Cette partie finale a pour objectif de présenter des essais réalisés en vue d'évaluer une alternative au développement d'un ingrédient cosmétique conservateur constitué d'un seul extrait. En effet, comme cela a pu être constaté à travers le projet NATUBAVAL et la valorisation de l'extrait de santoline, il est difficile de couvrir un spectre d'activités large avec un seul extrait, que ce soit au niveau de plusieurs souches microbiennes ou plusieurs activités biologiques. En effet, parmi les dix-sept extraits bruts du criblage initial, aucun d'entre eux n'a présenté d'activité sur la totalité des souches microbiennes étudiées. Ce n'est que lors de l'optimisation de l'extrait de santoline, suite à la sélection de cette plante pour le développement d'un ingrédient cosmétique conservateur, que des activités sur la totalité des quatre souches ont pu être observées pour certains extraits (**Chapitre III**). Par exemple, le second extrait pilote de santoline a présenté une forte activité sur deux des souches, additionnée d'une activité moins forte sur une troisième souche et modérée sur la quatrième souche (**Chapitre III, 4.4**).

De même, concernant les activités biologiques étudiées, plusieurs extraits ont présenté des activités antimicrobiennes ou antioxydantes intéressantes, mais rarement les deux à la fois. Afin de poursuivre le projet NATUBAVAL, la sélection de la santoline comme candidate s'est basée sur son activité antimicrobienne supérieure, et c'est dans cette optique que l'extrait de départ a été optimisé. Il aurait tout à fait été possible d'orienter cette optimisation sur une autre plante et sur une activité antioxydante, mais c'est l'activité la plus importante et la moins documentée en termes de littérature qui a été privilégiée.

Dans le cas présent, l'étude a porté sur l'optimisation d'un extrait valorisable en tant qu'ingrédient conservateur antimicrobien. C'est pourquoi cette dernière partie restera centrée sur cette activité antimicrobienne.

Ainsi, afin d'évaluer le potentiel d'un mélange de deux extraits en vue du développement d'un ingrédient conservateur antimicrobien, des combinaisons entre l'extrait brut de santoline et d'autres extraits ont été réalisées et évaluées.

En particulier, deux extraits ont été choisis pour réaliser les essais en question : tout d'abord l'extrait de *Ruta chalepensis*, qui s'était montré actif contre trois des quatre souches microbiennes évaluées. Bien que la littérature fasse état d'activités antimicrobiennes de cette plante, aucune publication ne mentionne précisément son potentiel conservateur. Ensuite, un autre extrait issu d'une gomme-résine disponible dans l'extractothèque du laboratoire et utilisé dans le cadre d'un projet confidentiel a été sélectionné.

2. Étude de mélanges *S. chamaecyparissus* – *R. chalepensis*

*2.1. Intérêt de *R. chalepensis* dans cette étude*

Ruta chalepensis L., également connue sous le nom de rue d'Alep ou rue de Chalep, appartient à la famille des Rutacées. Au niveau botanique, elle possède plusieurs synonymes dont *Ruta bracteosa* DC. Elle se présente sous la forme d'un sous-arbrisseau au feuillage persistant, vert bleuté et aromatique (**Figure 33**)¹¹⁸. Elle se trouve sur tout le pourtour méditerranéen dont elle est native.



Figure 33 : *Ruta chalepensis* – plante entière (photo personnelle)

La rue est traditionnellement utilisée comme plante médicinale, notamment pour ses propriétés emménagogues, anthelminthiques ou spasmolytiques. Au niveau de sa composition chimique, ses parties aériennes contiennent une huile essentielle, mais également des alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines, tannins, stéroïdes et des triterpènes¹¹⁹. En revanche, plusieurs études évoquent une potentielle toxicité de la rue : un effet embryotoxique a notamment été identifié chez le rat¹²⁰, de même qu'un effet déprimeur du système nerveux central¹²¹. De plus, les coumarines, en particulier les furocoumarines, également appelés psoralènes, sont connues pour leur phototoxicité².

Comme présenté dans le **Chapitre II, 5.**, la rue est déjà connue pour son activité antimicrobienne et antioxydante, mais son potentiel en tant que conservateur n'était évoqué dans aucune étude au moment de ces travaux. Si sa toxicité potentielle n'en a pas fait un candidat de choix pour le développement d'un ingrédient cosmétique conservateur, elle a tout de même été choisie comme candidate pour l'évaluation de son potentiel antimicrobien en mélange avec la santoline.

2.2. Étude de mélanges santoline/rue

Afin d'évaluer l'interaction entre les extraits de santoline et de rue, trois essais ont été réalisés : un premier mélange dans lequel les deux extraits sont présents à parts égales, et deux autres mélanges où la santoline et la rue sont tour à tour présentes en proportions supérieures. Les mélanges ont été réalisés à partir de solutions de santoline et de rue préparées à une concentration identique à celle des tests d'activité antimicrobienne réalisés sur les extraits bruts (200 mg/mL). Dans le but de comparer l'effet du mélange avec l'activité de chaque extrait seul, chaque solution d'extrait a également été évaluée de manière isolée en tant que témoin positif. Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés dans les mêmes conditions que pour les extraits bruts (**Partie Expérimentale, 2.4.**). Les résultats observés à la concentration de 2 % sont présentés dans le **Tableau 19**.

Tout d'abord, il faut noter que les extraits mis en œuvre sont différents des extraits évalués lors du criblage initial, c'est pourquoi leur activité antimicrobienne peut être différente de celle des extraits de référence de rue et de santoline. Dans toutes les

proportions évaluées, on constate une perte de l'activité de la rue contre *P. aeruginosa*, et de la santoline contre *C. albicans*.

Tableau 19 : Evaluation de l'activité antimicrobienne de mélanges santoline/rue

Extrait ou mélange d'extraits	Activité antimicrobienne (bilan final à 2 %)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
Témoin santoline	+++	-	+++	+++
Témoin rue	+	++	++	~
Santoline/rue 50/50	+++	-	+++	~
Santoline/rue 75/25	+++	-	+++	~
Santoline/rue 25/75	~	-	+++	~

+++ : activité $\geq 90\%$; ++ : 70% \leq activité $\leq 90\%$
 + : 60% \leq activité $\leq 70\%$; ~ : 40% \leq activité $\leq 60\%$; - : activité $\leq 40\%$

L'activité de la santoline contre *A. brasiliensis* est conservée peu importe les proportions mises en œuvre, et celle contre *S. aureus* est conservée lorsque la santoline est présente en proportion égale ou supérieure à la rue, et perdue lorsque la rue est présente en proportion supérieure.

Les résultats observés semblent traduire un simple effet cumulatif ou antagoniste des activités antimicrobiennes observées pour les extraits bruts seuls. Un effet synergique aurait été souhaitable, mais vu la complexité chimique des extraits naturels de manière générale, des phénomènes d'antagonisme semblent possibles entre les différentes familles de molécules.

Afin d'explorer tout de même un peu plus en profondeur cette piste, des essais ont été réalisés avec des mélanges constitués d'extrait de santoline et de fractions de rue. En effet, bien qu'elle n'ait pas été sélectionnée comme candidate principale du projet NATUBAVAL, l'activité antimicrobienne de la rue demeurerait très intéressante.

Un fractionnement de l'extrait brut de rue mis en œuvre dans cette partie a alors été réalisé par colonne ouverte de gel de silice en phase normale (**Partie Expérimentale, 2.1.**), à l'exception de l'acétate d'éthyle qui a été remplacé par de l'éther. Cinq fractions ont ainsi été obtenues : une fraction cyclohexane (F1), une fraction cyclohexane/éther (F2), une fraction éther (F3), une fraction

éther/méthanol (F4) et une fraction méthanol (F5). Seules les fractions ayant présenté une activité antimicrobienne ont été mises en œuvre dans ces essais. Il s'agit de la fraction cyclohexane/éther (F2) et de la fraction éther (F3), dont l'activité antimicrobienne est présentée dans le **Tableau 20**.

Tableau 20 : Activité antimicrobienne des fractions F2 et F3 de rue et des mélanges santoline/F2 et santoline F3

Extrait ou mélange d'extraits	Activité antimicrobienne (bilan final)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
Témoin santoline (2 %)	+++	-	+++	+++
Témoin F2 rue (0,4 %)	+++	++	+++	-
Témoin F3 rue (0,4 %)	+++	+++	++	-
Santoline/F2 rue 75/25 (1)	~	-	+++	+++
Santoline/F3 rue 75/25 (1)	++	-	+++	+++
Santoline/F2 rue 75/25 (2)	~	+	+++	+
Santoline/F3 rue 75/25 (2)	++	+	+++	~

+++ : activité $\geq 90\% \leq$ activité $\leq 100\%$; ++ : $70\% \leq$ activité $\leq 90\%$
 + : $60\% \leq$ activité $\leq 70\%$; ~ : $40\% \leq$ activité $\leq 60\%$; - : activité $\leq 40\%$
 Essais réalisés dans un mélange EtOH:H₂O 60:40 v/v (1) ou DMSO (2)

Cette activité est très intéressante puisque chacune des fractions est active contre trois des quatre souches évaluées. Le **Tableau 20** présente également les résultats obtenus pour les mélanges constitués d'extrait de santoline (2 %) et de fractions de rue (0,4 %). Ceux-ci ont été effectués dans des proportions 75/25 à partir de solutions à la concentration usuelle de test (200 mg/mL pour l'extrait de santoline et 100 mg/mL pour les fractions de rue). En effet, la fraction étant plus concentrée, elle est supposée avoir une activité supérieure à l'extrait, c'est pourquoi l'extrait est présent en une proportion supérieure à la fraction. Les témoins positifs sont ici constitués de l'extrait de santoline et des fractions de rue, chacun de manière isolée. Puisque l'extrait est évalué dans un mélange eau/éthanol et les fractions dans du DMSO pour des raisons de solubilité, les essais sur les mélanges ont été réalisés dans les deux types de solvants de manière indépendante.

Il est surprenant de constater que l'activité contre *S. aureus* diminue drastiquement dans le cas du mélange santoline/F2 rue, peu importe les conditions de solubilisation

des échantillons, alors qu'elle est maximale lorsque l'extrait ou la fraction sont évalués seuls. Cette même activité diminue également, mais de manière plus modérée, dans le cas des mélanges santoline/F3 rue. Cela est probablement dû à un phénomène d'antagonisme entre certaines familles de molécules présentes dans l'extrait de santoline et les fractions de rue.

Concernant l'activité contre *P. aeruginosa*, les mélanges évalués dans les conditions **(1)** perdent toute l'activité observée pour les fractions seules, et dans le cas des mélanges évalués dans les conditions **(2)**, cette activité diminue tout de même par rapport aux fractions témoins. Cela peut être expliqué par l'absence d'activité du témoin santoline contre cette souche. L'activité supérieure des mélanges préparés dans les conditions **(2)** pourrait alors être expliquée par la meilleure solubilité des fractions dans le DMSO.

L'activité contre *A. brasiliensis*, quant à elle, est maximale pour tous les mélanges, comme c'est également le cas pour l'extrait de santoline seul et la fraction F2 de rue. Cela est certainement dû à un effet cumulatif de l'activité des deux constituants du mélange, donc il n'y a pas non plus de réel effet synergique.

Finalement, concernant *C. albicans*, l'activité est maximale lorsque les mélanges sont effectués dans les conditions **(1)**, c'est-à-dire lorsque la solubilité de l'extrait est maximale par rapport à celle des fractions. En revanche, dans les conditions **(2)**, l'effet contre cette souche est fortement à très fortement diminué selon la fraction se trouvant dans le mélange. Là encore, on constate que les résultats dépendent de la solubilité des extraits ou fractions constituant le mélange, et on n'observe pas d'effet synergique.

En conclusion, aucun des mélanges testés ne permet d'observer une véritable interaction entre la rue et la santoline. D'autres essais impliquant un troisième extrait issu d'une gomme-résine ont néanmoins été réalisés avant de conclure quant à la pertinence de cette évaluation.

3. Étude de mélanges impliquant *S. chamaecyparissus*, *R. chalepensis* et une gomme-résine

Deux dernières séries d'essais ont été réalisés afin d'exploiter au maximum la piste des mélanges dans l'optique du développement d'un ingrédient conservateur destiné à l'industrie cosmétique. Pour ces essais, une gomme-résine a été mise en œuvre en plus de la santoline et de la rue. Cependant, son identité ne sera pas divulguée pour des raisons de confidentialité. Néanmoins, sa richesse en acide benzoïque est largement connue et documentée, ce qui en a fait un candidat idéal pour la réalisation de mélanges avec la santoline et la rue.

Tout d'abord, de la même manière que pour les mélanges d'extraits bruts de santoline et de rue, les combinaisons suivantes ont été évaluées : santoline/gomme-résine (GR) dans des proportions 50/50 et 25/75, rue/GR dans des proportions 25/75 et santoline/rue/GR dans des proportions 37,5/37,5/25. Là aussi, les conditions d'évaluation de l'activité antimicrobiennes sont identiques à celles des tests effectués sur les extraits bruts seuls. La concentration des solutions mises en œuvre est de 200 mg/mL et les extraits ont été solubilisés dans un mélange éthanol/eau. Chaque extrait a également été évalué seul en guise de témoin positif. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 21**.

Tableau 21 : Activité antimicrobienne de mélanges d'extraits de santoline, de rue et/ou de gomme-résine (GR)

Extrait ou mélange d'extraits	Activité antimicrobienne (bilan final à 2 %)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
Témoin santoline	+++	-	+++	+++
Témoin rue	+	++	++	~
Témoin GR	+++	++	+++	++
Santoline/GR 50/50	++	+	+++	+++
Santoline/GR 25/75	+++	-	+++	~
Rue/GR 25/75	+	+++	+++	+++
Santoline/rue/GR 37,5/37,5/25	-	-	+++	~

+++ : activité $\geq 90\%$; ++ : 70% \leq activité $\leq 90\%$
 + : 60% \leq activité $\leq 70\%$; ~ : 40% \leq activité $\leq 60\%$; - : activité $\leq 40\%$

Ainsi, lorsque l'extrait de santoline est présent dans des proportions égales à l'extrait de gomme-résine, on observe une diminution de l'activité contre *S. aureus* par rapport aux témoins, présentant tous deux une activité maximale. En revanche, lorsque l'extrait de gomme-résine est présent en proportions supérieures dans le mélange, cette activité de référence est conservée. La santoline pourrait donc avoir un effet antagoniste sur la gomme-résine. Contre *P. aeruginosa*, l'activité de la gomme-résine se retrouve diminuée en présence de santoline. Contre *A. brasiliensis*, l'activité reste maximale comme pour les témoins. Contre *C. albicans*, cette activité est maximale dans les proportions 50/50 et modérée dans les proportions 25/75. Cette dernière constatation est surprenante, puisque les témoins présentent une activité très forte à maximale contre cette souche. Il semble donc dans ce cas y avoir également un effet antagoniste.

Concernant le mélange rue/gomme-résine, les activités contre *S. aureus* et *A. brasiliensis* semblent être d'ordre purement accumulatives ou antagonistes. En revanche, contre *P. aeruginosa* et *C. albicans*, il semblerait qu'il y ait un léger effet synergique, puisque l'activité passe de très forte pour les témoins à maximale pour le mélange contre *P. aeruginosa*, et de modérée (rue) ou très forte (gomme-résine) à maximale pour le mélange contre *C. albicans*.

Cependant, les résultats obtenus pour le mélange des trois extraits est décevant, puisque l'activité est perdue ou modérée contre trois des quatre souches, et maximale mais sans grande surprise au vu des données de référence pour *A. brasiliensis*. Une dernière série d'essais impliquant l'extrait de gomme-résine et les deux fractions de rue a été réalisée, dans les mêmes conditions qu'avec la santoline précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 22**.

Tableau 22 : Evaluation de l'activité antimicrobienne de mélanges d'extrait de santoline et de fractions de rue

Extrait ou mélange d'extraits	Activité antimicrobienne (bilan final)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
Témoin GR (2 %)	+++	++	+++	++
Témoin F2 rue (0,4 %)	+++	++	+++	-
Témoin F3 rue (0,4 %)	+++	+++	++	-
GR/F2 rue 75/25 (1)	++	-	+++	++
GR/F3 rue 75/25 (1)	+++	-	++	-
GR/F2 rue 75/25 (2)	+++	-	++	+
GR/F3 rue 75/25 (2)	++	-	+++	++

+++ : activité $\geq 90\%$; ++ : 70% \leq activité \leq 90%
 + : 60% \leq activité \leq 70% ; ~ : 40% \leq activité \leq 60% ; - : activité \leq 40%
 Essais réalisés dans un mélange EtOH:H₂O 60:40 v/v (1) ou DMSO (2)

Dans ce cas également, les résultats semblent essentiellement additionnels, notamment contre *S. aureus* et *A. brasiliensis*. L'activité contre *P. aeruginosa* est totalement perdue pour tous les mélanges évalués, ce qui pourrait signifier un fort antagonisme ou simplement être lié à la forte résistance de cette souche. Enfin, contre *C. albicans*, les résultats ne sont pas non plus particulièrement surprenants.

4. Conclusions et perspectives

Alors que le développement d'un ingrédient constitué d'un seul extrait présentait déjà plusieurs problématiques, l'exploitation d'un mélange d'extraits naturels s'est révélée encore plus complexe. En effet, dans la plupart des essais réalisés, un simple effet cumulatif ou à l'inverse antagoniste des activités de l'un ou de l'autre des extraits ou de la fraction évalués a été observé. Il aurait été appréciable d'observer un effet réellement synergique, mais finalement, l'activité de chaque extrait pris en compte seul est bien plus intéressante que dans le cas d'un mélange. Il est également important de tenir compte de la solubilité de chaque extrait ou fraction dans les solvants ou systèmes de solvants utilisés pour la préparation des échantillons.

En conclusion, l'étude de l'interaction de différents extraits entre eux ou avec des fractions d'extraits est une piste à exploiter, mais qui demande beaucoup plus de temps et d'ajustements afin d'aboutir à des résultats satisfaisants, en particulier grâce à une meilleure connaissance phytochimique des extraits et fractions mis en œuvre.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le développement d'un ingrédient cosmétique conservateur et la recherche de métabolites secondaires végétaux d'intérêt sont des processus longs et demandant un travail minutieux. Grâce à l'implication de ses acteurs et partenaires académiques, industriels et associatifs, le projet NATUBAVAL a pu être mené à son terme.

Dix-sept espèces végétales méditerranéennes ont été sélectionnées parmi une vaste base de données pour leur potentielle activité conservatrice. Des extraits hydro-alcooliques ont été réalisés et ont fait l'objet d'une analyse chromatographique par HPLC-DAD-ELSD et par HPTLC. Ils ont ensuite fait l'objet d'un criblage de leurs propriétés antimicrobiennes, permettant de déterminer leur pourcentage d'inhibition de la croissance des quatre souches microbiennes mises en œuvre : *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. Leurs propriétés antioxydantes ont également été évaluées, en particulier leur teneur en phénols totaux, déterminée grâce à l'indice de Folin-Ciocalteu, et leur capacité antioxydante, déterminée grâce à un test au DPPH. Une méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne contre *A. brasiliensis* et de l'activité antioxydante sur le DPPH par HPTLC-EDA a été développée.

Parmi les quatre extraits ayant présenté les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes les plus intéressantes, à savoir *Hypericum perforatum*, *Laurus nobilis*, *Ruta chalepensis* et *Santolina chamaecyparissus*, une étude bibliographique a permis de sélectionner la santoline, *S. chamaecyparissus*, comme candidat pour la suite de l'étude. Un fractionnement bioguidé a permis d'identifier un métabolite actif, un spirokétal énol de la famille des polyacétylènes. Ce composé s'étant révélé instable en milieu acide et aqueux, son activité a pu être démontrée à l'aide d'un dosage par HPLC-DAD.

L'extrait brut de santoline a alors fait l'objet d'une optimisation, notamment au niveau du solvant d'extraction mis en œuvre lors de l'extraction, afin d'obtenir un extrait le plus concentré possible en actif. Les essais réalisés ont permis d'identifier le méthanol comme étant le solvant permettant d'obtenir la concentration la plus élevée en actif. Après validation de ce solvant, un extrait pilote a été obtenu dans les

conditions optimisées afin de vérifier que l'actif était toujours présent suite à une extraction à l'échelle semi-industrielle. L'extrait pilote a ensuite fait l'objet d'essais de décoloration par distillation moléculaire et au charbon actif afin d'obtenir un extrait dont la couleur est compatible avec une utilisation cosmétique. Un travail d'optimisation cosmétique (SOFIA Cosmétiques) a permis de compléter cette étude et d'identifier un candidat prometteur pour une utilisation future en tant que conservateur naturel.

Cet ingrédient innovant issu de la santoline a fait l'objet d'un brevet international, déposé par les membres du consortium sous le numéro WO 2015/140290 A1 et publié le 24 septembre 2015. Cependant, suite au transfert du projet à la société Naturex pour une étude de sa faisabilité commerciale, le coût de revient des procédés industriels pour obtenir un ingrédient commercialisable a été estimé trop élevé et le projet a été suspendu.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de mélanges de santoline avec d'autres extraits végétaux en vue d'identifier une éventuelle interaction entre les extraits mis en œuvre a révélé la véritable difficulté de telles associations. En effet, les extraits végétaux étant des matrices complexes, il est difficile d'anticiper leur comportement lorsqu'ils se retrouvent en mélange avec d'autres extraits végétaux. Une meilleure connaissance des extraits mis en œuvre, et en particulier des familles de molécules responsables de leur activité, aurait permis de cibler plus précisément l'activité recherchée et peut-être d'observer une synergie afin de maximiser l'activité conservatrice du mélange mis en œuvre.

En conclusion, ce travail aussi captivant que complexe permet de montrer le réel intérêt de la biodiversité végétale méditerranéenne pour des applications dans le domaine des ingrédients cosmétiques conservateurs. Une méthodologie d'évaluation des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes d'une sélection initiale d'extraits bruts a permis la sélection d'un extrait candidat, et une stratégie de développement d'un ingrédient cosmétique conservateur a permis d'optimiser cet extrait candidat afin d'obtenir un extrait exploitable dans un produit cosmétique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Réactifs, solvants et appareillage

1.1. Réactifs et solvants

Les produits chimiques et solvants ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (France), VWR Prolabo (France) ou Eurisotop (France).

Les solvants utilisés pour les analyses HPLC sont de qualité analytique et utilisés tels quels pour les analyses directes ou les préparations de solutions de calibration. Les réactifs sont commerciaux et utilisés sans purification supplémentaire.

Les fractionnements ont été effectués par chromatographie liquide sur une colonne ouverte non greffée de gel de silice (Geduran Si 60, 40-63 μm , Merck).

1.2. Appareillage

1.2.1. HPLC-ELSD-DAD

L'ensemble des analyses HPLC et les purifications par HPLC semi-préparative ont été réalisées avec un système Agilent 1200 équipé d'un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD) et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD). Une colonne analytique Luna C18 (Phenomenex, 150 x 4,6 mm ; 5 μm) et une colonne semi-préparative Luna C18 (Phenomenex, 250 x 10 mm ; 5 μm) ont été utilisées.

Les solvants constituant la phase mobile (acétonitrile, eau et isopropanol) ont, sauf mention contraire, été acidifiés avec 0,1 % d'acide formique. Les paramètres du détecteur ELSD ont été définis comme tels :

Température	40 °C
Débit gazeux	1,5 L/min
Gain	4

1.2.2. HPTLC

Les analyses HPTLC ont été réalisées à l'aide d'un système HPTLC (CAMAG), équipé d'un passeur d'échantillons automatique ATS4, d'une chambre de développement automatique ADC2 avec contrôle d'humidité, d'une unité de documentation TLC Visualizer. Le traitement des données a été effectué grâce au logiciel winCATS.

Des plaques HPTLC en verre, recouvertes d'une couche de 0,25 mm de gel de silice 60 F254 et de taille 20×10 cm, ont été utilisées (Merck).

1.3. UPLC-HRMS

L'analyse de la masse exacte du composé concerné a été effectuée avec un système ACQUITY UPLC®/Xevo™ G2 Q-TOF (Waters) équipé d'une colonne ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,5 ´ 100 mm, 1,7 µm).

L'échantillon a été ionisé par électrospray (ESI) en mode négatif. Le spectre de masse haute résolution a été obtenu avec un analyseur à temps de vol (TOF). L'étalonnage a été effectué avec un standard de leucine encéphaline.

1.4. RMN

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre BRUKER Avance DRX-500. La sonde utilisée est une sonde triple résonance TXI 500 MHz inverse 1H-13C/15N de diamètre de 5 mm et de gradient Z, sans refroidissement.

Les spectres ont été calibrés en référence au signal du solvant deutéré correspondant (CDCl₃).

Des expériences 1D (¹H et ¹³C) et 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY) ont été réalisées.

2. Procédures expérimentales

2.1. Prélèvement et préparation du matériel végétal (**Chapitre II**)

La totalité des échantillons végétaux ayant fait l'objet des travaux exposés a été prélevée par Jean-Paul Ghérardi (Biophyto) ou Claude Monin (Acphytaroma) en région méditerranéenne (en particulier dans le Parc Naturel Régional des Préalpes d'Azur et la vallée de la Tinée) et authentifiée par Jean-Louis Polidori et François Boillot, botanistes (AFA Biophyto). Avant traitement, les plantes ont été séchées manuellement à l'obscurité, à température ambiante.

Un spécimen de *S. chamaecyparissus*, prélevé en avril 2013 au Mont Caume (Var), a été déposé à l'Herbarium du Jardin Botanique de la Ville de Nice sous le numéro C 3746. Un spécimen de *R. chalepensis* prélevé à Èze (Alpes-Maritimes) en mai 2013 y a également été déposé et porte le numéro C 3745.

2.2. Extraction des matières premières végétales

Toutes les matières premières végétales ont, sauf mention contraire, été extraites selon le protocole suivant : après broyage très fin à l'aide d'un hachoir rotatif à lames de laboratoire, la matière première végétale mise en œuvre est extraite par macération sous agitation à l'éthanol 75 %, constitué d'un mélange d'éthanol 96 % et d'eau distillée dans les proportions 75:25 (v/v). La durée de l'extraction est de 2 heures et l'extraction est réalisée à température ambiante (25 °C). Le volume de solvant utilisé pour l'extraction représente environ 10 fois le volume du matériel végétal mis en œuvre. Après extraction, le mélange est filtré sur papier plissé.

Le matériel végétal fait l'objet d'une seconde extraction dans les mêmes conditions. Après filtration du second extrait, les deux extraits obtenus sont mélangés et concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 60 °C. Ce protocole d'extraction est appelé « NATUBAVAL » car il correspond aux conditions d'extractions standards mises en œuvre pour l'extraction des matières premières.

Les principales caractéristiques des dix-sept extraits « NATUBAVAL » sont présentées dans le **Tableau 23**.

Tableau 23 : Caractéristiques des extraits bruts « NATUBAVAL »

Extrait	Extraction		
	% EtOH	Rendement en matière sèche (%)	Aspect, couleur
<i>C. albidus</i>	70	21,1	Pâteux, brun foncé
<i>P. lentiscus</i>	70	20,8	Poudre, brun clair
<i>S. verbenaca</i>	70	18,6	Poudre, vert foncé
<i>R. chalepensis</i>	75	24,8	Pâteux, vert foncé
<i>C. emerus</i>	75	17,7	Pâteux, vert foncé
<i>L. nobilis</i>	75	16,8	Pâteux, vert foncé
<i>S. minor</i>	75	20,6	Solide, vert foncé
<i>T. vulgaris</i>	75	13,7	Pâteux, vert foncé
<i>R. officinalis</i>	75	51,3	Pâteux, vert foncé
<i>H. perforatum</i>	75	19,7	Pâteux, rouge foncé
<i>M. communis</i>	75	5,6	Poudre, vert foncé
<i>C. sempervirens</i>	75	14,1	Pâteux, vert foncé
<i>S. chamaecyparissus</i>	75	17,4	Solide, brun foncé
<i>J. oxycedrus</i>	75	19,3	Pâteux, brun foncé
<i>J. communis</i>	75	12,3	Pâteux, vert foncé
<i>S. montana</i>	75	15,2	Solide, brun foncé
<i>A. petiolata</i>	75	14,4	Pâteux, brun foncé
<i>S. officinalis</i>	75	12,8	Solide, brun foncé
<i>H. stoechas</i>	75	18,3	Pâteux, brun foncé

2.3. Analyse des extraits bruts

2.3.1. HPLC-DAD-ELSD

Pour les analyses HPLC, les extraits bruts et fractions sont dilués à 20 mg/mL dans du méthanol, placés dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes et filtrés sur filtres-seringue PTFE 0,45 µm.

Les échantillons ainsi préparés sont ensuite analysés à l'aide d'une colonne en phase inverse grâce à la méthode suivante, appelée méthode « NATUBAVAL » (Appareillage, colonne et solvants décrits en **1.2.1**) :

Eluants	A : H ₂ O*	
	B : MeCN*	
	C : n-propanol*	
	*acidification à l'acide formique (HCOOH, 0,1 %)	
Débit	1,0 mL/min	
Volume d'injection	20 µL	
Gradient	0-5 min	5 % B
	5-35 min	5-100 % B
	35-45 min	100 % B
	45-50 min	100-40 % B, 0-60 % C
	50-60 min	40 % B, 60 % C
	60-65 min	40-5 % B, 0-95 % A
	65-70 min	5 % B, 95 % A

2.3.2. HPTLC

Pour les analyses HPTLC, les échantillons ont été préparés de la manière suivante : les extraits bruts ont été dilués à 20 mg/mL dans du méthanol, puis placés dans un bain à ultrasons pendant 15 min et centrifugés. Le surnageant a ensuite été prélevé et introduit dans un vial pour l'analyse HPTLC.

Les échantillons ont été déposés sur des plaques HPTLC en gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence (254 nm) sur support en verre, de dimensions 10 cm x 20 cm. Les solutions standards et les échantillons ont été déposés à raison de 2 µL sur une épaisseur de 8 mm, avec un total de quinze bandes par plaque, sauf mention contraire.

La séparation sur la plaque en gel de silice est effectuée dans une chambre de développement automatique, la cuve de développement à humidité contrôlée (10 minutes, 33-38 % d'humidité) étant préalablement saturée pendant 20 minutes avec 25 mL de phase mobile. La distance de développement est de 70 mm en partant

de la base de la plaque. La visualisation et la prise d'image de la plaque HPTLC sont effectuées à l'aide du visualiseur, à 254 nm, 366 nm et sous lumière blanche (WR, WT et WRT). Les données obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel winCATS.

2.4. Tests d'activité antimicrobienne

Les tests d'activité antimicrobienne réalisés sur la totalité des échantillons « NATUBAVAL » ont été mis au point et réalisés par la société Nixe à Sophia Antipolis (Alpes-Maritimes).

2.4.1. Tests sur plaques 96 puits (méthode par dilution)

2.4.1.1. Matériel et appareillage

La verrerie, le matériel et les appareillages utilisés sont ceux d'un laboratoire de microbiologie équipé pour le travail en conditions stériles. Le matériel particulier mis en œuvre pour la réalisation de ces essais est le suivant : une hotte à flux laminaire de classe II, une étuve réglable, un autoclave permettant la stérilisation en chaleur humide, des plaques 96 puits (Falcon, Référence 353072), un lecteur de plaques, un microscope optique ainsi que tout le matériel nécessité par les observations microscopiques, une cellule de Malassez et des boîtes de Pétri.

2.4.1.2. Souches et milieux de culture

Les souches microbiennes, toutes référencées ATCC et génériques du challenge-test conformément à la norme NF EN ISO 11930 de juin 2012, actuellement en révision (Cosmétiques - Microbiologie - Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique), sont les suivantes : *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, bactérie à gram positif), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027, bactérie à gram négatif), *Aspergillus brasiliensis* (ex-*Aspergillus niger*, ATCC 16404, champignon filamenteux) et *Candida albicans* (ATCC 10291, levure).

Les souches *A. brasiliensis* et *C. albicans* sont conservées en tubes inclinées sur de la gélose de Sabouraud (milieu SAB). Le milieu SAB, adapté aux mycètes, est un milieu acide et nutritif constitué en particulier de peptone pepsique de viande et de glucose

anhydre, et solidifié à l'agar-agar 10 %. À partir de ces cultures de référence, ces deux micro-organismes sont mis en culture avant la réalisation des essais afin que des spores fongiques et des colonies de levures aient le temps de se former avant la réalisation des tests. Pour ce faire, *A. brasiliensis* est mis en culture en boîte de Pétri afin d'obtenir, après quelques jours de culture à 37 °C, des filaments de mycélium portant des spores nécessaires aux tests d'activité antimicrobienne. La levure *C. albicans* est mise en culture dans le milieu SAB liquide selon la méthode appliquée aux bactéries (voir ci-dessous).

Les souches bactériennes *S. aureus* et *P. aeruginosa*, quant à elles, sont conservées en tubes inclinés sur de la gélose Trypticase soja (milieu TSA). Le milieu TSA est un milieu universel riche plus adapté aux bactéries, constitué notamment d'hydrolysats enzymatiques de caséine, de peptone de soja et de chlorure de sodium et également solidifié à l'agar-agar 10 %.

Les bactéries nécessaires à la réalisation des essais sont récupérées à partir des tubes inclinés contenant le milieu TSA. Pour chacune des bactéries, les tubes inclinés sont immergés avec 3 mL d'eau stérile. Un volume correspondant à 10 µL de la suspension bactérienne est prélevé et un nouveau tube incliné est ensemencé. Après 24 h de culture à 32 °C favorisant la croissance bactérienne, le tube est à nouveau immergé avec 3 mL d'eau stérile. Un volume équivalent à 0,5 mL de cette suspension bactérienne est alors prélevé pour ensemencer 10 mL de bouillon Tryptocaseïne-soja (milieu TSB, équivalent liquide de la gélose TSA).

2.4.1.3. Dosage des spores et de la suspension bactérienne

Les spores sont récupérées à la surface du mycélium : 3 mL d'eau distillée stérile sont déposés à la surface de la boîte de Pétri et les spores sont mises en solution en frottant le mycélium sporulé à l'aide d'une pipette pasteur coudée. La solution de spores est alors récupérée et le nombre de spores par millilitre de solution est déterminé par comptage avec une cellule de Malassez. Le titre en spores est généralement de 10⁵ spores/mL.

La culture liquide des levures (milieu SAB liquide) et des bactéries (milieu TSB liquide) est menée pendant 2 à 3 heures jusqu'à l'obtention d'une suspension de microorganismes correspondant à une DO de 0,6 à 620 nm.

2.4.1.4. Préparation des échantillons à tester

Les extraits bruts soumis aux tests d'activité antimicrobienne sont mis en solution à une concentration de 200 mg/mL dans un solvant adapté, qui est généralement un mélange éthanol:eau (60:40 v/v), le cas échéant, dans un autre solvant tel que le méthanol. Seuls les extraits commerciaux (Ysaline et Totarol) sont mis en solution à une concentration de 100 mg/mL et évalués à une concentration de 0,4 %. Après sonication, les solutions obtenues sont filtrées sur des filtres-seringue d'un diamètre de 30 mm et d'une taille de pores de 0,45 µm afin d'éliminer un maximum de particules en suspension.

Lorsque ce sont des fractions qui ont été soumises aux tests d'activité antimicrobienne, celles-ci ont été solubilisées à une concentration de 100 mg/mL dans du DMSO, et leur concentration de test est de 0,4 %.

2.4.1.5. Conduite des essais antimicrobiens

Les essais sont réalisés dans des plaques 96 puits, conformément aux conditions suivantes :

	Echantillons		Témoin positif Nipagin® M	Témoin négatif solvant	Témoin de référence eau
Concentration de test	2 %*	0,2 %*	0,4 %	2 %	-
Dilution préalable	1/25	-	8 mg/mL	1/25	-
Volume d'eau distillée stérile	-	90 µL	-	-	100 µL
Volume d'échantillon dilué	100 µL	10 µL de 1/100	100 µL	100 µL	-
Volume de suspension microbienne		5 µL		-	-
Volume de milieu		95 µL		100 µL	100 µL
Volume total			200 µL		

Source: Nixe

*Fractions : 0,4 et 0,04 %

Les échantillons à analyser sont préalablement dilués dans de l'eau distillée stérile, puis mis en solution dans les puits avec la suspension microbienne et le milieu correspondant. Chaque essai est mené en triplicat sur chacune des souches microbiennes. Parmi les trois répétitions, une répétition fait office de témoin négatif et dans ce cas, le puits ne contient pas de suspension microbienne. Le solvant (ou mélange de solvants) utilisé pour la solubilisation des échantillons est également évalué comme témoin négatif, et préparé à la manière des échantillons. Un conservateur commercial, le 4-hydroxybenzoate de méthyle (Nipagin® M Sodium, méthylparabène) fait office de témoin positif à une concentration usuelle en cosmétique. Un dernier témoin de référence de la croissance des souches microbiennes est réalisé en remplaçant le volume d'échantillon par de l'eau distillée stérile.

Une fois les plaques 96 puits chargées (**Figure 34**), elles sont déposées dans une boîte dont l'atmosphère est saturée en humidité. Une lecture de la densité optique à 620 nm est effectuée grâce à un lecteur de plaques 24, 48 et 72 heures après l'incubation des boîtes à l'étuve à 25 °C.

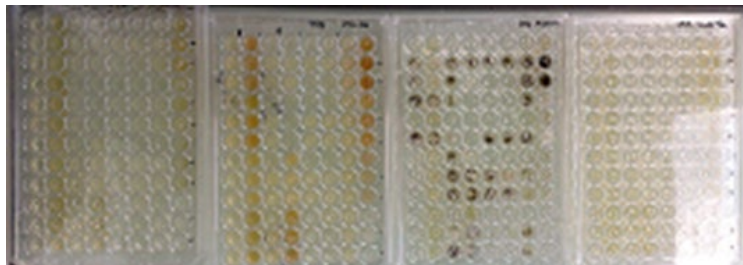


Figure 34 : Essais d'activité antimicrobienne en plaques 96 puits
Méthode par dilution (Photo Nixe)

L'estimation de la croissance microbienne de chaque souche en présence des différents échantillons testés est comparée avec la croissance microbienne mesurée dans les puits témoins de référence. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'échantillon testé pour chaque souche microbienne par rapport au témoin négatif correspondant. Les résultats pris en compte pour *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont les valeurs obtenues à $t = 24$ h et $t = 48$ h, tandis que pour *C. albicans* et *A. brasiliensis*, il s'agit des valeurs obtenues à $t = 48$ h et $t = 72$ h, conformément à la vitesse de croissance optimale de chaque souche microbienne.

2.4.2. Tests par bioautographie (HPTLC-EDA)

Afin de réaliser les tests d'activité antimicrobienne par HPTLC-EDA, la procédure de préparation des échantillons et de développement de la plaque HPTLC est identique à celle mise en œuvre pour les analyses HPTLC (1.2.2.). Les échantillons sont déposés en deux fois sur la plaque, à raison de 20 µL par dépôt. Après développement puis séchage de la plaque, celle-ci est transférée à la société Nixe. Une suspension de spores d'*A. brasiliensis* obtenue selon la méthode décrite en 2.4.1.2. est pulvérisée sur la plaque préalablement conditionnée à l'aide du milieu de culture liquide du champignon. La plaque est ensuite incubée à 25 °C afin de permettre le développement du mycélium à la surface du revêtement de silice. Après 48 à 72 heures d'incubation, la colonisation du mycélium portant des spores permet de visualiser les zones non colonisées. Ces zones d'inhibition non colonisées par le champignon correspondent à des molécules fongicides. Une prise d'image de la plaque est alors réalisée sous lumière blanche (WT) à l'aide du TLC Visualizer.

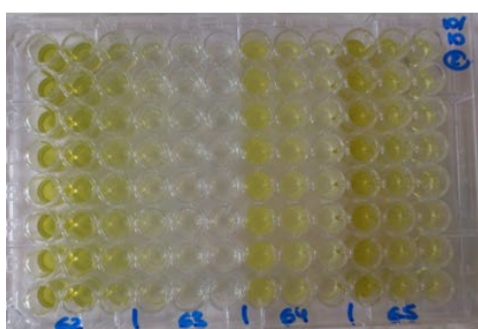
2.5. Tests d'activité antioxydante

Afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits bruts, des tests d'activité quantitatifs ont été mis en place grâce à une collaboration avec l'équipe GREEN du laboratoire SQPOV (UMR 408 INRA-UAPV) localisé en Avignon.

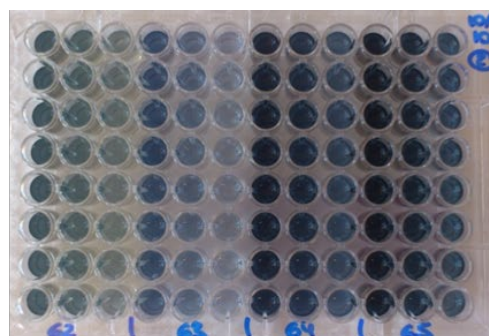
2.5.1. Dosage des phénols totaux : détermination de l'indice de Folin-Ciocalteu

2.5.1.1. Principe

Le dosage des phénols totaux dans les extraits bruts a été réalisé selon une adaptation de la méthode établie par Singleton et al. en 1965¹²². Ce dosage spectrophotométrique est basé sur l'oxydation des phénols contenus dans un échantillon par le réactif de Folin-Ciocalteu, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, ce dernier étant alors réduit en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue (**Figure 35**) ainsi produite présente la particularité d'absorber à un maximum de 750 nm, et est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans l'échantillon à doser.



Avant réaction



Après réaction

Figure 35 : Dosage des phénols totaux à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu
Photos d'une plaque de microtitration avant et après réaction (photos personnelles)

Cette réaction s'effectue en milieu alcalin et à une température de 25 °C. Le dosage des phénols totaux se base sur une gamme étalon d'acide gallique, les phénols totaux sont alors exprimés en équivalent acide gallique (EAG) par mL de solution.

2.5.1.2. Protocole

Le réactif de Folin-Ciocalteu commercial est dilué au 1/10 dans de l'eau distillée. Une solution aqueuse de carbonate de calcium (Na_2CO_3 , 75 mg/mL) et une solution-mère aqueuse d'acide gallique (1 mg/mL) sont préparées avec de l'eau distillée.

La réaction se déroule dans une plaque de microtitration 96 puits (Greiner Bio-One). La plaque est chargée selon le schéma suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 100 mg/L	S2 50 mg/L	S3 25 mg/L	S4 12,5 mg/L	S5 6,25 mg/L	S6 3,13 mg/L	S7 1,56 mg/L	S8 0 mg/L	-	-	-	-
B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	-	-	-	-
C	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	-	-	-	-
D	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	-	-	-	-
E	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	-	-	-	-
F	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	-	-	-	-
G	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	-	-	-	-
H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	-	-	-	-

Si : solution standard (acide gallique) de concentration i

Chaque colonne correspond à une dilution de la solution standard d'acide gallique (S1-S8), ce qui représente 8 puits soit 8 valeurs pour chaque concentration évaluée, la valeur finale prise en compte étant la moyenne des 8 valeurs obtenues. Les dilutions de la solution d'étalonnage sont réalisées directement sur la plaque selon la démarche suivante :

- 40 μL de la solution mère d'acide gallique sont déposés dans la colonne 1 (S1, A-H), puis 160 μL de la solution de Na_2CO_3 y sont ajoutés
- 100 μL de la solution de Na_2CO_3 sont déposés dans tous les puits des colonnes 2 à 8 (S2-S8)
- 100 μL des puits de la première colonne (S1) et 50 μL des puits contenu de la deuxième colonne (S2) sont prélevés, puis le tout est rejeté dans la colonne 2 et le contenu des puits est homogénéisé
- Cette dernière est répétée en allant de la colonne 2 (S2) vers la colonne 3 (S3), et ainsi de suite jusqu'à la colonne 7 (S7)
- La colonne 8 (S8) ne contient pas de solution étalon, 100 μL sont donc prélevés de la colonne 7 (S7) et jetés afin d'avoir un volume final de 100 μL dans tous les puits S1-S8.

Toutes ces manipulations sont effectuées à l'aide d'une micropipette multicanaux (Pipetman, Biohit).

La plaque est ensuite introduite dans un lecteur de plaques (FLUOstar Omega, BMG Labtech), qui dépose 100 μL de réactif de Folin-Ciocalteu dans chaque puits grâce à son injecteur automatique, puis l'absorbance est lue à 715 nm.

Les résultats sont interprétés à l'aide du logiciel MARS Data Analysis (BMG Labtech). Une courbe-étalon (concentration en acide gallique en mg/mL en fonction de l'absorbance à 715 nm) est obtenue, grâce à laquelle il est possible de déterminer l'équivalent en acide gallique (EAG) d'un échantillon à partir de son absorbance, si tant est que les concentrations de cet échantillon se situent dans la gamme d'acide gallique. C'est pourquoi, pour l'analyse des échantillons (extraits bruts, échantillons commerciaux ou fractions), des essais ont été réalisés sur un extrait témoin afin de fixer une concentration de départ, puis cette concentration a été ajustée au besoin

pour les échantillons hors-gamme, jusqu'à obtenir une valeur d'EAG dans la gamme pour les concentrations testées. Ainsi, pour les extraits bruts, la concentration de départ a été fixée à 10 mg/mL, suivie de deux dilutions successives pour aller jusqu'à une concentration finale d'extrait dans les puits égale à 2,5 mg/mL.

Les échantillons de départ ont été solubilisés dans du méthanol ou, le cas échéant, un autre solvant adapté, puis passés aux ultrasons pendant 5 à 10 minutes pour une meilleure solubilisation, puis filtrés sur des filtres-seringue d'un diamètre de 30 mm et d'une taille de pores de 0,45 µm afin d'éliminer un maximum de particules en suspension.

La plaque est chargée selon le même principe que pour la gamme étalon d'acide gallique, en appliquant les dilutions successives de manière identique. Quatre échantillons peuvent être analysés par plaque, à raison de trois concentrations par échantillon, ce qui est représenté par le schéma suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	W1	W2	W3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2	Z3
B	W1	W2	W3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2	Z3
C	W1	W2	W3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2	Z3
D	W1	W2	W3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2	Z3
E	W1	W2	W3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2	Z3
F	W1	W2	W3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2	Z3
G	W1	W2	W3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2	Z3
H	W1	W2	W3	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2	Z3

Wi, Xi, Yi, Zi : échantillons W, X, Y et Z de concentration i

De la même manière que pour la gamme étalon, le réactif de Folin-Ciocalteu est déposé directement dans les puits par le lecteur de plaques, puis l'absorbance à 715 nm est lue dans tous les puits.

Si l'un des points se trouve dans la gamme d'acide gallique, son équivalent acide gallique est lu grâce à la courbe-étalon en partant de l'absorbance indiquée. Ainsi, on obtient une concentration en équivalent acide gallique (EAG) en mg d'échantillon par

millilitre de solution. Sinon, la concentration de départ est ajustée jusqu'à obtenir une valeur se trouvant dans la gamme.

Pour les échantillons de standards commerciaux, des essais ont été menés afin de déterminer les concentrations optimales de chaque standard évalué.

2.5.2. Évaluation de la capacité antioxydante : test au DPPH

2.5.2.1. Principe

Le test au DPPH permet de quantifier le pouvoir antiradicalaire en mesurant la capacité d'une molécule à céder ses atomes d'hydrogène et/ou ses électrons. Il s'agit d'une mesure intrinsèque du pouvoir antioxydant. La disparition du radical stable est mesurée par spectroscopie UV-visible à la longueur d'onde d'absorption maximale du DPPH ($\lambda = 515 \text{ nm}$) au cours du temps par l'action des antioxydants en solution dans un système modèle méthanolique. Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical stable de couleur violette, jouant le rôle de réactif. Il possède la capacité de fixer un H^+ arraché à un antioxydant AH contenu dans un échantillon. Sa réduction se traduit par une diminution de son absorbance à 515 nm et une coloration jaune (**Figure 36**).

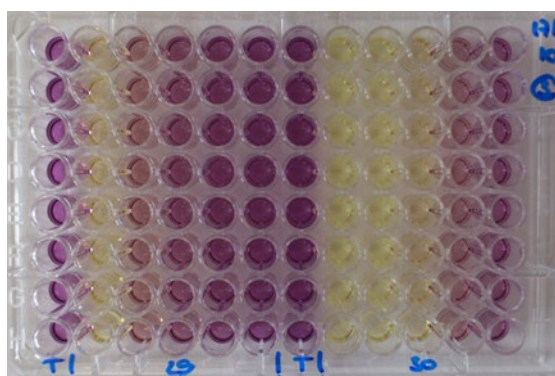


Figure 36 : Exemple de test DPPH sur plaque de microtitration (photo personnelle)
Colonnes 1 et 7 : témoins DPPH ; Colonnes 2-6 et 8-12 : échantillons

Dans ce cas, le système modèle dans lequel est évaluée la disparition du DPPH est une solution méthanolique contenant les échantillons dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant.

2.5.2.2. Protocole

Le pouvoir antioxydant des échantillons est déterminé grâce à l'IC₅₀, correspondant à la concentration d'antioxydant permettant de réduire 50 % de la concentration initiale en DPPH.

Le protocole mis au point a pour objectif d'évaluer l'activité antioxydante d'un produit en mesurant sa capacité à réduire le DPPH.

La manipulation est effectuée à une température de 25 °C. Une solution de DPPH à 0,05 mM est préparée à partir de DPPH commercial (DPPH 95 %, Alfa Aesar) dilué dans du méthanol UV puis la solution est soniquée pendant 5 min. Elle se conserve 24 h maximum à l'obscurité (la fiole contenant la solution méthanolique de DPPH est enveloppée dans du papier aluminium et placée au réfrigérateur lorsqu'elle n'est pas utilisée).

Concernant l'échantillon à évaluer, cinq concentrations sont testées à partir d'une solution mère donc la concentration initiale est déterminée en faisant des essais.

Le schéma de la plaque est le suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T	X1	X2	X3	X4	X5	T	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
B	T	X1	X2	X3	X4	X5	T	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
C	T	X1	X2	X3	X4	X5	T	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
D	T	X1	X2	X3	X4	X5	T	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
E	T	X1	X2	X3	X4	X5	T	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
F	T	X1	X2	X3	X4	X5	T	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
G	T	X1	X2	X3	X4	X5	T	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
H	T	X1	X2	X3	X4	X5	T	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5

T : témoin (MeoH) ; *X_i* : échantillon *X* de concentration *i* ;

Y_i : échantillon *Y* de concentration *i*

Comme pour le dosage des phénols totaux décrit en **2.5.1.**, chaque colonne représente 8 mesures d'un témoin ou d'une concentration d'un échantillon, la valeur

retenue étant la moyenne des 8 valeurs obtenues. Un témoin négatif contenant du méthanol à la place de l'échantillon est réalisé pour chaque échantillon.

50 μ L de méthanol sont introduits dans tous les puits à l'exception des puits « X1 » et « Y1 », dans lesquels sont déposés 100 μ L de solution mère de l'échantillon correspondant. Puis des dilutions successives entre les concentrations X1-X5 et Y1-Y5 sont réalisées selon la démarche suivante : 50 μ L de X1 et Y1 sont prélevés, 25 μ L de méthanol des puits X2 et Y2 y sont ajoutés, puis le tout est relâché dans les puits X2 et Y2 et homogénéisé. Cette étape est répétée en partant des puits X2 et Y2 jusqu'aux puits X5 et Y5, desquels sont prélevés 50 μ L qui sont jetés, puisqu'il n'y a plus aucune dilution à réaliser.

Chaque puits contient alors un volume de 50 μ L. La plaque est introduite dans le lecteur de plaques, qui ajoute 50 μ L de solution de DPPH à chaque puits à l'aide de l'injecteur automatique : chaque puits contient alors un volume final de 100 μ L.

Concernant les concentrations des échantillons évalués, celles-ci ont été fixées à 10 mg/mL pour la solution mère d'extraits bruts, elle-même diluée au 1/20, soit à 0,5 mg/mL avant le dépôt sur la plaque de microtitration. Les concentrations évaluées sont alors les suivantes :

X1/Y1 : 0,25 mg/mL (dilution au $\frac{1}{2}$ avec la solution de DPPH)

X2/Y2 : 0,125 mg/mL

X3/Y3 : 0,063 mg/mL

X4/Y4 : 0,031 mg/mL

X5/Y5 : 0,016 mg/mL.

À partir de l'injection de la solution de DPPH, l'absorbance de chaque puits est mesurée à 520 nm toutes les 5 minutes pendant 30 minutes, ce qui permet de réaliser une cinétique de la réaction. Ainsi, les concentrations des échantillons sont traitées comme des points de gamme et non comme des échantillons. Les résultats sont traités à l'aide du logiciel MARS Data Analysis (BMG Labtech).

Le pouvoir d'inhibition (PI) d'une solution est déterminé selon l'expression :

$$\mathbf{PI} (\%) = [(DO_T - DO_X) / DO_T] * 100 = [1 - (DO_X / DO_T)] * 100$$

Les résultats se présentent sous la forme d'une droite passant par les points correspondant à la concentration de la solution évaluée en fonction du pouvoir d'inhibition (%). Afin d'être exploitables, les résultats doivent comporter deux concentrations de chaque échantillon ayant un pouvoir d'inhibition supérieur et inférieur à 50 %. Lorsque cela n'est pas le cas, la concentration de la solution mère de départ doit être adaptée. Ainsi, l'IC₅₀ peut être déterminé grâce au logiciel qui calcule la concentration correspondant à un pouvoir d'inhibition égal à 50 %.

*2.6. Analyse de l'extrait brut de *S. chamaecyparissus* (Chapitre III)*

2.6.1. Fractionnement bioguidé de l'extrait brut

L'extrait brut de santoline a été soumis à une chromatographie sur colonne ouverte. Pour ce faire, l'extrait (2,2 g) a tout d'abord été solubilisé dans du méthanol, puis de la silice (3 g) y a été ajoutée, et le mélange a été concentré à l'évaporateur rotatif afin de pouvoir réaliser un dépôt solide. Le gel de silice constituant la colonne (22 g) a été déposé dans un entonnoir filtrant à fritté, préalablement conditionné, puis la poudre d'extrait brut sur support de silice a été déposée en couche homogène entre deux couches de papier filtre.

Le fractionnement a ensuite été réalisé en faisant passer chaque solvant ou système de solvants sous pression d'air comprimé à travers la colonne ouverte selon les conditions décrites dans le tableau ci-dessous. Chaque fraction récoltée a été concentrée à l'évaporateur rotatif sous vide, puis le résidu a été repris dans de l'eau, congelé à l'azote liquide et lyophilisé. Une fois lyophilisées, les fractions ont été pesées puis analysées par HPLC selon la méthode décrite en **2.3.1.** Les fractions obtenues sont présentées ci-dessous :

Fraction	Solvant/ Système de solvants	Volume (mL)	Quantité obtenue (mg)
F1	Cyclohexane	150	8
F2	Cyclohexane:acétate d'éthyle 1:1 v/v	300	249
F3	Acétate d'éthyle	200	88
F4	Acétate d'éthyle:méthanol 1:1 v/v	300	781
F5	Méthanol	300	412

2.6.2. Isolement du composé majoritaire de F2

Le composé majoritaire identifié dans la fraction F2 (cyclohexane:acétate d'éthyle) a été isolé par HPLC semi-préparative (Appareillage, colonne et solvants décrits en 1.2.1.). La fraction à purifier a été diluée à une concentration de 50 mg/mL dans du méthanol, soniquée durant 10 minutes puis filtrée à l'aide de filtres-seringue PTFE 0,45 µm. L'élution a été réalisée dans un premier temps en utilisant des solvants (acétonitrile : A, eau : B) acidifiés en appliquant le gradient optimisé suivant :

Gradient	0-5 min	60 % B
	5-35 min	75 % B
	35-45 min	100 % B

Le composé d'intérêt s'étant avéré instable après purification, une seconde élution a été réalisée dans les mêmes conditions sauf la phase mobile, constituée des mêmes solvants (acétonitrile : A, eau : B) non acidifiés. Les injections ont été faites après un rinçage soigneux de la colonne à l'aide de cette phase mobile non acidifiée.

La sous-fraction correspondant au composé d'intérêt a été concentrée à l'évaporateur rotatif après chaque injection. La totalité de la sous-fraction récoltée a ensuite été

concentrée au lyophilisateur puis pesée. Finalement, **9 mg** du composé majoritaire ont été isolés à partir de la fraction F2 de l'extrait brut de santoline.

2.6.3. Identification du composé majoritaire isolé

Le composé majoritaire isolé présente les caractéristiques suivantes :

Forme : liquide huileux jaunâtre

Formule brute : $C_{15}H_{12}O_4$

UV : $\lambda_{max} = 310 \text{ nm}$

RMN 1H et 13C : $CDCl_3$, 500 MHz

HRMS : $[M+H]^+$ $m/z = 257,13$

Le tableau récapitulant l'attribution des signaux 1H et ^{13}C observés, ainsi que les corrélations 2D du composé isolé, est présenté dans le **Chapitre III, 3.2.**, de même que l'analyse par UPLC-ESI-HRMS de l'extrait brut de santoline ayant permis de déterminer la masse moléculaire du composé isolé.

Les spectres RMN 1D (1H , ^{13}C) et 2D (COSY, HMBC, HSQC) sont présentés ci-dessous (**Figure 37, Figure 38, Figure 39, Figure 40** et **Figure 41**).

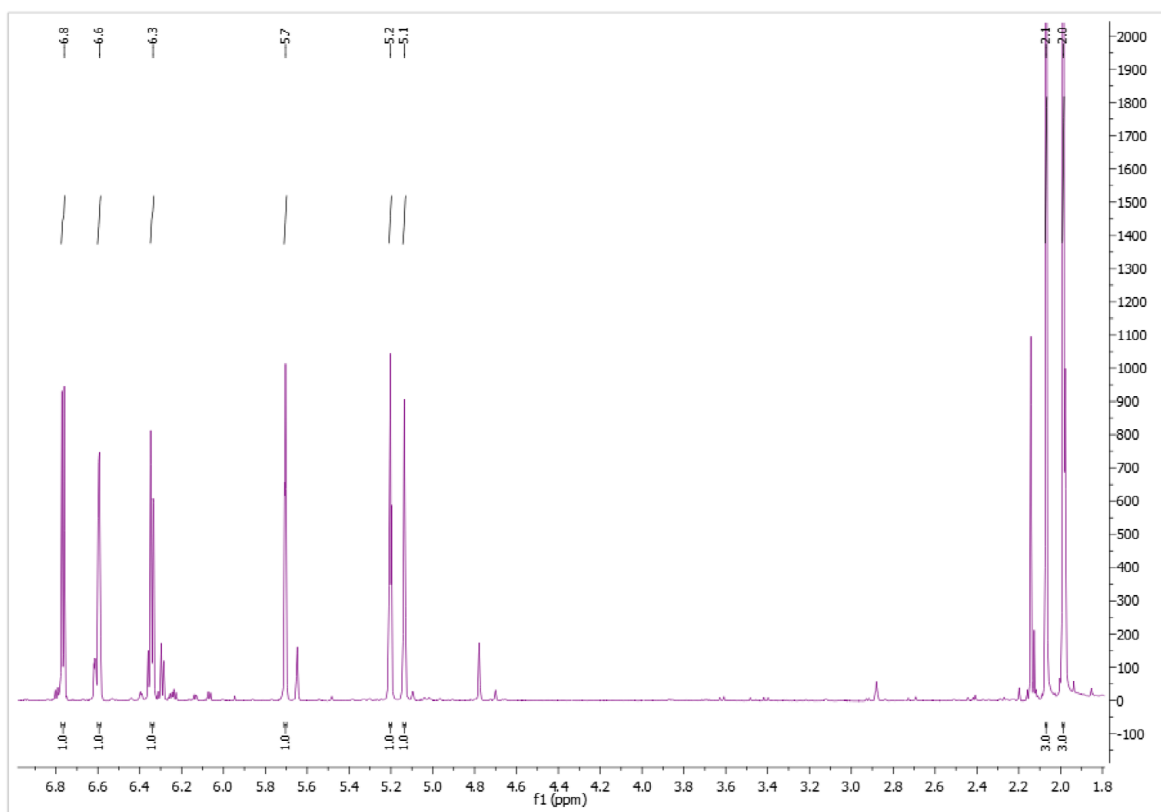


Figure 37 : Spectre RMN du proton du composé isolé

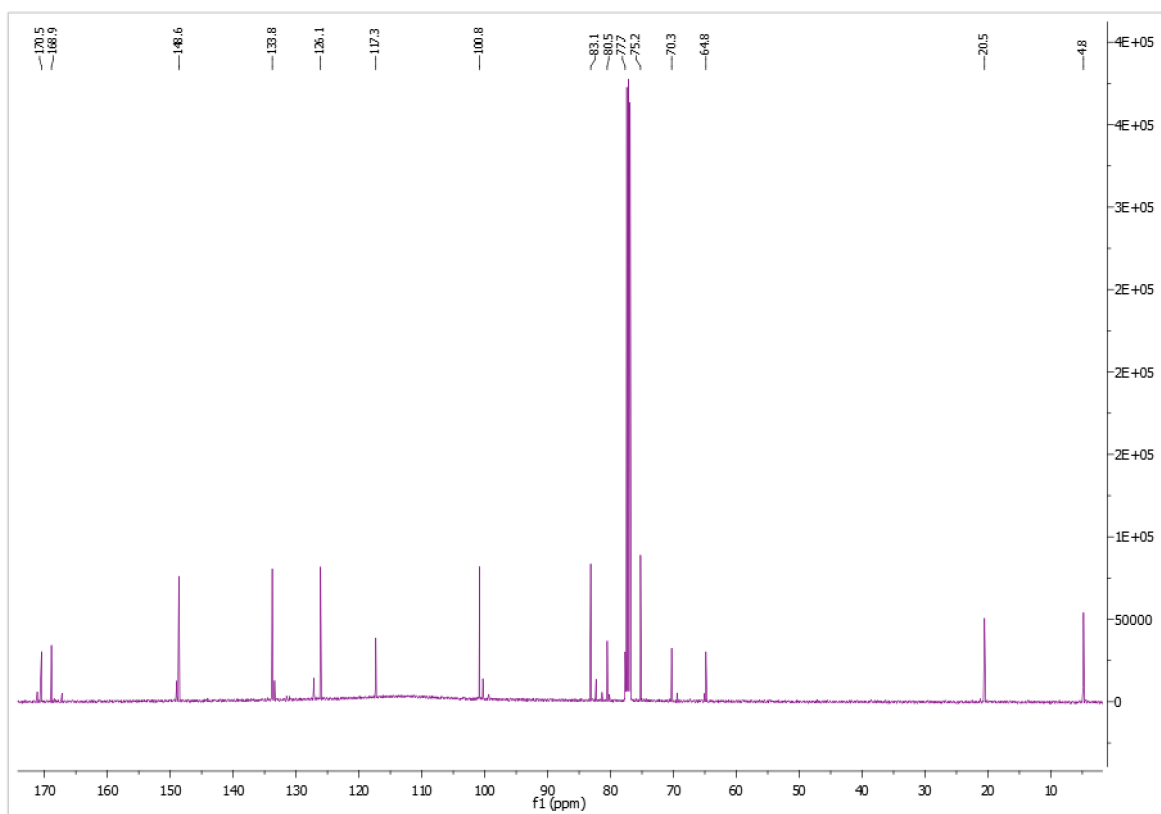


Figure 38 : Spectre RMN ^{13}C du composé isolé

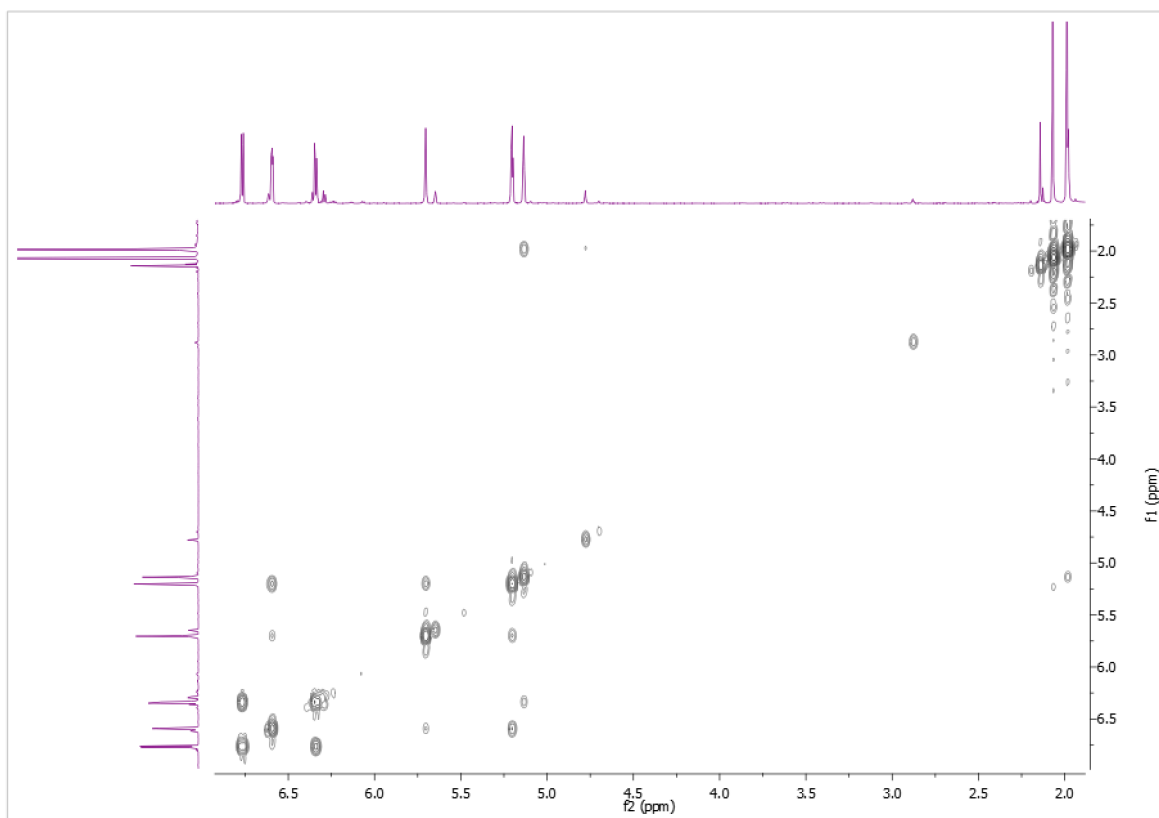


Figure 39 : Spectre RMN 2D (COSY) du composé isolé

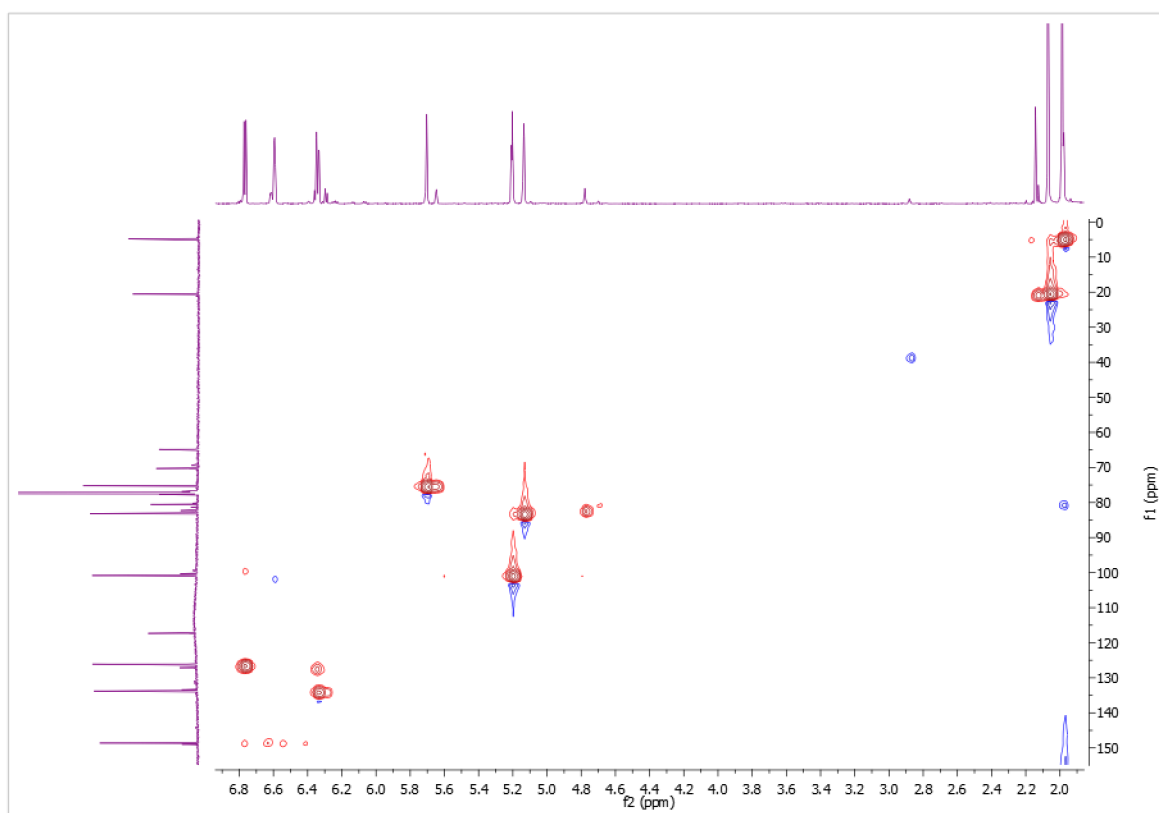


Figure 40 : Spectre RMN 2D (HSQC) du composé isolé

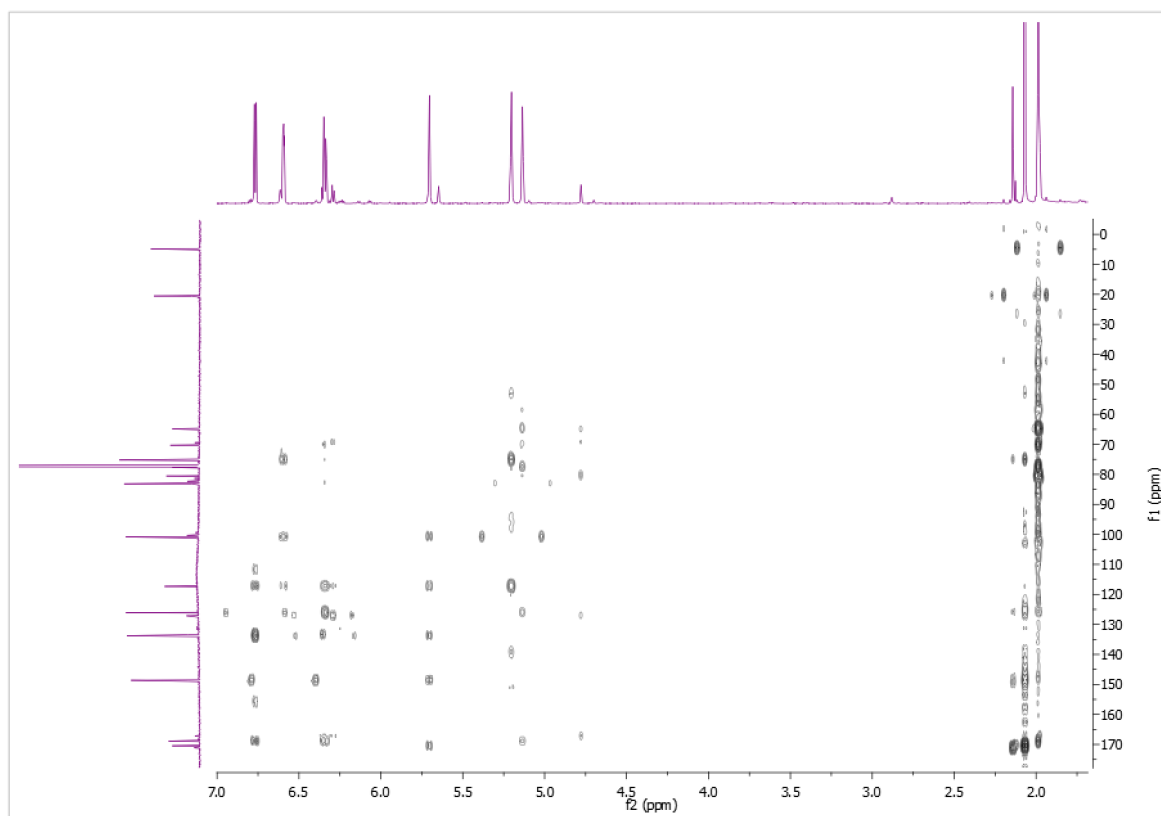


Figure 41 : Spectre RMN 2D (HMBC) du composé isolé

2.7. Dosage du spirokétal énoil (SKE) par HPLC-DAD

L'activité antimicrobienne de l'actif SKE a été déterminée à l'aide d'un dosage HPLC-DAD à la longueur d'onde maximale d'absorption du SKE, soit $\lambda_{\max} = 310$ nm. Pour ce faire, un standard commercial d'acide (*E*)-cinnamique, au temps de rétention proche du SKE, a été utilisé afin d'établir une droite d'étalonnage. Trois gammes d'étalonnage ont été préparées selon les conditions présentées dans la **Figure 42**, et l'aire sous la courbe de l'acide cinnamique a été évaluée à 310 nm. Les conditions HPLC mises en œuvre sont identiques à celles des analyses appliquées de manière standard aux extraits bruts NATUBAVAL et décrites en **2.3.1.**

Point de gamme	Concentration (mg/mL)	Aire acide cinnamique ($\lambda = 310$ nm)		
		Gamme étalon 1	Gamme étalon 2	Gamme étalon 3
1	0,5000	6780,7	7016,2	6613,1
2	0,2500	3746,2	3462,2	3354,5
3	0,1750	1814,1	1944,8	1743,3
4	0,0625	956,2	856,8	922,0
5	0,0313	478,5	430,5	484,8
6	0,0156	241,2	212,5	209,2
7	0,0078	117,8	104,3	126,5

Figure 42 : Réalisation des gammes d'étalonnage d'acide cinnamique

Après calcul de la moyenne des 3 aires obtenues pour chaque point de gamme, une courbe d'étalonnage **log (Aire moyenne) = f (log (concentration))** a pu être obtenue (**Figure 43**). La formule **$y = ax + b$** associée est la suivante : **$y = 0,9694x + 4,1294$** , avec un coefficient de corrélation **$R^2 = 0,9998$** .

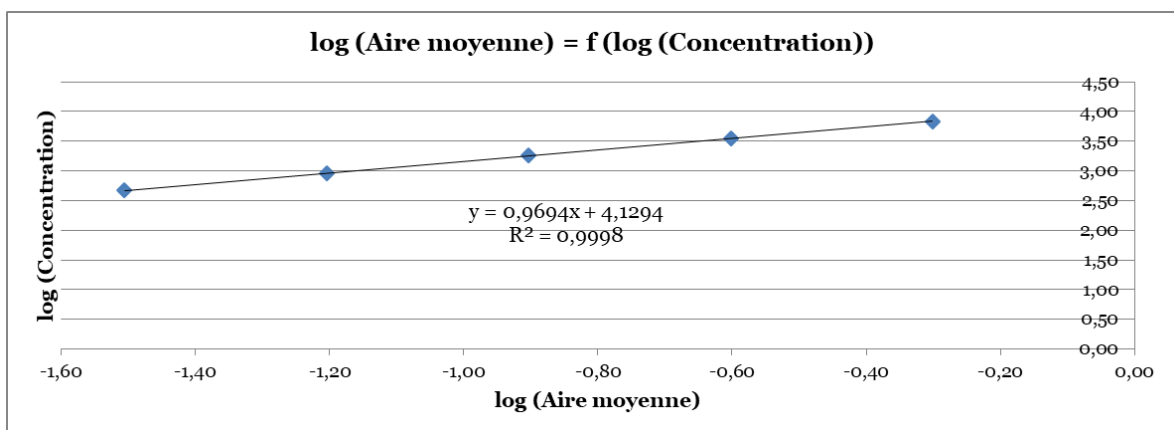


Figure 43 : Courbe d'étalonnage de l'acide *trans*-cinnamique

Ensuite, pour évaluer la concentration en SKE des différents extraits de santoline, les conditions mises en œuvre sont toujours identiques. Les échantillons sont préparés et analysés selon le protocole et les conditions décrits en **2.3.1.** Pour chaque extrait analysé, trois échantillons sont préparés dans trois vials différents puis injectés

chacun une fois, afin d'obtenir trois valeurs dont la moyenne sera retenue en tenant compte de l'écart-type standard observé entre les trois valeurs.

Ainsi, pour calculer la concentration en SKE, ou plus précisément en équivalent acide cinnamique (EAC) des échantillons analysés, la formule ci-dessus est appliquée. On obtient alors une quantité de SKE ou d'équivalent acide cinnamique (EAC) en mg par mL de solution d'extrait. Cette solution étant à une concentration de 20 mg/mL, et le volume injecté étant d'1 mL, le résultat multiplié par 50 permet d'obtenir une concentration en SKE exprimée en mg d'équivalent acide cinnamique (EAC) par gramme d'extrait. Cette formule a été appliquée à tous les dosages du SKE effectués par la suite.

2.8. Extraits obtenus dans le cadre de l'évaluation de l'activité antimicrobienne du SKE

2.8.1. Extraits bruts de santoline d'origine géographique variable

Les extraits réalisés à partir des échantillons de santoline prélevés à Isola, au Mont Coudon et au Mont Caume (**Chapitre II, 3.3.1.**) ont été obtenus à l'aide du procédé d'extraction NATUBAVAL standard. L'aspect des extraits obtenus est pâteux à solide, leur couleur brun foncé. Leur rendement en matière sèche est présenté dans le tableau suivant :

Extrait	Rendement en matière sèche (%)
Isola Hiver 2011-2012	9,2
Isola Automne 2012	12,9
Mont Coudon Printemps 2011	14,1
Mont Caume Eté 2011	17,5

2.8.2. Extraits issus d'autres espèces du genre *Santolina*

Les échantillons de *S. rosmarinifolia* et de *S. pinnata* ont été prélevés en été 2012 à la pépinière Rey à La Londe Les Maures (Var). Les conditions d'extraction mises en œuvre sont celles du procédé NATUBAVAL standard. Les extraits obtenus sont d'aspect pâteux à solide et de couleur brun foncé. Le rendement en matière sèche des extraits est le suivant :

Extrait	Rendement en matière sèche (%)
<i>Santolina rosmarinifolia</i>	16,3
<i>Santolina pinnata</i>	15,0

2.8.3. Extrait pilote 1 Naturex

Le premier extrait pilote de santoline a été réalisé par les soins de la société Naturex, dans des conditions semi-industrielles équivalentes au procédé d'extraction NATUBAVAL standard. Une quantité de matière première égale à 7,5 kg, provenant de la santoline mise en terre aux jardins du MIP à Grasse, a été mise en œuvre. Le rendement en matière sèche de l'extrait pilote ainsi obtenu, d'aspect pâteux et de couleur brun foncé, est de l'ordre de 7,0 %.

2.9. Extraits obtenus dans le cadre de l'optimisation de l'extrait de santoline

Tous les extraits réalisés dans le cadre de l'optimisation de l'extrait brut de référence de santoline ont été préparés à partir de pieds de santoline issus des cultures expérimentales des jardins du MIP à Grasse.

2.9.1. Extraits issus de différentes parties de la plante

Les matières premières mises en œuvre pour obtenir les extraits permettant d'évaluer la teneur en actif selon la partie de la plante mise en œuvre ont été prélevées au début du mois de juillet, d'août et de septembre 2013. Les extraits ont

été réalisés à l'aide du procédé NATUBAVAL, et les caractéristiques des extraits obtenus sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Extrait	Période de récolte	Aspect / Couleur	Rendement en matière sèche (%)
Tiges + feuilles + fleurs	Juillet 2013	Pâteux, brun foncé	10,0
Tiges + feuilles		Pâteux, brun foncé	12,3
Hampes florale		Liquide épais, orangé	7,4
Tiges + feuilles + fleurs	Août 2013	Pâteux, brun foncé	6,5
Tiges + feuilles		Pâteux, brun foncé	7,1
Hampes florales		Liquide épais, orangé	4,7
Tiges + feuilles + hampes florales	Septembre 2013	Pâteux, brun foncé	8,0
Tiges + feuilles		Pâteux, brun foncé	8,9

2.9.2. Essais obtenus à l'aide d'un mélange éthanol/eau en proportions variables

La matière première mise en œuvre a été prélevée en octobre 2012. Les extraits obtenus à l'aide d'un système de solvants éthanol/eau aux proportions variables ont été réalisés par Acphytaroma selon le protocole d'extraction « NATUBAVAL », exception faite du système de solvants mis en œuvre. Tous les extraits sont d'aspect pâteux à solide et de couleur brun foncé. Le rendement des extraits obtenus est le suivant :

Extrait	Rendement en matière sèche (%)
100 % eau	10,0
20 % éthanol	9,7
40 % éthanol	7,7
60 % éthanol	6,3
80 % éthanol	5,1
100 % éthanol	4,8
100 % éthanol abs.	3,8

2.9.3. Extraits obtenus à partir d'autres solvants organiques

La matière première mise en œuvre a été prélevée en octobre 2012. Les extraits obtenus à l'aide d'autres solvants ont été réalisés par Acphytaroma selon le protocole d'extraction « NATUBAVAL », exception faite du solvant mis en œuvre. Tous les extraits sont d'aspect pâteux à solide et de couleur vert foncé à brun foncé. Le rendement des extraits obtenus est le suivant :

Extrait	Rendement en matière sèche (%)
Acétone	6,5
EtOAc	4,0
THF	7,3
MeTHF	n.c.
MeOH	6,2
CH ₂ Cl ₂	4,1

Les extraits méthanoliques ayant permis de valider le choix du méthanol comme solvant d'extraction optimal ont été réalisés au laboratoire de l'ICN et ont présenté un rendement moyen en matière sèche de l'ordre de 6,5 %.

2.9.4. Extrait pilote 2

Le second extrait pilote de santoline a été réalisé par les soins de la société Naturex, dans des conditions semi-industrielles équivalentes au procédé d'extraction NATUBAVAL, avec comme solvant d'extraction le méthanol. Une quantité égale à 5,4 kg de matière première a été mise en œuvre. L'extrait pilote ainsi obtenu était solide et de couleur brun foncé, et son rendement en matière sèche, de l'ordre de 10,7 %.

2.9.5. Décoloration par distillation moléculaire

Les essais de décoloration par distillation moléculaire ont été réalisés par un prestataire de services : la société Newonat à Arzal (Morbihan).

L'unité de distillation moléculaire mise en œuvre pour ces essais est de type KDL-5 (**Figure 44**). Sa surface d'évaporation est de 0,05 m², et elle est équipée notamment d'un système de chauffage atteignant 240 °C et d'un système de vide constitué d'une pompe à palettes et d'une pompe à diffusion d'huile.



Figure 44 : Exemple d'unité de distillation moléculaire de type KDL-5 (Tournaire SA)¹¹⁴

Les paramètres mis en œuvre pour les différents essais (pilote 1 et pilote 2) sont les suivants :

Température de la matière première : **60 °C** (pilote 1) / **80 °C** (pilote 2)

Température de l'évaporateur : **240 °C**

Température du condenseur : **30 °C**

Température du piège : **30 °C**

Vitesse d'agitation : **500 tr/min**

Débit d'addition : **800 g/h**

La matière première est constituée de l'extrait à décolorer et des solvants dans lesquels celui-ci est solubilisé afin de réaliser la distillation. Le chauffage initial du mélange permet une meilleure solubilisation et un pompage plus efficace par la pompe d'addition.

Cas du pilote 1 :

Un premier mélange contenant l'extrait brut (300 g), des triglycérides à chaîne moyenne (TCM, 200 g) et de l'huile de tournesol (500 g) a été réalisé, la solubilisation étant facilitée grâce à l'ajout d'éthanol, éliminé ensuite par évaporation. Deux phases ont été obtenues : une phase huileuse de couleur noire (805 g), appelée **mélange 1**, et une phase insoluble (200 g), solubilisée dans du PEG 600 (300 g) pour obtenir le **mélange 2**.

Deux essais ont été réalisés et sont exposés ci-dessous :

Essai	Matière première	Masse initiale	Distillat		Résidu
			Rendement	Couleur	Rendement
1	Mélange 1	805 g	19,1 %	Jaune-orange	80,1 %
2	Mélange 2	500 g	-	-	100,0 %

Cas du pilote 2 :

L'extrait brut (410 g) est réparti dans deux mélanges : un premier mélange contenant l'extrait brut (300 g), des TCM (450 g) et du PEG 600 (500 g), appelé **mélange 1**, et un second mélange contenant l'extrait brut (110 g), des TCM (150 g) et de l'huile de tournesol (100 g). Une partie de ce second mélange est insoluble et éliminée. La partie restante est appelée **mélange 2**.

Quatre essais ont été réalisés et sont exposés ci-dessous :

Essai	Matière première	Masse initiale	Distillat		Résidu
			Rendement	Couleur	Rendement
1	Mélange 1	1250 g	N/A	N/A	95,0 %
2	Mélange 2	280 g	50,0 %	Noir	45,0 %
3	Résidu essai 1	1100 g	40,0 %	Noir	57,0 %
4	Distillat essais 2/3	580 g	89,0 %	Orange	10,0 %

2.9.6. Décoloration au charbon actif

Les extraits décolorés au charbon actif ont été obtenus soit directement suite à l'extraction de la matière première, avant concentration, dans le cas de l'extrait méthanolique obtenu en laboratoire (Acphytaroma), soit sur l'extrait brut remis en solution dans le cas de l'extrait pilote 2 (Naturex).

L'extrait méthanolique Acphytaroma a été décoloré directement après l'extraction de la matière première à l'aide de charbon actif en poudre (environ 10 % m/V, protocole Acphytaroma) sous agitation à 30 °C pendant une heure, avant d'être filtré sur papier plissé puis concentré à l'évaporateur rotatif.

La décoloration de l'extrait pilote 2 Naturex a été réalisée au laboratoire de l'ICN sur l'extrait brut concentré. Le charbon actif mis en œuvre a été fourni par Naturex. Une quantité de charbon actif en poudre équivalente à 7 % de la masse de l'extrait mise en œuvre a été ajoutée à l'extrait solubilisé dans un mélange méthanol/éthanol, puis la solution est restée sous agitation à 50 °C pendant une heure, avant d'être filtrée sur papier plissé puis concentrée à l'évaporateur rotatif.

Les extraits décolorés ainsi obtenus sont d'aspect pâteux à solide et de couleur marron clair à orange.

2.10. Évaluation de l'activité de mélanges (Chapitre IV)

L'extrait de santoline mis en œuvre a été obtenu à partir de santoline prélevée à Isola (06) en novembre 2011. L'extrait obtenu a été réalisé selon les conditions décrites en **2.2.** et se présente sous la forme d'un liquide épais de couleur brun foncé, avec un rendement en matière sèche de 7,0 %.

L'extrait de rue mis en œuvre a été obtenu à partir de rue prélevée à Èze (06) en mars 2012. L'extrait a été réalisé selon les conditions décrites en **2.2.** et se présente sous la forme d'une pâte de couleur vert foncé, avec un rendement en matière sèche de 15,2 %.

La gomme-résine mise en œuvre est issue d'un autre projet de l'ICN dont toutes les données sont confidentielles.

Les fractions de rue mises en œuvre ont été obtenues grâce à un fractionnement sur colonne ouverte de gel de silice de l'extrait brut de rue précité, dans des conditions similaires à celles décrites en **2.6.1.**, à l'exception de l'acétate d'éthyle qui a été remplacé par de l'éther. La quantité d'extrait mise en œuvre pour le fractionnement est de 9 g, la quantité de silice est de 60 g, et les fractions F2 (621 mg) et F3 (174 mg) ont été obtenues à l'aide de 900 mL d'un mélange cyclohexane:éther 1:1 (v/v) et de 900 mL d'éther, respectivement. Les autres fractions ont été écartées de l'étude.

Les tests d'activité antimicrobienne des extraits et fractions précités ont été réalisés selon les conditions décrites en **2.4.1.**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Institut Européen des Substances Végétales. *Le glossaire de la Phytothérapie*, <<https://www.iesv.org/la-phytotherapie-clinique-individualisee/glossaire-de-la-phytotherapie/>> (2015), page consultée le 29 octobre 2017.
- 2 Bruneton J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 4ème édition, 1268 p. (Tec & Doc, Lavoisier, 2009).
- 3 Le Petit Herboriste. *Lexique des termes médicaux*, <<http://www.lepetitherboriste.net/lexiques/medical.html>> (1998), page consultée le 29 octobre 2017.
- 4 Mauric N. *Glossaire de botanique*, <<http://nature.jardin.free.fr/fiches-generales.html>> (2000), page consultée le 29 octobre 2017.
- 5 Ifremer. *Géosciences marines - Néphélométrie*, <<https://www.ifremer.fr/gm/Comprendre/Glossaire/Nephelometrie>> (2011), page consultée le 17 mai 2017.
- 6 L'Oréal. *Le marché cosmétique - Le monde de la beauté en 2015*, <<http://www.loreal-finance.com/fr/rapport-activite-2015/marche-cosmetique>> (2015), page consultée le 10 juillet 2016.
- 7 Armand L. *Le marché des cosmétiques est en pleine transformation*, <<http://www.premiumbeautynews.com/fr/le-marche-des-cosmetiques-est-en,8369>> (2015), page consultée le 10 juillet 2016.
- 8 Guo A. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI)*, <http://www.cirs-reach.com/Cosmetic_Inventory/International_Nomenclature_of_Cosmetic_Ingredients_INCI.html> (2016), page consultée le 2 août 2016.
- 9 AFNOR. *Les produits cosmétiques sont-ils réglementés et quelles normes s'appliquent à ces produits ?*, <<http://www.afnor.org/fiches/faq-reglementation/cosmetiques>> (2016), page consultée le 23 juin 2016.
- 10 Danieau F. *Les Produits Cosmétiques*, <<http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/stbi/chapitre5/Cosmetique.pdf>> (2016), page consultée le 3 août 2016.
- 11 Agence Régionale de l'Environnement de Normandie. *La face cachée des cosmétiques*, <<http://www.arehn.asso.fr/dossiers/cosmetiques/cosmetiques.html>> (2009), page consultée le 13 juillet 2016.
- 12 Mitsui T. in *New Cosmetic Science*, 499 p., Ch. 9 Preservation of Cosmetics p. 199-208 (Elsevier, 1997).
- 13 Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. in *Microbiologie*. 2ème édition, 1137 p., Ch. 3 La cellule procaryote : structures et fonctions p. 1-73 (De Boeck, 2003).
- 14 Basu P.S., Biswas B.B., Pal M.K. Molecular Mechanism of Gram Staining. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **15**, 365-373 (1969).
- 15 Prescott L.M. Harley J.P., Klein D.A. in *Microbiologie*. 2ème édition, 1137 p., Ch. 4 La cellule eucaryote : structures et fonctions, p. 74-94 (De Boeck, 2003).
- 16 MicroMol. *Aspergillus brasiliensis*, <<http://www.kontrollstaemme.de/eshop/single-view/bid/78/produkt/aspergillus-brasilie.html>> (2010), page consultée le 24 octobre 2017.

- 17 EMLab. *Pseudomonas aeruginosa*, <<https://www.emlab.com/s/sampling/env-report-03-2007.html>> (2007), page consultée le 24 octobre 2017.
- 18 Medchrome. *Staphylococcus aureus*, <<http://medchrome.com/wp-content/uploads/2010/05/s.aureus-agar.jpg>> (2010), page consultée le 24 octobre 2017.
- 19 The Francis Crick Institute. *Preventing fungal infections in blood*, <<https://www.crick.ac.uk/news/science-news/2014/07/17/preventing-fungal-infections-in-blood/>> (2014), page consultée le 24 octobre 2017.
- 20 Mussard J. *Les parabens, des conservateurs omniprésents : un risque pour la santé ?* Université de Nantes, Faculté de Pharmacie (2006).
- 21 Brannan D.K. Cosmetic Preservation. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **46**, 199-220 (1995).
- 22 Darbre P.D. *et al.* Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* **24**, 5-13 (2004).
- 23 Kiyama R., Wada-Kiyama Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Env. Int.* **83**, 11-40 (2015).
- 24 Castelain F., Castelain M. Parabens: a real hazard or a scare story? *Eur. J. Dermatol.* **22**, 723-727 (2012).
- 25 ANSM. *Evaluation du risque lié à l'utilisation du phénoxyéthanol dans les produits cosmétiques*, <http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/0b46fedc079e8bb174a40b7b6f16d04c.pdf> (2012), page consultée le 20 mai 2016.
- 26 Kabir E.R., Rahman M.S., Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Env. Tox. Pharm.* **40**, 241-258 (2015).
- 27 Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs. *Opinion on Methylisothiazolinone (MI) (P94) Submission III (Sensitisation only)*, <http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_178.pdf> (2015), page consultée le 22 mai 2016.
- 28 Travassos A.R., Claes L., Boey L., Drieghe J., Goossens A. Non-fragrance allergens in specific cosmetic products. *Contact Derm.* **65**, 276-285 (2011).
- 29 Beaudeau J.L. *et al.* Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. *Ann. Pharm. Fr.* **64**, 373-381 (2006).
- 30 Judde A. Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ? *OCL* **11**, 414-418 (2004).
- 31 Cillard J., Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL* **13**, 24-29 (2006).
- 32 López-Alarcón C., Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta* **763**, 1-10 (2013).
- 33 Rolland Y. Antioxydants naturels végétaux. *OCL* **11**, 419-424 (2004).
- 34 Fernandez X., Merck F., Kerdudo A. Conservateurs pour cosmétiques - Antioxydants et anti-UV. *Techniques de l'ingénieur Cosmétiques TIB634DUO*, 1-23 (2012).
- 35 National Toxicology Program. *Report on Carcinogens, Thirteenth Edition*, <<http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/roc13/>> (2014), page consultée le 13 septembre 2016.

- 36 Pop A., Kiss B., Loghin F. Endocrine disrupting effects of butylated hydroxyanisole (BHA - E320). *Clujul Med.* **86**, 16-20 (2013).
- 37 International Standardization Organization. *ISO 4720:2009 Huiles essentielles - Nomenclature*, <<https://www.iso.org/fr/standard/42947.html>> (2009), page consultée le 24 octobre 2017.
- 38 Giménez-Arnau E. Qu'est-ce qu'un parfum ? Diversité des allergènes et législation européenne. *Rev. Fr. Allergol.* **49**, 279-285 (2009).
- 39 Guéritte F., Sévenet T. Les substances naturelles en chimiothérapie anticancéreuse. *Biofutur* **26**, 35-38 (2007).
- 40 Kusumawati I., Indrayanto G. in *Studies in Natural Products Chemistry* Vol. 40, 513 p., Ch. 15 Natural Antioxidants in Cosmetics p. 485-505 (Atta-ur-Rahman, Elsevier, 2013).
- 41 Nychas G.J.E., Tassou C.C. in *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2ème édition, 3248 p. Preservatives, Traditional Preservatives - Oils and Spices p. 113-118 (Tortorello M.L., Batt C.A., Academic Press, Elsevier, 2014).
- 42 Rios J.L., Recio M.C., Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* **23**, 127-149 (1988).
- 43 Choma I.M., Grzelak E.M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J. Chrom. A* **1218**, 2684-2691 (2011).
- 44 Brack W. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analyt. Bioanal. Chem.* **377**, 397-407 (2003).
- 45 Cebolla V.L., Membrado L., Jarne C., Garriga R. in *Analytical Separation Science* Vol. 4, 2220 p. Ch. 1 High-Performance Thin-Layer Chromatography p. 1093-1142 (Wiley, 2015).
- 46 Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta* **613**, 1-19 (2008).
- 47 Arts M.J.T.J. *et al.* A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chem.* **80**, 409-414 (2003).
- 48 Arts M.J.T.J. *et al.* A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* **88**, 567-570 (2004).
- 49 Zulueta A., Esteve M.J., Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* **114**, 310-316 (2009).
- 50 Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**, 25-30 (1995).
- 51 Benzie I.F.F., Strain J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76 (1996).
- 52 Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3396-3402 (2000).
- 53 International Standardization Organization. *ISO 29621:2017 Cosmétiques - Microbiologie - Lignes directrices pour l'appréciation du risque et l'identification de produits à faible risque microbiologique*, <<https://www.iso.org/fr/standard/68310.html>> (2017), page consultée le 26 octobre 2017.
- 54 International Standardization Organization. *ISO 11930:2012 Cosmétiques - Microbiologie - Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique*, <<https://www.iso.org/fr/standard/51037.html>> (2012), page consultée le 26 octobre 2017.

- 55 International Standardization Organization. *ISO 1886:2016 Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de la stabilité à l'oxydation (essai d'oxydation accéléré)*, <<https://www.iso.org/fr/standard/69594.html>> (2016), page consultée le 27 octobre 2017.
- 56 Mancebo-Campos V., Salvador M.D., Fregapane G. Comparative Study of Virgin Olive Oil Behavior under Rancimat Accelerated Oxidation Conditions and Long-Term Room Temperature Storage. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8231-8236 (2007).
- 57 Fernandez X., Merck F., Kerdudo A. Conservateurs pour cosmétiques - Généralités et conservateurs antimicrobiens. *Techniques de l'ingénieur Cosmétiques TIB634DUO*, 1-25 (2012).
- 58 T. Ryan. L'activité de l'eau, une autre façon de voir l'humidité. *Mesures* **751**, 38-41 (2003).
- 59 Cosmebio. *Les dernières données du marché - Octobre 2015*, <<http://www.cosmebio.org/uploads/fichier/document/0/0/2/les-dernieres-donnees-du-march-octobre-2015.pdf>> (2015).
- 60 COSMOS-standard. *The COSMOS-standard*, <<https://cosmos-standard.org/>> (2016), page consultée le 28 septembre 2016.
- 61 COSMOS-standard. *COSMOS-standard databases*, <<http://cosmos-standard-rm.org/data/index.php>> (2016), page consultée le 28 septembre 2016.
- 62 NATRUE. *NATRUE*, <<http://www.natrue.org/fr/activities/natrue-label/>> (2016), page consultée le 28 septembre 2016.
- 63 NATRUE. *Produits certifiés NATRUE*, <<http://www.natrue.org/fr/consumers/produits-certifies-natrue/>> (2016), page consultée le 28 septembre 2016.
- 64 Convention on Biological Diversity. *Texte de la Convention*, <<https://www.cbd.int/convention/text/default.shtml>>. > (1992), page consultée le 8 juillet 2016.
- 65 Convention on Biological Diversity. *Histoire de la Convention*, <<https://www.cbd.int/history/default.shtml>> (2016), page consultée le 8 juillet 2016.
- 66 Convention on Biological Diversity. *The Nagoya Protocol on Access and Benefit-sharing*, <<https://www.cbd.int/abs/>> (2017), page consultée le 24 octobre 2017.
- 67 Convention on Biological Diversity. *Strategic Plan for Biodiversity 2011-2020*, <<https://www.cbd.int/sp/default.shtml>> (2017), page consultée le 24 octobre 2017.
- 68 Myers N. Threatened biotas: "Hot spots" in tropical forests. *Environmentalist* **8**, 187-208 (1988).
- 69 Mittermeier R.A. *et al.* *Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions*. 392 p. (Conservation International, University of Chicago Press, 2005).
- 70 Williams K.J. *et al.* in *Biodiversity Hotspots*, 546 p. Forests of east Australia: the 35th biodiversity hotspot p. 295-310 (Zachos F.E., Habel J.C., Springer, 2011).
- 71 Critical Ecosystem Partnership Fund. *Base de données des projets*, <http://www.cepf.net/fr/appels_a_projets/Pages/base_de_donnee.aspx> (2016), page consultée le 7 juillet 2016.
- 72 Noss R. *Announcing the World's 36th Biodiversity Hotspot: The North American Coastal Plain*, <http://www.cepf.net/news/top_stories/Pages/Announcing-the-Worlds-36th-Biodiversity-Hotspot.aspx> (2016), page consultée le 9 avril 2016.

- 73 Critical Ecosystem Partnership Fund. *Mediterranean Basin*, <http://www.cepf.net/where_we_work/regions/europe_central_asia/mediterranean/Pages/default.aspx> (2016), page consultée le 24 avril 2016.
- 74 Carles L., Thiébault L. *Guide de la flore des Alpes-Maritimes : du Mercantour à la Méditerranée*. 432 p. (Gilletta Nice-Matin, 2010).
- 75 Casanova-Euzenot A. *Appel à projets recherche finalisée du Conseil Régional PACA*, <<http://www.cote-azur.cnrs.fr/Services/Spv/SubventionsSpv/SpvSubventionsRegion/SpvAOConseilRegional/SpvAOProjetsRechercheFinaliseeRegion/view>> (2016), page consultée le 2 octobre 2016.
- 76 Pôle PASS. *Pôle de compétitivité Parfums Arômes Senteurs Saveurs*, <<http://www.pole-pass.fr/accueil.html>> (2016), page consultée le 2 octobre 2016.
- 77 Kerdudo A. *Optimisation de la conservation des cosmétiques - Impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation*. Université Nice Sophia Antipolis (2014).
- 78 Société Française d'Ethnopharmacologie. *L'Ethnopharmacologie*, <<http://www.ethnopharmacologia.org/definition/>> (2017), page consultée le 19 mai 2017.
- 79 Heinrich M. in *Comprehensive Natural Products II*, 7388 p., Vol 3.12 Ethnopharmacology and Drug Discovery p. 351-381 (Mander L., Liu H.W., Elsevier, 2010).
- 80 Boligon Augusti A., Linde Athayde M. Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts. *Austin Chromatogr.* **1**, 1-2 (2014).
- 81 Reich E., Schibli, A. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. 280 p. (Thieme, 2006).
- 82 Wagner H., Blandt S., Maria Zgainski E. *Plant drug analysis : a thin layer chromatography atlas*. 2ème édition, 384 p. (Springer, 2009).
- 83 Haddouchi F. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chem.* **141**, 253-258 (2013).
- 84 Al-Bakri A.G., Afifi F.U. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J. Microbiol. Methods* **68**, 19-25 (2007).
- 85 Fakhfakh N. *et al.* Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activities of essential oil, aqueous and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (*Rutaceae*). *J. Med. Plants Res.* **6**, 593-600 (2012).
- 86 Ramos C. *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (*Lauraceae*) from Portugal. *Nat. Prod. Res.* **26**, 518-529 (2012).
- 87 Fukuyama N. *et al.* Antimicrobial sesquiterpenoids from *Laurus nobilis* L. *Nat. Prod. Res.* **25**, 1295-1303 (2011).
- 88 El S., Karagozlu N., Karakaya S., Sahin S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Extracted from *Laurus nobilis* L. Leaves by Using Solvent-Free Microwave and Hydrodistillation. *Food Nutr. Sci.* **5**, 97-106 (2014).
- 89 Maccioni A.M. *et al.* Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. *Int. J. Cosmet. Sci.* **24**, 53-59 (2002).
- 90 Ali M. *et al.* Comparative Antioxidant and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds Extracted from Five *Hypericum* Species. *Food Technol. Biotechnol.* **49**, 205-2013 (2011).
- 91 Saddiqe Z., Naeem I., Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J. Ethnopharmacol.* **131**, 511-521 (2010).

- 92 Djeddi S. *et al.* In vitro antimicrobial properties and chemical composition of *Santolina chamaecyparissus* essential oil from Algeria. *Nat. Prod. Commun.* **7**, 937-940 (2012).
- 93 Ruiz-Navajas Y. *et al.* In vitro antioxidant and antifungal properties of essential oils obtained from aromatic herbs endemic to the southeast of Spain. *J. Food Prot.* **76**, 1218-1225 (2013).
- 94 Mauric N. *Jardin! L'Encyclopédie - Santolina chamaecyparissus - Santoline 'Petit Cyprès'*, <http://nature.jardin.free.fr/arbrisseau/nmauric_santolina_chamaecyparissus.htm> (2000), page consultée le 14 mai 2017.
- 95 Au Jardin. *Santolina chamaecyparissus*, <<https://www.aujardin.info/plantes/santolina-chamaecyparissus.php>> (2017), page consultée le 14 mai 2017.
- 96 Tela Botanica. *Santolina chamaecyparissus*, <<http://sophy.tela-botanica.org/>> (2001), page consultée le 11 juin 2017.
- 97 Le Jardin du Pic Vert. *Santoline petit cyprès - Santolina chamaecyparissus*, <http://www.jardindupicvert.com/4daction/w_partner/santoline_petit_cypres_santolina_chamaecyparissus.542> (2017), page consultée le 14 mai 2017.
- 98 Pharmacopée française. *Liste A des plantes médicinales utilisées traditionnellement*, <http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/9efaa71075f10658632e2dbbd7b95c73.pdf> (2016), page consultée le 14 mai 2017.
- 99 Lam J., Bildsøe H., Christensen L.P., Thomasen T. Chemical constituents of *Santolina chamaecyparissus*. *Acta Chem. Scand.* **43**, 799-802 (1989).
- 100 Cavero R.Y., Akerreta S., Calvo M.I. Pharmaceutical ethnobotany in the Middle Navarra (Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.* **137**, 844-855 (2011).
- 101 Demirci B., Özek T., Baser K.H.C. Chemical Composition of *Santolina chamaecyparissus* L. Essential Oil. *J. Essent. Oil. Res.* **12**, 625-627 (2000).
- 102 Bohlmann F., Arndt C., Starnick J. Polyacetylenverbindungen, L. Zuordnung isomerer enoläther durch NMR-Spektroskopie. *Tet. Lett.* **4**, 1605-1610 (1963).
- 103 Bohlmann F. *et al.* Polyacetylenverbindungen, LVI. Neue Acetylenverbindungen aus *Chrysanthemum*-Arten. *Chem. Ber.* **97**, 1179-1192 (1964).
- 104 Christensen L.P. Acetylenes and related compounds in *Anthemideae*. *Phytochem.* **31**, 7-49 (1992).
- 105 Bohlmann F., Zdero C. Polyacetylenverbindungen, 214. Über die Inhaltsstoffe von *Santolina rosmarinifolia* L. *Chem. Ber.* **106**, 845-848 (1973).
- 106 De Pascual Teresa J., Bellido I.S., González M.S., Vicente S. Tetracyclic triterpenes and nerolidol derivatives from *Santolina oblongifolia*. *Phytochem.* **25**, 185-190 (1985).
- 107 Ferrari B., Tomi F., Casanova J. Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **33**, 445-449 (2005).
- 108 Actualitix. *Carte de Provence Alpes Côtes d'Azur (PACA)*, <<https://www.actualitix.com/carte-paca-provence-alpes-cotes-d-azur.html>> (2017), page consultée le 24 octobre 2017.
- 109 INERIS. *Dichlorométhane*, <<http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/784>> (2017), page consultée le 15 octobre 2017.
- 110 European Chemicals Agency. *Dichloromethane - Summary of Classification and Labelling*, <<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/7285>> (2017), page consultée le 15 octobre 2017.
- 111 INERIS. *Méthanol*, <<http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/1204>> (2017), page consultée le 15 octobre 2017.

- 112 AFSSAPS. *Recommandations aux fabricants ou aux responsables de la mise sur le marché relatives à l'évaluation de la sécurité pour la santé humaine d'un ingrédient ou d'une combinaison d'ingrédients à usage cosmétique*, <http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/94578f3810ca24fbba18fdbcc08af4fa.pdf> (2008), page consultée le 3 octobre 2017.
- 113 Ridgway Watt P. Molecular distillation. *Vacuum* **6**, 113–160 (1956).
- 114 Newonat. *Distillation moléculaire*, <<http://www.newonat-sas.fr/PBCPPlayer.asp?ID=684082>> (2017), page consultée le 7 octobre 2017.
- 115 Cecen F., Aktas O. *Activated Carbon for Water and Wastewater Treatment: Integration of Adsorption and Biological Treatment*. 406 p. (Wiley, 2011).
- 116 Lavaud A., Fernandez X., Merck F., Monin C., Rolland Y., Kerdudo A., Dingas A., Bily A.C., Roller M., Birtic S. Extracts of *Santolina chamaecyparissus*. **WO 2015/140290 A1** (2015).
- 117 Kerdudo A., Burger P., Merck F., Dingas A., Rolland Y., Michel T., Fernandez X. Development of a natural ingredient – Natural preservative: A case study. *C. R. Chim.* **19**, 1077-1089 (2016).
- 118 Mauric N. *Jardin! L'Encyclopédie - Ruta chalepensis - Rue d'Alep*, <http://nature.jardin.free.fr/vivace/ft_ruta_chalepensis.html> (2000), page consultée le 15 octobre 2017.
- 119 Al-Said Mansour S. *et al.* Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* **28**, 305-312 (1990).
- 120 Zeichen de Sa R., Rey A., Argañaraz E., Bindstein E. Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (*Rutaceae*) in mice. *J. Ethnopharmacol.* **69**, 93-98 (2000).
- 121 Gonzalez-Trujano M.E. *et al.* Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 129-135 (2006).
- 122 Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* **16**, 144-158 (1965).

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

COMMUNICATIONS ÉCRITES

Brevet international (Date de publication : **24 septembre 2015**) :

Lavaud A., Fernandez X., Merck F., Monin C., Rolland Y., Kerdudo A., Dingas A., Bily A. C., Roller M, Birtic S. : Extracts of *Santolina chamaecyparissus*. WO 2015/140290 A1 (**Annexe 2**)

Publication :

Kerdudo A., Burger P., Merck F., Dingas A., Rolland Y., Michel T., Fernandez X. : *Development of a natural ingredient - Natural preservative: A case study*. C.R. Chimie 19 (**2016**) 1077-1089 (**Annexe 3**)

Revue scientifique et technique :

Fernandez X., Merck F., A. Kerdudo : *Conservateurs pour cosmétiques – Généralités et conservateurs antimicrobiens*. Techniques de l'Ingénieur J 2 284 (**2012**) (**Annexe 4**)

Fernandez X., Merck F., A. Kerdudo : *Conservateurs pour cosmétiques – Antioxydants et anti-UV*. Techniques de l'Ingénieur J 2 285 (**2012**) (**Annexe 5**)

COMMUNICATIONS ORALES

Merck F., Fernandez X. : *Applications de l'HPTLC-EDA à l'étude de l'activité antimicrobienne et antioxydante d'extraits végétaux*. 15ème réunion annuelle du Club de CCM, Forum LABO & BIOTECH, Paris (**2013**)

Merck F., Fernandez X. : *Mediterranean biodiversity as a source of new natural preservatives*. Trends in Natural Products Research: a young scientists meeting of PSE and ÖPhG, Obergurgl/Autriche (**2013**)

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

Merck F., Sarrazin E., Fernandez X. : *Screening for new cosmetic preservatives from the French Riviera: HPTLC application to antimicrobial and antioxidant assays.* International Symposium for Thin-Layer Chromatography, Bâle/Suisse (2011)
3ème prix du meilleur poster

Merck F., Kerdudo A., Fernandez X., Dingas A., Rolland Y. : *La biodiversité végétale méditerranéenne : source de nouveaux conservateurs naturels pour la cosmétique.* 30èmes Journées Internationales Huiles Essentielles et Extraits, Digne-les-Bains (2011)

Merck F., Laurençon L., Kerdudo A., Casale A., Gonnot V., Jolibois J., Meziou H., Fernandez X. : *Valorisation de la biodiversité végétale: applications en chimie fine.* 23ème Journée de la Chimie SCF-PACA, Nice (2013)

ANNEXES

Annexe 1 : Annexe V du règlement (CE) n°1223/2009 – Liste des agents conservateurs admis dans les produits cosmétiques

L 342/192

FR

Journal officiel de l'Union européenne

22.12.2009

ANNEXE V LISTE DES AGENTS CONSERVATEURS ADMIS DANS LES PRODUITS COSMÉTIQUES

Préambule

- Dans la présente liste, on entend par:
 - sels: les sels des cations sodium, potassium, calcium, magnésium, ammonium et éthanolamines; des anions chlorure, bromure, sulfate, acétate;
 - esters: les esters de méthyle, d'éthyle, de propyle, d'iso-propyle, de butyle, d'isobutyle, de phényle.
- Tous les produits finis contenant du formaldéhyde ou des substances de la présente annexe et libérant du formaldéhyde doivent reprendre obligatoirement sur l'étiquetage la mention «Contient: Formaldéhyde» dans la mesure où la concentration en formaldéhyde dans le produit fini dépasse 0,05 %.

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Norm chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
1	Acide benzoïque et son sel de sodium	Benzoic acid Sodium benzoate	65-85-0 532-32-1	200-618-2 208-534-8	Produits à rincer, sauf les produits bucco-dentaires Produits bucco-dentaires Produits sans rinçage	2,5 % (acide) 1,7 % (acide) 0,5 % (acide)		
1a	Les sels d'acide benzoïque autres que ceux listés sous le numéro d'ordre 1 et les esters d'acide benzoïque	Ammonium benzoate, calcium benzoate, potassium benzoate, magnésium benzoate, MEA-benzoate, methyl benzoate, ethyl benzoate, propyl benzoate, butyl benzoate, isobutyl benzoate, isopropyl benzoate, phenyl benzoate	1863-63-4, 2090-05-3, 582-25-2, 533-70-8, 4337-66-0, 93-58-3, 93-89-0, 2315-68-6, 136-60-7, 120-50-3, 939-48-0, 93-99-2	217-468-9, 218-235-4, 209-481-3, 209-045-2, 224-387-2, 202-259-7, 202-284-3, 219-020-8, 205-252-7, 204-401-3, 213-361-6, 202-293-2		0,5 % (acide)		

Numéro d'ordre	Identification des substances					Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit: parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi.	Autres		
a	b	c	d	e	f	g	h	i	
2	Acide propionique et ses sels	Propionic acid, ammonium propionate, calcium propionate, magnesium propionate, potassium propionate, sodium propionate	79-09-4, 17496-08-1, 4075-81-4, 557-27-7, 327-62-8, 137-40-6	201-176-3, 241-503-7, 223-795-8, 209-166-0, 206-323-5, 205-290-4		2 % (acide)			
3	Acide salicylique (*) et ses sels	Salicylic acid, calcium salicylate, magnesium salicylate, MEA-salicylate, sodium salicylate, potassium salicylate, TEA-salicylate	69-72-7, 824-35-1, 18917-89-0, 59866-70-5, 54-21-7, 578-36-9, 2174-16-5	200-712-3, 212-525-4, 242-669-3, 261-965-2, 200-198-0, 209-421-6, 218-531-3		0,5 % (acide)	Ne pas utiliser dans les produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, à l'exception des shampoings	Ne pas employer chez les enfants de moins de 3 ans (*)	
4	Acide sorbique et ses sels	Sorbic acid, calcium sorbate, sodium sorbate, potassium sorbate	110-44-1, 7492-55-9, 7757-81-5, 24634-61-5	203-768-7, 231-321-6, 231-819-3, 246-376-1		0,6 % (acide)			
5	Formaldéhyde et paraformaldéhyde (*)	Formaldehyde Paraformaldehyde	50-00-0, 30525-89-4	200-001-8	Produits bucco-dentaires Autres produits	0,1 % (en formaldéhyde libre) 0,2 % (en formaldéhyde libre)	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)		
6	Déplacé ou supprimé								
7	Biphényle-2-ol et ses sels	o-Phenylphenol, sodium o-phenylphenate, potassium o-phenylphenate, MEA o-phenylphenate	90-43-7, 132-27-4, 13707-65-8, 84145-04-0	201-993-5, 205-055-6, 237-243-9, 282-227-7		0,2 % (en phénol)			
8	Pyrithione de zinc (*)	Zinc pyrithione	13463-41-7	236-671-3	Produits pour les cheveux et la pilosité du visage Autres produits	1,0 % 0,5 %	Uniquement pour les produits à rincer Ne pas utiliser dans les produits bucco-dentaires		

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produits parés du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
9	Sulfites et bisulfites inorganiques (*)	Sodium sulfite, ammonium bisulfite, ammonium sulfate, potassium sulfite, potassium hydrogène sulfite, sodium bisulfite, sodium metabisulfite, potassium metabisulfite	7737-83-7, 10192-30-0, 10196-04-0, 10117-38-1, 7773-03-7, 7631-90-5, 7681-57-4, 16731-55-8	231-821-4, 233-469-7, 233-484-9, 233-521-1, 231-870-1, 231-548-0, 231-673-0, 240-795-3		0,2 % (en SO ₂ libre)		
10	Déplacé ou supprimé							
11	1,1,1-Trichloro-2-méthylpropanol-2 (Chlorobutanol)	Chlorobutanol	57-15-8	200-317-6		0,5 %	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)	Contient: Chlorobutanol
12	Acide p-hydroxybenzoïque, ses sels et esters	4-Hydroxybenzoic acid, methylparaben, butylparaben, potassium ethylparaben, potassium paraben, propylparaben, isobutylparaben, sodium methylparaben, sodium ethylparaben, sodium propylparaben, sodium butylparaben, sodium isobutylparaben, ethylparaben, sodium paraben, isopropylparaben, potassium methylparaben, potassium butylparaben, potassium propylparaben, sodium propylparaben, calcium paraben, phenylparaben	99-96-7, 99-76-3, 94-26-8, 36457-19-9, 16782-08-4, 94-13-3, 4247-02-3, 5026-62-0, 35285-68-8, 35285-69-9, 36457-20-2, 84930-15-4, 120-47-8, 114-63-6, 4191-73-5, 2611-07-2, 38566-94-8, 84930-17-4, 35285-69-9, 69959-44-0, 17696-62-7	202-804-9, 202-785-7, 202-318-7, 233-048-1, 240-830-2, 202-307-7, 234-208-8, 225-714-1, 232-487-6, 232-488-1, 233-049-7, 284-595-4, 204-399-4, 204-051-1, 224-069-3, 247-464-2, 234-009-1, 284-597-5, 232-488-1, 274-235-4, 241-698-9		0,4 % (en acide) pour un ester 0,3 % (en acide) pour les mélanges d'esters		
13	Acide déihydroacétique et ses sels	Déihydroacetic acid, sodium déihydroacetate	520-45-6, 4418-26-2, 16807-48-0	208-293-9, 224-580-1		0,6 % (en acide)	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)	
14	Acide formique et son sel de sodium	Formic acid, sodium formate	64-18-6, 141-53-7	200-579-1, 205-488-0		0,5 % (en acide)		

Numéro d'ordre	Identification des substances					Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres		
a	b	c	d	e	f	g	h	i	
15	1,6-Di (4-amidino-2-bromophénoxy)-n-hexane (Dibromohexamidine) et ses sels (y compris l'isethionate)	Dibromohexamidine Iséthionate	93856-83-8	299-116-4		0,1 %			
16	Thiosalicylate d'éthylmercure sodique (Thiomersal)	Thiomersal	54-64-8	200-210-4	Produits les yeux	0,007 % (en Hg) En cas de mélange avec d'autres composés mercurels autorisés par le présent règlement, la concentration maximale en Hg reste fixée à 0,007 %		Contient: Thio-salicylate d'éthyl-mercure sodique	
17	Phénylmercure et ses sels (y compris le borate)	Phenyl Mercuric Acetate, Phenyl Mercuric Benzoate	62-38-4, 94-43-9	200-532-5, 202-331-8	Produits pour les yeux	0,007 % (en Hg) En cas de mélange avec d'autres composés mercurels autorisés par le présent règlement, la concentration maximale en Hg reste fixée à 0,007 %		Contient des composés phénylmercuriques	
18	Acide undécylénique et ses sels	Undecylenic acid, potassium undecylenate, sodium undecylenate, calcium undecylenate, TEA-undecylenate, MEA-undecylenate	112-38-9, 6159-41-7, 3398-33-2, 1322-14-1, 84471-25-0, 56532-40-2	203-965-8, 222-264-8, 215-331-8, 282-908-9, 260-247-7		0,2 % (en acide)			
19	1,3-bis(2-éthylhexyl)hexahydro-5-méthyl-5-pyrimidinamine	Hexastidine	141-94-6	205-513-5		0,1 %			

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produits concernés du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
20	Bromo-5-nitro-5 dioxane 1,3	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane	30007-47-7	250-001-7	Produits à rincer	0,1 %	Éviter la formation de nitrosamines	
21	Bromo-2 nitro-2 propanediol 1,3 (Bronopol)	2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol	52-51-7	200-143-0		0,1 %	Éviter la formation de nitrosamines	
22	Alcool dichloro-2,4-benzylrique	Dichlorobenzyl Alcohol	1777-82-8	217-210-5		0,15 %		
23	1-(4-Chlorophényl)-3-(3,4-dichlorophényl)urée (6)	Triclocarban	101-20-2	202-024-1		0,2 %	Critères de pureté: 3'-3',4'-4'-Tétrachloroazobenzène < 1 ppm 3'-3',4'-4'-Tétrachloroazoxybenzène < 1 ppm	
24	Chlorocrésol	p-Chloro-m-Cresol	59-50-7	200-431-6	Ne pas utiliser dans les produits destinés aux muqueuses	0,2 %		
25	5-Chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy) phénol	Triclosan	3380-34-5	222-182-2		0,3 %		
26	Chloroxyténol	Chloroxyténol	88-04-0	201-793-8		0,5 %		
27	N,N'-Méthylènebis[N'-[3-(hydroxyméthyl)-2,5-dioximidazolédine-4-yl]urée]	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	254-372-6		0,6 %		
28	α, ω-bis [[(Aminoiminométhyl)amino]iminométhyl] amino-poly(méthylène), dichlorhydrate	Polyaminopropyl biguanide	70170-61-5, 28757-47-3, 133029-32-0			0,3 %		
29	Phénoxy-2-éthanol	Phénoxyéthanol	122-99-6	204-589-7		1,0 %		
30	Méthénamine	Méthénamine	100-97-0	202-905-8		0,15 %		

Numéro d'ordre	Identification des substances					Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres		
a	b	c	d	e	f	g	h	i	
31	Chlorure de 1-(3-chloroallyl)-3,5,7-triaza-1-azonia adamantane	Quaternium-15	4080-3-1-3	223-805-0		0,2 %			
32	1-Imidazolyl-1-(4-chlorophenoxy) 3,3-diméthylbutane-2-one	Climbazole	38083-17-9	253-775-4		0,5 %			
33	Diméthylol, diméthylhydantoïne	DMDM Hydantoïn	6440-58-0	229-222-8		0,6 %			
34	Alcool benzylelique (?)	Benzyl alcohol	100-51-6	202-859-9		1,0 %			
35	1-Hydroxy-4-méthyl-6-(2,4,4-triméthyl-pentyl) 2-pyridon et son sel de monoéthanol amine	1-Hydroxy-4-méthyl-6-(2,4,4-triméthyl-pentyl) 2-pyridon, Puroctone Olamine	50650-76-5, 68890-66-4	272-574-2	Produits à rincer Autres produits	1,0 % 0,5 %			
36	Déplacé ou supprimé								
37	2,2-Méthylènebis(6-bromo-4-chlorophénol)	Bromochlorophène	15435-29-7	239-446-8		0,1 %			
38	Isopropyl-méta-crésol	o-Cymen-5-ol	3228-02-2	221-761-7		0,1 %			
39	Chloro-5-méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 + méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 + du chlorure de magnésium et du nitrate de magnésium	Méthylchloroisothiazolinone et Méthylisothiazolinone	26172-55-4, 2682-20-4, 55965-84-9	247-500-7, 220-239-6		0,0015 % (d'un mélange dans un rapport 3:1 de chloro-5-méthyl-2-isothiazoline-4-one-3 et méthyl-2-isothiazoline-4-one-3)			
40	Benzyl-2-chloro-4-phénol	Chlorophène	120-32-1	204-385-8		0,2 %			
41	Chloracétamide	Chloroacétamide	79-07-2	201-174-2		0,3 %		Contient: Chloroacétamide	

Numéro d'ordre	Identification des substances					Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produits préparés du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres		
a	b	c	d	e	f	g	h	i	
42	N,N'-bis(4-Chlorophényl)-3,12-dimino-2,4,11,13-tétrazatétracéamide: acétate, gluconate et chlorhydrate	Chlorhexidine, Chlorhexidine Diacétate, Chlorhexidine Digluconate, Chlorhexidine Dihydrochloride	55-56-1, 56-95-1, 18472-51-0, 3697-42-5	200-238-7, 200-502-4, 242-554-0, 223-026-6		0,3 % (en chlorhexidine)			
43	Phénoxypropanol (*)	Phénoxypropanol	770-35-4	212-222-7	Uniquement pour les produits à rincer	1,0 %			
44	Alkyl (C ₁₂₋₂₂) triméthyl ammonium, bromure de, chlorure de	Behentrimonium chlorure, cetrinonium bromure, cetrinonium chlorure, laurtrimonium bromure, laurtrimonium chlorure, steartrimonium bromure, steartrimonium chlorure	17301-53-0, 57-09-0, 112-02-7, 1119-94-4, 112-00-5, 1120-02-1, 112-03-8	241-527-0, 200-511-3, 203-928-6, 214-290-5, 203-927-0, 214-294-5, 203-929-1		0,1 %			
45	4,4-Diméthyl-1,3-oxazolidine	Diméthyl Oxazolidine	51200-87-4	237-048-2		0,1 %	pH > 6		
46	N-(Hydroxyméthyl)-N-(dihydroxyméthyl)-1,3-dioxo-2,5-imidazolidinyl-4)-N-(hydroxyméthyl) urée	Diazolidinyl Urea	78491-02-8	278-928-2		0,5 %			
47	4,4'-(1,6-Hexanediyloxy) bis-benzène-carboximidamide et ses sels (incluant l'iséthionate et le p-hydroxybenzoate)	Hexamidine, Hexamidine dithionate, Hexamidine paraben	3811-75-4, 659-40-5, 93841-83-9	211-533-5, 299-055-3		0,1 %			
48	Glutaraldéhyde (1,5-pentanedial)	Glutaral	111-30-8	203-856-5		0,1 %	Ne pas utiliser dans les aérosols (sprays)	Contient: Glutaral (*)	
49	5-Éthyl-3,7-dioxo-1-azabicyclo[3,3,0] octane	7-Ethylbicyclooxazolidine	7747-35-5	231-810-4		0,3 %	Ne pas utiliser dans les produits bucco-dentaires et dans les produits destinés aux muqueuses		

Numéro d'ordre	Identification des substances				Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produit, parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi.	Autres	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
50	3-(p-Chlorophénoxy)-propane-1,2 diol	Chlorphénésin	104-29-0	203-192-6		0,3 %		
51	Hydroxyméthylaminoacétate de sodium	Sodium Hydroxyméthylglycinate	70161-44-3	274-357-8		0,5 %		
52	Chlorure d'argent déposé sur dioxyde de titane	Silver chloride	7783-90-6	232-033-3		0,004 % (en AgCl)	20 % AgCl (m/m) sur TiO ₂ . Ne pas utiliser dans les produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, dans les produits bucco-dentaires et dans les produits pour les yeux ou les lèvres	
53	Chlorure de N,N-diméthyl-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénoxy]éthoxy]éthyl] benzène-méthanaminium	Benzethonium Chloride	121-54-0	204-479-9	a) Produits à rincer b) Produits sans rinçage autres que les produits bucco-dentaires	0,1 %		
54	Chlorure, bromure et saccharinate de benzalkonium (°)	Benzalkonium chlorure, benzalkonium bromide, benzalkonium saccharinate	8001-54-5, 63449-41-2, 91080-29-4, 68089-01-5, 63424-85-1, 68391-01-5, 61789-71-7, 85409-22-9	264-151-6, 293-522-5, 273-545-7, 270-325-2, 269-919-4, 263-080-8, 287-089-1		0,1 % (en chlorure de benzalkonium)		Éviter le contact avec les yeux
55	(Phénylméthoxy) méthanol	Benzylhemiformal	14548-60-8	238-588-8	Produits à rincer	0,15 %		

Numéro d'ordre	Identification des substances					Conditions			Libellé des conditions d'emploi et des avertissements
	Nom chimique/DCI	Dénomination commune du glossaire des ingrédients	Numéro CAS	Numéro CE	Type de produits parties du corps	Concentration maximale dans les préparations prêtes à l'emploi	Autres		
56	a b Carbamate de 3-iodo-2-propénylbutyle	c Iodopropényl butylcarbamate	d 55406-53-6	e 259-627-5	f a) Produits à rincer b) Produits sans rinçage c) Déodorants/antiperspirants	g a) 0,02 % b) 0,01 % c) 0,0075 %	h Ne pas utiliser pour les produits bucco-dentaires et les produits pour les lèvres a) Ne pas utiliser dans des produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans, sauf dans des produits de bain/des gels de douche et des shampoings b) Ne pas utiliser dans les lotions et crèmes pour le corps (13) b) et c) Ne pas utiliser dans des produits pour les enfants âgés de moins de 3 ans	i a) Ne pas utiliser pour des enfants âgés de moins de 3 ans (11) b) et c) Ne pas utiliser pour des enfants âgés de moins de 3 ans (12)	
57			2682-20-4	270-239-6		0,01 %			

(1) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 98.
 (2) Uniquement pour les produits qui pourraient éventuellement être utilisés chez les enfants âgés de moins de 3 ans et qui restent en contact prolongé avec la peau.
 (3) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 13.
 (4) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 101.
 (5) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 99.
 (6) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 100.
 (7) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 45 et 68.
 (8) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 54.
 (9) Seulement si la concentration dépasse 0,05 %.
 (10) Pour une utilisation autre que comme agent conservateur, voir annexe III, n° 65.
 (11) Uniquement pour les produits, autres que les produits de bain/des gels de douche et shampoings, susceptibles d'être utilisés pour des enfants âgés de moins de 3 ans.
 (12) Uniquement pour les produits susceptibles d'être utilisés pour des enfants âgés de moins de 3 ans.
 (13) Concernent tous les produits destinés à être appliqués sur une partie étendue du corps.

Annexe 2 : Brevet international WO 2015/140290 A1 (24 septembre 2015)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 September 2015 (24.09.2015)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2015/140290 A1

- (51) **International Patent Classification:**
A01N 65/12 (2009.01) *A01P 3/00* (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)
- (21) **International Application Number:** PCT/EP2015/055910
- (22) **International Filing Date:** 20 March 2015 (20.03.2015)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:** 14305401.3 21 March 2014 (21.03.2014) EP
- (71) **Applicants:** NATUREX [FR/FR]; 250 Rue Pierre Bayle, Bp 81218, F-84911 Avignon Cedex 09 (FR). SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'INGÉNIERIE APPLIQUÉE AUX COSMÉTIQUES [FR/FR]; 1ère avenue, 1ère rue, ZI de Carros, F-06510 Carros (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). AGENCE CONSEIL POUR LA PHYTOTHÉRAPIE ET L'AROMATHÉRAPIE [FR/FR]; Le Claux d'Entoures, 1051 Avenue de la Plantade, F-06530 Cabris (FR). UNIVERSITÉ DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS [FR/FR]; Pôle Valorisation Grand Château Parc Valrose, 28, Avenue Valrose, Bp 2135, F-06103 Nice (FR).
- (72) **Inventors:** LAVAUD, Alexis; 1552 Chemin des Carrières, F-84700 Sorgues (FR). FERNANDEZ, Xavier; 57 Vieux chemin de Gairaut, le Village de Gairaut N° 28, F-06100 Nice (FR). MERCK, Florence; 3a rue de la Chapelle, F-67630 Lauterbourg (FR). MONIN, Claude; 1051 Avenue de la Plantade, F-06530 Cabris (FR). ROLLAND, Yohan; 2, rue Henri Matisse, F-84310 Morieres Les Avignon (FR).
- (74) **Agent:** MAREK, Pierre; 28, rue de la Loge, BP 42413, F-13201 Marseille Cedex 02 (FR).
- (81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))



WO 2015/140290 A1

(54) **Title:** EXTRACTS OF SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS

(57) **Abstract:** The invention relates to an extract of *Santolina chamaecyparissus*, to a process for preparing said extract, to a composition comprising it, and to its use a preservative, particularly as antioxidant, bactericidal and/or fungicidal.

Extracts of *Santolina chamaecyparissus*.

The invention relates to a novel extract of *Santolina chamaecyparissus L.*, to a composition comprising it, and to cosmetic and dermatological methods using same,
5 especially as preservative, bactericide, fungicide and/or antioxidant.

Topical cosmetic, toiletry and pharmaceutical products such as creams, lotions, pastes, liquids, aerosols, shampoos, gels, wipes, bats, sticks, powders and granules, are known in the art to be susceptible to microbial infestation. The raw materials,
10 packaging, and manufacturing environment for these products are often not sufficiently sterile, such that small amounts of microbiological contaminants can enter into final products. Often, a cosmetic, toiletry or pharmaceutical product may be exposed to higher temperatures than recommended which can also accelerate the growth rate of microbes unless a suitably effective antimicrobial component and/or
15 components are incorporated into the formulation. Once product packages are opened, they are subject to further contamination from repeated consumer use. Microbial growth can cause discoloration and/or unpleasant odor of the product, but can also degrade chemical and/or active compounds in the cosmetic, toiletry or pharmaceutical formulation, which can lead to instability of the product and/or
20 emulsion. A product that has been contaminated by microbiological organisms can also lead to user infections once it is applied to the skin, scalp and/or mucous membranes of a human.

It is therefore important for manufacturers and marketers of such products to be able to offer products that resist microbial growth and provide a stable and safe product
25 with a long shelf life.

Acne, as a family of skin disorders is one of the most prevalent dermatologic diseases in the world. It usually affects almost everybody during the life (Feldman et al., 2004). The pathogenesis of acne is complex but dependent on four key factors
30 including androgen-mediated stimulation of sebaceous gland activity, follicular hyperkeratinization, colonization of the bacterium *Propionibacterium acnes* (an anaerobic bacterium as a normal constituent of the skin microbial flora), and inflammation (Cunliffe and Shuster, 1969).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

The high levels of sebum elicited by androgen cause proliferation of *P. acnes* in the pilosebaceous ducts and this proliferation triggers the host inflammatory response with a discharge of the proinflammatory cytokines, interleukin-1b (IL-1 b), IL-8, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor α (TNF- α) and complement deposition (Gollnick et al., 2003).

5 More precisely, Acne vulgaris, the most common chronic skin condition seen by dermatologists, is a disorder of the pilosebaceous unit characterized by papules, comedones and pustules. The face, back and chest are the areas most commonly affected as they possess a large number of sebaceous glands, about nine times the
10 concentration found elsewhere on the body. It affects more than seventeen million people in the US and it has been estimated that 85 percent of the adolescent population experiences this condition. Acne affects both genders with a peak incidence at 14-17 years for girls and 16-19 years for boys. It also affects 8 percent of 25-34 years-old and 3 percent of 35-44 years-old adults³). However, the number
15 of patients over the age of 25 affected by acne vulgaris is increasing. Adult women, in particular, may be affected and may experience premenstrual flares. In any case, severe acne tends to be more common in adolescent males than in people of other age-groups.

Although the primary cause of acne is end-organ hyper-responsiveness to circulating
20 androgens triggering sebum overproduction in the follicle, an important role is also played by secondary bacterial infection that is favoured by abnormal desquamation of follicular epithelium. The increased amount of sebum produced, combined with excessive numbers of desquamated epithelial cells from the walls of the sebaceous follicle, accumulates within and distends the follicle, resulting in the formation of a
25 clinically unapparent precursor lesion of acne vulgaris called the microcomedone. There are several explanations for ductal hypercornification. These include the comedogenic effects of certain sebaceous lipids, an androgen-controlled defect, retinoid control, local cytokine modulation and the effects of ductal bacteria.

Propionibacterium acnes is a member of the resident bacterial flora and resides in
30 sebaceous follicles. The anaerobic environment of the follicles that are plugged, indeed, particularly facilitate proliferation of *P. acnes* causing the release of

chemotactic factors and pro-inflammatory mediators into the follicle and surrounding dermis leading to the inflammations.

The clinical manifestations of these pathophysiological events include non-inflammatory closed (blackhead) or open (whitehead) comedos, as well as
5 inflammatory lesions, including papules, pustules, cysts and nodules.

Acne can be divided into mild, moderate and severe based on the number of lesions and the surface of skin involved. Mild acne is characterised by open and closed comedones sometimes accompanied by few superficial inflammatory lesions, moderate acne is characterized by increasing largely superficial inflammatory lesions
10 with pustules that have the tendency to scar with time. Nodules and cysts with marked scarring characterise severe acne.

Propionibacterium acnes (*P. acnes*) is a species of relatively slow growing aerotolerant gram-positive anaerobic bacilli that is associated with acne. In the skin of individuals with acne, the overgrowth of *P. acnes* in blocked pores leads to the
15 rupture of the pores to form lesions. Therefore, antibiotics have often been used to control this bacterial growth. Some antibiotics that are currently used by dermatologists to control acne include tetracycline, doxycycline, minocycline, erythromycin, clindamycin, vancomycin and sulfonamides. In addition, keratolytic agents, such as benzoyl peroxide and retinoids (e.g. tretinoin, adapalene, tazarotene)
20 are often used to clear the skin of patients with acne. Severe cases of inflammatory acne can be treated with the retinoid isotretinoin. However, isotretinoin has the drawback of being a teratogen, causing severe birth defects. In some cases antiandrogen therapy is even used to control androgen excess in women, since androgen production stimulates and causes enlargement of sebaceous glands.

Various skin care products are presently sold on the market to control acne.
25 However, none of these acne products use extracts of Santolina for the control of the acne producing bacteria *P. acnes*.

The field of this invention relates to the new antibacterial properties of Santolina
30 extract against the bacterium *Propionibacterium acnes*; and its applications in the fields of cosmetics and of dermatology for the treatment of acne and skin disorders associated with *P. acnes*. The extracts are useful in personal care or skin care

products to aid in the control, reduction, or elimination of *P. acnes* in individuals showing signs of skin acne.

5 Preservatives help maintaining the integrity of cosmetic, toiletry or pharmaceutical formulations. A preservative corresponds to any substance or mixture of substances able to prevent chemical or microbiological degradation of a product. More specifically, antimicrobial preservatives prevent bacterial or fungal damage (microscopic fungi or yeast). A preservative also prevents oxidation of a product, which may be related to its composition or its environment. An optimum
10 preservative thus includes both efficacious antimicrobial and antioxidant effects.

The preservatives widely used in the cosmetic industry include chemical compounds like parabens, imidazolidinyl urea, DMDM Hydantoin or phenoxyethanol. However environmental and health concerns prevail regarding the usage of such chemical preservatives. For example, parabens are becoming increasingly controversial,
15 particularly because of their potential estrogen-mimicking aspect (Golden R, Gandy J, Vollmer G (2005). "A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health". *Critical Reviews in Toxicology* **35** (5): 435–58, Darbre et al (2004) "Concentrations of parabens in human breast tumours", *J.Appl.Toxicol.* **24**, 5-13).

20 There is thus an impetus to develop natural alternatives to chemical preservatives. As natural ingredients appeal to consumers and as plants are known to possess biological activities, there is thus a need for a natural antimicrobial ingredient to replace synthetic ones.

25 Surprisingly, the inventors discovered and developed preservatives coming from vegetal source, which include ingredients that have both antimicrobial and antioxidant effects.

The present inventors have hence sought to develop a natural plant material based
30 preservative that dually functions as a sustained antimicrobial and antioxidant system and thus would enhance the shelf life of cosmetic and personal care formulations.

According to a first aspect, the invention therefore relates to an extract of *Santolina chamaecyparissus L.* obtained by extraction of the aerial parts with a solvent chosen from methanol, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, tetrahydrofuran, supercritical carbon dioxide and a mixture ethanol : water in a ratio of from 70:30 %
5 v/v to 99:1 % v/v, and preferably in a ratio of 96:4 % v/v

Specifically, the invention relates to a process for preparing an extract of *Santolina chamaecyparissus L.*, comprising the following steps:

- 10 a) mixing aerial parts of *Santolina chamaecyparissus L.* with a solvent chosen from methanol, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, tetrahydrofuran, supercritical carbon dioxide and a mixture ethanol : water in a ratio of from 70:30 % v/v to 99:1 % v/v, and preferably in a ratio of 96:4 % v/v
- b) macerating the mixture obtained in a) during at least 1h, preferably at ambient temperature or at around 50°C, and in such a case, most preferably at 50°C
- 15 c) filtering the mixture obtained in b), so as to obtain the filtrate and the retentate, the filtrate being the crude extract.
- c1) optionally decolorization and/or deodorization of the crude extract via charcoal yielding in decolorized extract.

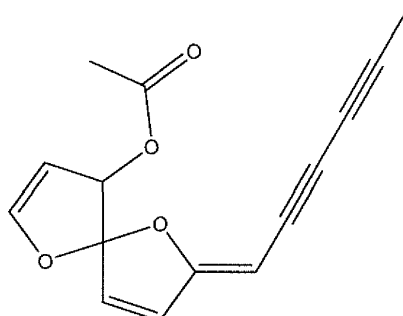
20 The invention also relates to an extract of *Santolina chamaecyparissus L.* obtainable by said process, and to compositions comprising it.

Such an extract may be a crude extract, or decolorized and/or deodorized extract. Thus obtained decolorized and/or deodorized extract is almost free from volatile compounds. Such extract does not impact organoleptic features of a composition to
25 which it is added.

Surprisingly, decolorized and/or deodorized extract maintains its antimicrobial/antifungal activity, despite its composition difference as compared to a crude extract which did not undergo a decolorization step.

Said extract or composition may be used as preservative, antioxidant, bactericide
30 and/or fungicide.

Finally, the invention also relates to the use of the compound of formula (I):



(I)

as preservative, antioxidant, bactericide and/or fungicide. Said compound is comprised in the extract according to the invention. Its chemical name is 1,6-dioxaspiro[4,4]nona-2,8-dien-4-yl,7-(2,4-hexadiyn-1-ylidene)-,4-acetate.

5

Particularly, in view of the above, and of the present description, said extract (crude or decolorized and/deodorized extract) according to the invention is not an essential oil. Indeed, it is not obtained by distillation, but by extraction; it has thus a different composition.

10

In the present invention, "preservative" means any substance or mixture of substances which prevents chemical and microbiological degradation of a product comprising it. Particularly, a preservative is a substance or mixture of substances which prevents degradation by bacteria, fungi and yeast, of a product comprising it.

15

Typically, the preservative properties of a substance or mixture of substances are evaluated on different strains of bacteria, like gram-positive bacteria and gram-negative bacteria; on yeasts; and on fungi. Typical gram-positive bacteria are *Pseudomonas aeruginosa*; typical gram-negative bacteria are *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli*; typical yeasts are *Candida albicans*; and typical fungi are *Aspergillus brasiliensis* or *Aspergillus niger*.

20

Thus, a preservative is a bactericide, a fungicide and an antioxidant.

"Antimicrobial" means bactericide and/or fungicide.

"Bactericide" means any substance or mixture of substances which prevents degradation by bacteria of a product comprising it.

25

In the same way, "fungicide" means any substance or mixture of substances which

prevents degradation by fungi of a product comprising it.

“Antioxidant” means any substance or mixture of substances which prevents oxidation of a product comprising it.

5 The extract of *Santolina chamaecyparissus* L. according to the invention is obtained by extraction of the aerial parts with a solvent chosen from methanol, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, tetrahydrofuran, supercritical carbon dioxide and a mixture ethanol : water in a ratio of from 70:30 % v/v to 99:1 % v/v, and preferably in a ratio of 96:4 % v:v. Preferably, the extract comprises the compound
10 of formula (I) mentioned above.

Santolina chamaecyparissus is a plant belonging to the family Asteraceae. Their flowers are yellow. The aerial parts of the plant may be flowers, stems, seeds, fruits or leaves. Preferably, said aerial parts comprise at least leaves.

15

The solvent used for extraction is very important in the present invention: indeed, it ensures the good properties of the final extract used as preservative.

Said solvent is chosen from:

- methanol,
- 20 - dichloromethane,
- ethyl acetate,
- acetone,
- supercritical carbon dioxide
- tetrahydrofuran and
- 25 - a mixture ethanol : water in a ratio of from 70:30 % v/v to 99:1 % v/v, and preferably in a ratio of 96:4 % v:v.

If methanol is used, it is pure in the present invention (i.e. the solvent is 100% methanol). As shown in example 5, methanol, dichloromethane, ethyl acetate, acetone or tetrahydrofuran ensure a high concentration of the compound of formula
30 (I) in the extract, and said compound is in part responsible for the good preservative and antioxidant activities (see example 4).

If a mixture ethanol : water is used, then ethanol and water have to be in a ratio of

from 70:30% v/v to 99:1 % v/v, and preferably in a ratio of 96:4 % v:v. For example, if one would like to use a ratio 75:25% v/v, then 75ml of ethanol have to be used in mixture with 25ml of water so as to obtain 100ml of solvent. As shown in examples 2 and 5, said ratio ensures a high concentration of the compound of formula (I) in the extract, and said compound is in part responsible for the good preservative and antioxidant activities (see example 4). Indeed, as shown in example 2, the antimicrobial activity with said mixture is as good as the one obtained with methylparaben.

The invention also relates to a process for preparing an extract of *Santolina chamaecyparissus L.*, comprising the following steps:

- a) mixing aerial parts of *Santolina chamaecyparissus L.* with a solvent chosen from methanol, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, tetrahydrofuran, supercritical carbon dioxide and a mixture ethanol : water in a ratio of from 70:30 % v/v to 99:1 % v/v, and preferably in a ratio of 96:4 % v:v.,
- b) macerating the mixture obtained in a) during at least 1h, preferably at ambient temperature or at around 50°C and in such a case, most preferably at 50°C,
- c) filtering the mixture obtained in b), so as to obtain the filtrate and the retentate, the filtrate being the crude extract,
- c1) optionally decolorization and/or deodorization of the crude extract using activated carbon.

Step a) of the process comprises mixing said aerial parts with a solvent chosen from methanol, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, tetrahydrofuran, supercritical carbon dioxide and a mixture ethanol : water in a ratio of from 70:30 % v/v to 99:1 % v/v. Preferably, if a mixture ethanol:water is used, the ratio of said mixture ethanol : water is from 75:25 % v/v to 99:1 % v/v, more preferably it is either around 80:20% v/v or around 99:1 % v/v, and most preferably it is 96:4 % v:v. The aerial parts may first be dried and ground into powder, before mixing with the solvent. Typically, the aerial parts of the plant are mixed with the required solvent in a ratio of 1 for 10 (i.e. 100g of aerial parts of the plant for 1L of solvent).

Then, the process comprises a step b) of macerating the mixture obtained in step a)

during at least 1h. Preferably, step b) is performed at ambient temperature or at around 50°C, and in such a case, most preferably at 50°C. By “ambient temperature”, it is meant a temperature between 20 and 25°C, preferably around 25°C. Preferably, step b) lasts at least 2h. Preferably, step b) is performed under mechanical stirring.

5

Thereafter, the mixture obtained in step b) is filtered in step c). The solution is indeed filtered in order to remove the insoluble substances. This filtration step is usual in the plant extract field, and those skilled in the art are able to adjust the reaction parameters thereof, on the basis of their general knowledge.

10 At the end of step c), a filtrate and a retentate are obtained. The filtrate corresponds to an extract of the invention.

Steps a) to c) of the process according to the invention correspond to an extraction.

15 The process according to the invention may also comprise a further (second) extraction. More specifically, said process may preferably comprise a further step d) comprising:

d1) mixing the retentate of step c) with the same solvent as the one used in step a),

20 d2) macerating the mixture obtained in d1) during at least 1h, preferably at ambient temperature or at around 50°C, and in such a case, most preferably at 50°C

d3) filtering the mixture obtained in d2), so as to obtain the filtrate and the retentate, and

25 d4) mixing the filtrate of step c) with the filtrate of step d3), said final mixture being the extract.

The features of step a) described above are also applicable to step d1).

The features of step b) described above are also applicable to step d2).

The features of step c) described above are also applicable to step d3).

30 Finally, the last step d4) comprises mixing both filtrates of each extraction, so as to obtain a final filtrate, corresponding to an extract according to the invention.

The process according to the invention may also comprise a further step e) of evaporation of the solvent of the extract. Said evaporation may occur according to classical methods known in the art, like vacuum-concentration.

5 Preferably, step e) comprises addition of a liquid cosmetic compound, and evaporation of the solvent (i.e. methanol or the mixture ethanol:water in the required ratio). Said step e) may be called a step of solvent substitution. Preferably, step e) comprises:

- e1) the addition of a cosmetic compound or a carrier chosen from polyols, alkyl-glucosides and alkyl-polyglucosides and monoglycerides to the extract, and
- 10 e2) the evaporation of the solvent of the extract obtained in e1), such as vacuum-concentration.

Step e1) is typically performed at ambient temperature. Step e2) is typically performed by heating at a temperature comprised between 50°C and 70°C, typically at around 60°C. If the polyol, alkyl-glucosides and alkyl-polyglucosides or the monoglyceride which is used is solid at ambient temperature, then said polyol, alkyl-glucosides and alkyl-polyglucosides or monoglyceride is previously heated so as to become liquid or semi-liquid at ambient temperature, before step e1).

The cosmetic compound chosen from polyols, alkyl-glucosides and alkyl-polyglucosides and monoglycerides is cosmetically acceptable, and is liquid or semi-liquid. By "cosmetically acceptable", it is meant a compound compatible with the skin and its appendages. By "liquid or semi-liquid", it is meant liquid or pasty. Typically, a liquid or semi-liquid compound is easy to mix in a cosmetic preparation at 30°C.

The cosmetic compound or carrier could be used as a solubilizer, an emulsifier, a surfactant or an humectant in order to improve the formulation of the said extract.

The said carrier could be a compound that does or does not occur in nature.

The cosmetic composition may contain combinations comprising at least one carrier. The polyols are also called glycols: they correspond to organic compounds comprising at least two -OH groups. Preferably, without being limited to, the polyols are diols (ie they comprise 2 -OH groups), like substituted or non-substituted 1,2-propanediols, ethylene glycol, diethylene glycol, propylene glycol, dipropylene glycol, butylene glycol, pentylene glycol; or they are triols (ie they comprise 3 -OH

groups), like 1,2-octanediol or glycerol.

The monoglycerides comprise glycerol monolaurate, glycerol monocaprinate, glycerol monocaprylate, glycerol monooleate, glycerol monomyristate, glycerol monopalmitate and glycerol monostearate.

5 The alkyl-glucosides and alkyl-polyglucosides comprise and are not limited to, decyl glucoside, arachidyl glucoside, butyl glucoside, caprylyl/capryl glucoside, caprylyl glucoside, cetearyl glucoside, coco-glucoside, ethyl glucoside, isostearyl glucoside, heptyl glucoside, lauryl glucoside, myristyl glucoside, hexadecyl glucoside, octadecyl glucoside, octyldodecyl glucoside or undecyl glucoside.

10 Preferably, the cosmetic compound is chosen from diols, triols and monoglycerides.

Among the substituted 1,2-propanediols, ethylhexylglycerin is preferred.

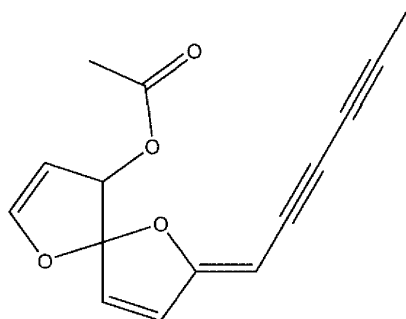
1,2-octanediol is also called caprylyl glycol.

15 More preferably, the cosmetic compound is chosen from ethylhexylglycerin, ethylene glycol, pentylene glycol, diethylene glycol, propylene glycol, 1,2-octanediol (or caprylyl glycol) and glycerol.

More preferably, the cosmetic compound is chosen from ethylhexylglycerin, caprylyl glycol and their mixtures. A preferred mixture is the mixture ethylhexylglycerin/caprylyl glycol sold under the name Sensiva SC10 by Schülke & Mayr.

20 In this case, the extract of *Santolina chamaecyparissus L.* which is obtained at the end of step e2) comprises the cosmetic compound, preferably ethylhexylglycerin or caprylyl glycol, as solvent.

25 The present invention also relates to an extract of *Santolina chamaecyparissus L.* obtainable by the process described above. Said extract preferably comprises at least the compound of formula (1):



(I)

The compound of formula (I) could also be of a synthetic origin.

The present invention also relates to a composition, particularly cosmetic or dermatological, comprising, in a physiologically acceptable medium, an extract of *Santolina chamaecyparissus L.* according to the invention. By “physiologically acceptable medium”, it is meant a medium compatible with the administration to a subject. Preferably, the composition comprises from 0.1% to 10% by weight of the extract of *Santolina chamaecyparissus L.* according to the invention, more preferably from 0.2% to 7%, more preferably from 0.3% to 5% by weight, more preferably from 0.3% to 1% by weight.

Said composition may be cosmetic, pharmaceutical (preferably dermatological), a food composition, or a chemical composition.

Said cosmetic or pharmaceutical (preferably dermatological) composition can in particular be suitable for topical application.

Advantageously, said cosmetic or pharmaceutical (preferably dermatological composition) can be in the form of a powder, an emulsion, a microemulsion, a nanoemulsion, a suspension, a solution, a lotion, a cream, a gel cream, an aqueous or aqueous-alcoholic gel, a foam, a serum, an aerosol solution or dispersion, or a dispersion of lipid vesicles.

In the case of an emulsion, it may be a water-in-oil or oil-in-water emulsion.

The cosmetic or pharmaceutical (preferably dermatological) composition according to the invention also comprises a solvent chosen according to the various ingredients and to the administration form.

By way of examples, mention may be made of water (preferably demineralized water) or an alcohol such as ethanol.

Said cosmetic or pharmaceutical composition can also comprise at least one additive that is usual in the field, such as, for example, at least one compound chosen from an emollient or humectant, a gelling agent and/or thickener, a surfactant, an oil, an active agent, a dye, an active agent, an organic or inorganic powder, pigments, a sunscreen and a fragrance.

In particular, said composition can comprise:

- one or more emollient(s) or humectant(s), which can be chosen, for example, from glycerine and other glycols. Said emollient or humectant may be present in the composition at a content of the order of 0.1% to 30%, preferably 2% to 10% by total weight of the composition;

- one or more aqueous phase gelling agent(s) and/or thickener(s), chosen, for example, from cellulose derivatives, gums of plant origin (guar, carob, alginates, carrageenans, pectin, tragacanth) or of microbial origin (xanthan), clays (laponite, bentonite), acrylate copolymers, like acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer. Said gelling agent and/or thickener may be present in the composition at a content of the order of 0.1% to 10% by total weight of the composition;

- one or more surfactant(s), preferably non-ionic, present at a content of the order of 0.1% to 10%, preferably 0.5% to 8% by total weight of the composition;

- one or more fatty substance(s) that is (are) liquid at ambient temperature, commonly called oil(s), that may be volatile or non-volatile, hydrocarbon-based or silicone-based, linear, cyclic or branched, for example vegetal oils (jojoba oil, wheat germ oil), isododecane, octyldodecanol, squalane, isohexadecane or dimethicone, preferably in a proportion of 0.1% to approximately 20%, preferably 0.5% to 15% by total weight of the composition;

- one or more active agent(s) of natural or synthetic origin having a biological activity, for example chosen from vitamins, allantoin or plant extracts; and/or

- one or more water-soluble dye(s), preferably in a proportion of 0.1% to approximately 2% by total weight of the composition.

Other additives normally used in cosmetics or in pharmacy can also be present in the composition according to the invention, in particular fragrances well known in the

technical field.

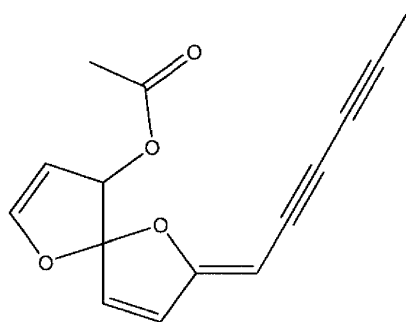
Those skilled in the art are capable of choosing, among all these possible additives, both the type and the amount of those which will be added to the composition, in such a way that the latter conserves all its properties.

5

The invention also relates to the use of an extract of *Santolina chamaecyparissus* L. according to the invention, or to the use of a composition comprising it, as preservative, antioxidant, bactericide and/or fungicide.

10

The invention also relates to the use of the compound of formula (I):

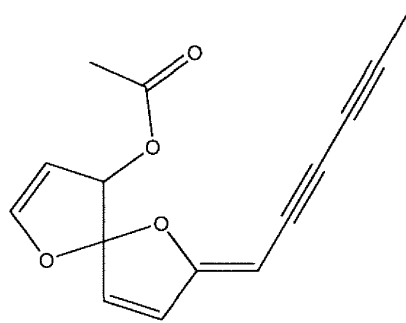


(I)

as preservative, antioxidant, bactericide and/or fungicide.

15

The invention also relates to the use of a composition comprising the compound of formula (I):



(I)

as preservative, antioxidant, bactericide and/or fungicide.

The invention is illustrated in a non limiting manner by the examples below.

5 **Example 1: Plant extraction of *Santolina chamaecyparissus* L.**

Aerial parts of *Santolina chamaecyparissus* L. (also called “santolina” in the examples, unless indicated otherwise) were harvested, dried, ground into powder and extracted under mechanical stirring using a mixture of water and ethanol (75:25 v/v) (steps a) and b)). The extraction was repeated once (step d)), and both extractions were performed at 25°C during 2 hours (step c)). The obtained extracts were filtered, stirred together and vacuum-concentrated (step e)).

Crude extracts were analyzed by HPLC using an Agilent 1200 system equipped with a DAD and an ELSD detectors. Separation was performed using a Luna C18 column (Phenomenex, 250 x 4.6 mm; 5 µm). HPLC grade acetonitrile, water and 2-propanol (Sigma-Aldrich), acidified with formic acid 0.1%, were used according to the following gradient (Table 1):

Time (min)	Water (%)	Acetonitrile (%)	2-propanol (%)
0-5	95	5	-
5-35	0	100	-
35-45	0	100	-
45-50	-	40	60
50-60	-	40	60
60-65	5	95	-
65-70	5	95	-

20 **Table 1 : Solvent gradient used for HPLC-ELSD analysis**

The characteristic analytical profile (HPLC-ELSD) of *S. chamaecyparissus* was obtained (data not shown).

Example 2: Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of the crude extract obtained in example 1

The crude extracts mentioned in this example were obtained in example 1.

5

1) Antimicrobial activity assay

Background and samples preparation:

Antimicrobial activity of the crude extracts was determined using a 96-well microtiter plate assay based on growth inhibition. The assay was performed on four
10 different microbial strains, chosen according to the European Pharmacopoeia (ATCC references): *Staphylococcus aureus* (gram-negative bacteria), *Escherichia coli* (gram-negative bacteria), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-positive bacteria), *Propionibacterium acnes* (anaerobic gram-positive bacteria), *Aspergillus niger* (fungus) and *Candida albicans* (yeast).

15 Samples for antimicrobial assay were prepared as follows: crude extracts were diluted at 200 mg/mL in a mixture of appropriate solvents, e.g. ethanol and water (60:40 v/v) or pure dimethylsulfoxide. After solubilization, the solutions were filtrated on 0.45 µm syringe filters.

20 *Assay procedure:*

The assay was performed for each strain according as follows: samples (at 200 mg/mL) were first diluted to 4 % in water, then to 2 % and 0.2 % in wells. Final concentrations were also 0.4 and 0.04 % of crude extracts in wells. Each concentration was assessed in replicate with one supplementary control well
25 containing no microbial strain. For the assay at 2 %, samples were mixed up in the wells with growth medium (95 µL) and microbial suspension (representing an absorbance of 0.6 for *C. albicans*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* and 40 spores/µL for *A. niger*). For the assay at 0.2 %, samples were first diluted to 0.2 % with water in the wells. Negative controls constituted of the solvent mixture used to prepare the
30 sample solutions, and positive controls with a synthetic preservative (methyl-paraben and/or phenoxyethanol, positive standard) were also prepared. Results were also

compared with those obtained using a commercial natural preservative (commercial preservative). The 96-well plates were incubated at 25°C.

The absorbance was read for each plate at 620 nm 24, 48 and 72 hours after the beginning of the incubation to evaluate the growth of each microorganism in presence of crude extracts.

The results were expressed as a percentage of growth inhibition by the samples for each microorganism.

In a second step for the optimized extract of *S. chamaecyparissus*, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were also measured including *E. coli* and *P. acnes*. The MIC is defined as the lowest concentration of an antimicrobial that will inhibit the visible growth of a microorganism after incubation from 24h to 72h according to the microbial strains. The MBC is the lowest concentration of antibacterial agent required to kill a particular bacterium, that is to say to reduce the viability of the initial bacterial inoculum by >99.9%. The dilutions were run in triplicate for the MIC and MBC test. At the end of the incubation, the tubes were read for the growth inhibition and then the MBC was determined by sampling all the macroscopically clear tubes and the first turbid tube in the series.

The results were expressed in mg/mL of extract.

2) Results for *S. chamaecyparissus* crude extracts

S. chamaecyparissus crude extracts exhibited antimicrobial activity as shown in Table 2 (the results presented correspond to one reference crude extract, which is representative of most of extracts that have been evaluated):

Sample	Microbial strain	Growth inhibition (%)			Review
		24h, 2%	48h, 2%	72h, 2%	
Crude extract	Aspergillus niger		<u>102</u>	<u>101</u>	+++
	Candida albicans	<u>100</u>	<u>100</u>		+++
	Pseudomonas aeruginosa		1	-55	-
	Staphylococcus aureus	<u>97</u>	<u>98</u>		+++
Commercial preservative	Aspergillus niger		-65	-99	-
	Candida albicans	0	-10		-
	Pseudomonas aeruginosa		-48	-19	-
	Staphylococcus aureus	-3	-54		-
Positive standard (0.4%)	Aspergillus niger		<u>100</u>	<u>100</u>	+++
	Candida albicans	<u>99</u>	<u>100</u>		+++
	Pseudomonas aeruginosa		<u>75</u>	<u>81</u>	++
	Staphylococcus aureus	<u>80</u>	<u>93</u>		++

Table 2: Antimicrobial activity of *S. chamaecyparissus* crude extracts and commercial preservatives

- 5 Numbers in bold & underlined: medium inhibition greater or equal to 60%
- +++ : medium inhibition greater or equal to 90%
- ++ : medium inhibition comprised between 70% and 90%
- + : medium inhibition comprised between 60% and 70%
- ~ : medium inhibition comprised between 20% and 60%
- 10 - : medium inhibition less or equal to 20%

Positive standard: methylparaben

5 => As antimicrobial activity was considered to be interesting above 60 % of growth inhibition, *Santolina chamaecyparissus* crude extracts showed a very interesting activity on 3 of the 4 microbial strains, e.g. *S. aureus*, *A. niger* and *C. albicans*. It was interesting to notice that a commercial extract sold for its preservative properties did not show any activity, in contrast to the positive standard (methylparaben).

10 3) Description of the antioxidant assays

Sample solutions for antioxidant assays were prepared in methanol, sonicated and filtered on 0.45 µm syringe filters.

Total phenolic content (Folin-Ciocalteu assay)

15 Total phenolic content of santolina crude extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method based on oxidation of a phenolate ion from an antioxidant sample and reduction of the phosphotungstic-phosphomolybdate reagent (Folin-Ciocalteu reagent) under alkaline conditions. As a result of this reduction, the chromophore moiety turns into from a yellow complex to a blue phosphotungstic-phosphomolybdic, representative of the presence of phenols (antioxidant biological species) in the sample. The concentration of these biological species is proportional to the light absorption at a wavelength of 750 nm, where other biological species do not absorb. The absorbance values of the samples were compared to a standard, which is commonly gallic acid. Total phenolic content is thus expressed as gallic acid equivalent (GAE) in milligrams per gram of plant extract.
20
25

Antiradical power: DPPH assay

30 The antiradical power of the sample was measured by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) electron-transfer assay. DPPH is a free radical, which is purple in solution and reduced and getting yellow to colorless in presence of an antioxidant sample. The antiradical power of a sample is thus measured by the capacity to neutralize free radicals responsible for oxidation. DPPH reduction is observed by a spectrophotometric measurement of absorbance value at 520 nm (the lower the

absorbance, the stronger the antioxidant activity). The IC_{50} (inhibiting concentration 50%) is the parameter determined with this assay. It corresponds to the concentration of antioxidant sample that reduces 50% of the initial DPPH concentration, expressed in micrograms of sample per milliliters of methanol.

5

4) Antioxidant activity of crude extracts

Different *S. chamaecyparissus* crude extracts were evaluated (different origins and harvesting periods) and showed a total phenolic content (GAE) varying between 33 and 70 mg/g. As standards, natural rosemary extracts commercialized for their high antioxidant properties were evaluated and expressed a total phenolic content of about 85 mg/g. Another commercial antioxidant extract made of wasabi was evaluated and expressed only about 27 mg/g GAE.

10

Concerning the DPPH assay, the lowest IC_{50} of *S. chamaecyparissus* extracts was 118 $\mu\text{g/mL}$. As a comparison, an extract of rosemary, known for its antioxidant potential, presented a very similar IC_{50} , namely 103 $\mu\text{g/mL}$.

15

=> As a conclusion, the *S. chamaecyparissus* crude extracts according to the invention seem to present an interesting antioxidant potential.

20

Example 3: Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of the fractions isolated from the crude extract of example 1

1) Fractionation of the crude extract

As the reference *S. chamaecyparissus* extract (ethanol:water 75:25 v/v) exhibited a strong antimicrobial activity, bioguided fractionation was performed to identify the fraction(s) containing active metabolites. Open column chromatographic fractionation of the crude extract was performed.

25

Fractionation was performed on a silica gel (normal phase) open column and yielded five fractions: cyclohexane fraction (F1), cyclohexane:ethyl acetate fraction (F2),

30

ethyl acetate fraction (F3), ethyl acetate:methanol fraction (F4) and methanol fraction (F5).

All obtained fractions were analyzed by HPLC-ELSD in the same conditions as the crude extracts to have a qualitative idea of the different metabolites constituting each fraction.

2) Antimicrobial activity of santolina fractions

Fractions obtained from *S. chamaecyparissus* crude extract were submitted to antimicrobial activity assays (as explained in example 2) if sufficient quantity was present. Sample solutions were prepared at 100 mg/mL in DMSO and assessed the same way as crude extracts.

The results were as following in Table 3 (only fractions with an activity, even weak, are shown):

Sample	Microbial strain	Growth inhibition (%)			Review
		24h, 2%	48h, 2%	72h, 2%	
F2	Aspergillus niger		<u>100</u>	<u>100</u>	+++
	Candida albicans	<u>99</u>	<u>98</u>		+++
	Pseudomonas aeruginosa		<u>94</u>	<u>90</u>	+++
	Staphylococcus aureus	<u>105</u>	<u>113</u>		+++
F3	Aspergillus niger		<u>90</u>	<u>103</u>	+++
	Candida albicans	<u>96</u>	44		~
	Pseudomonas aeruginosa		6	-12	-
	Staphylococcus aureus	-24	15		-
F4	Aspergillus niger		<u>68</u>	7	~
	Candida albicans	17	13		-

Pseudomonas aeruginosa		13	8	-
Staphylococcus aureus	36	56		-

Table 3 : Antimicrobial activity of *S. chamaecyparissus* fractions of interest

Bold & underlined: medium inhibition greater or equal to 60%

+++ : medium inhibition greater or equal to 90%

++ : medium inhibition comprised between 70% and 90%

5 **+** : medium inhibition comprised between 60% and 70%

~ : medium inhibition comprised between 20% and 60%

- : medium inhibition less or equal to 20%

10 => F2 cyclohexane:ethyl acetate fraction showed an increased activity. The presence of one major metabolite in this fraction that is not present in the other normal-phase fractions, is noticed, and this metabolite could be responsible for the antimicrobial activity (or part of) of santolina crude extracts.

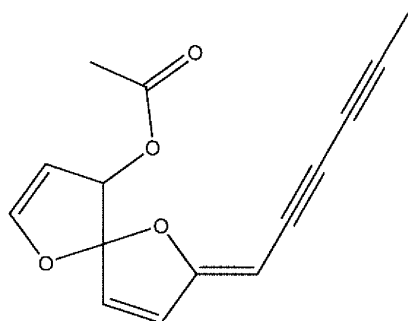
15 **Example 4: Isolation of the active metabolite and properties thereof**

20 Semi-preparative HPLC was performed on the active cyclohexane:ethyl acetate santolina fraction in order to purify the major metabolite supposed to be responsible for the antimicrobial activity. It was carried out on a Luna C18 column (Phenomenex, 250x10 mm; 5 μ m). Elution profile was optimized and the single component of interest was successfully isolated using a gradient of non-acidified HPLC grade water and acetonitrile. The single component was vacuum-concentrated and submitted to structure elucidation techniques.

25 **1) Structure elucidation**

1D- and 2D NMR

30 NMR experiments were performed using a BRUKER Avance spectrometer (^1H 500, 13 MHz). All 1D (^1H , ^{13}C) and 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) spectra were acquired in chloroform (CDCl_3). The following structure of formula (I) was identified:



(I)

This molecule has following molecular formula: C₁₅H₁₂O₄ and following molecular weight: 256,2534 g/mol. It is already known as 1,6-dioxaspiro[4,4]nona-2,8-dien-4-ol,7-(2,4-hexadiyn-1-ylidene)-,4-acetate and belongs to the secondary metabolites polyacetylenes family.

UPLC-HRMS

The isolated metabolite was analyzed by UPLC-ESI-HRMS using a Waters Acquity system. The inventors used UPLC-HRMS to identify the active metabolite in santolina crude extract. With the developed method, the mass-to-charge ratio (m/z) of its ion in positive mode was [M+H]⁺=257.0816 g/mol (data not shown).

This information confirmed the hypothesis of the proposed molecule, since the molecular weight of the known compound was established as M=256.2534 g/mol.

2) Validation of the activity of the pure compound (formula (I))

The pure compound appeared to be unstable once isolated, and particularly in aqueous and acid conditions. Since antimicrobial assays were performed in water, its antimicrobial activity could not be evaluated as for crude extracts or plant fractions.

Thus, the inventors tried to establish a relationship between antimicrobial activity and active substance content in crude extracts.

Relationship between antimicrobial activity and active substance content

A quantitation of the active substance was performed by HPLC-UV. The same solvent gradient as for HPLC-ELSD analysis was applied but stopped at 43 min. A

calibration curve was determined using a *trans*-cinnamic acid standard (that has a retention time relatively close to the active substance retention time) prepared at different concentrations (from 0.0078 to 1 mg/mL) in methanol. Different santolina crude extracts (E1 to E2) were diluted to 20 mg/mL in methanol and analyzed by HPLC-UV at 310 nm, which is the absorption maximum of the active substance (and which allows comparison between the different extracts). The linear regression equation generated by the calibration curve permitted to calculate the value of active substance by corresponding integration and area peak measurement.

Antimicrobial activity assays (as explained in example 2) were also performed on said crude extracts, and the following results were obtained (table 4):

Crude extracts	Relative active substance concentration (mg/g)	Antimicrobial activity			
		<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
E1	17,60	+	+	+	+
E2	0,00	-	-	-	+

Table 4 : Active substance concentration and antimicrobial activity of santolina crude extracts

+: strong activity, ~: weak activity, -: no activity

=> The results show that a relationship between active substance concentration in crude extracts and their antimicrobial activity can be observed, especially on *A. niger* and *C. albicans*.

However, the activity on *S. aureus* seems to be independent of the presence of the active substance (formula (I)).

To confirm this hypothesis, the inventors wondered if other plants of the genus *Santolina* also containing the active substance would present the same results.

Antimicrobial activity of other Santolina species containing the active substance

Two other *Santolina* species (*Santolina rosmarinifolia* L. and *Santolina pinnata* L.) were investigated. Crude extracts were prepared and analyzed by HPLC-ELSD to confirm the presence of the active substance. They were then submitted to the same

HPLC-UV quantitation as described in the previous paragraph, and to antimicrobial activity assays, and the following results were obtained (table 5):

Crude extracts	Relative active substance concentration (mg/g)	Antimicrobial activity			
		<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
S. rosmarinifolia	3,97	+	+	-	+
S. pinnata	4,56	+	-	-	-

Table 5 : Active substance concentration (mg of active/g of extract) and antimicrobial activity of *Santolina* species.

5 +: strong activity, -: no activity

=> The results show differences of activity between these extracts and *S. chamaecyparissus* extracts. It can be explained by differences of chemical composition of the species.

10 => The presence of the active substance (formula (I)) and the antimicrobial activity can although be correlated.

Example 5: Formulation of the extract as a natural preservative

15 1) Optimization of the extraction process

Optimization of solvent extraction

As the inventors demonstrated that antimicrobial activity is in relation with active metabolite (compound of formula (I)) concentration, optimization of the extraction
20 process was performed with modification of solvents.

Ethanol/Water gradient

The initial solvent of extraction was a mix of ethanol/water 75:25 v.v. First step was also to change this gradient from 100% of ethanol to 100% of water. Seven new
25 solvents were evaluated as described in Table 6:

Ethanol (%)	Water (%)	Active substance (formula (I)) concentration (mg/g)
100 (absolute EtOH)	0	8.5
100 (96° EtOH)	0	15.0
80	20	19.9
60	40	2.9
40	60	0.3
20	80	-
0	100	-

Table 6 : EtOH/Water solvent extraction gradient

5 These crude extracts were then analyzed using UV-HPLC at 310 nm and the active metabolite was quantified following the method described in example 4. Higher concentration was found for EtOH/Water 80:20 v:v gradient. No active was observed in water extract, neither for weak percentage of water in extraction solvent. Higher active substance concentration was found for 80% and 96% of ethanol and decreased then for higher purity of ethanol.

10 => Optimal gradient was thus between 60 and 96% v/v of ethanol.

Other solvents

The second step was to compare other solvents to extract the plant and then quantify the metabolite concentration. Tested solvents were tetrahydrofuran, acetone, 15 dichloromethane, methanol, absolute ethanol, ethanol 96°, ethyl acetate and methyltetrahydrofuran.

Ethanol (%)	Active substance (formula (I)) concentration (mg/g)
Absolute ethanol	8.5 ± 1.2
Ethanol 96°	15.0 ± 1.0
Methanol	44.3 ± 2.6
Ethyl acetate	20.3 ± 0.8

Tetrahydrofuran	12.0 ± 0.9
Acetone	34.0 ± 0.9
Dichloromethane	40.8 ± 0.8
Methyltetrahydrofuran	16.4 ± 0.7

Table 7 : Active substance concentration in function of extraction solvents

As shown in Table 7, methanol was the extraction solvent giving the higher concentration of metabolite before dichloromethane, acetone and ethyl acetate which gave very good data too.

All these 4 solvents gave higher active concentrations than ethanol/water 80:20 v/v. Methanol was also selected for the rest of the optimization of the extraction process to produce a cosmetic ingredient.

2) Optimization of a cosmetic preservative

Solvent extract of *Santolina chamaecyparissus* was not an easy to use ingredient for cosmetic as it was thick and doughy. To remove this drawback, a liquid and specific cosmetic raw material was added. In order to do this, extraction process was modified as follows:

After the two methanolic extractions processing of aerial parts of *Santolina chamaecyparissus* L. (see example 1), the obtained extracts were filtered and stirred together. Then, one selected liquid cosmetic raw material was added to the extract under stirring. Finally, methanol was eliminated under vacuum.

Several cosmetic raw materials were selected. They were polyols (like glycols, such as glycerol) and monoglyceride esters.

After concentration of the extract, the inventors obtained a product easier to use in cosmetic formulations.

Extract solubility in liquid cosmetic raw material

The list of cosmetic raw materials added during the extraction process is described in Table 8.

Santolina chamaecyparissus was extracted (methanol extraction) according to the above protocol, and each of the cosmetic raw materials was added. Then, a classification was done in function of crude extract solubility therein as follows:

Raw material	<i>Santolina chamaecyparissus</i> solubility
Ethylhexylglycerin	Very soluble
Ethylhexylglycerin/Caprylyl glycol	Very soluble
Glyceryl caprate	Very soluble
Caprylyl glycol	Very soluble
Capryloyl glycine	Soluble
Glyceryl caprylate	Soluble
Heptyl glucoside	Soluble
Glycerin	Moderately soluble
Propylene glycol	Moderately soluble
Butylene glycol	Moderately soluble
Pentylene glycol	Moderately soluble
Propanediol	Moderately soluble

5 **Table 8 : List of cosmetic raw materials tested for the cosmetic ingredient optimization and *Santolina chamaecyparissus* solubility in these products.**

Ethylhexylglycerin was the raw material in which the crude extract of *Santolina chamaecyparissus* presented the best solubility. Three of the best raw materials for the plant extract were also selected for antimicrobial activity evaluation:

- 10
- Ethylhexylglycerin,
 - Ethylhexylglycerin/caprylyl glycol (Sensiva SC10 from Schülke & Mayr)
and
 - Caprylyl glycol.

15 These 3 ingredients were liquid and easy to use for cosmetic formulations.

Metabolite concentration in optimized extract

Before biological test, HPTLC analysis were done on these three optimized extracts and compared with the crude extract without any cosmetic raw material.

HPTLC analysis

5 Metabolite relative quantification was done using a Camag HPTLC system (Muttenez, Switzerland) equipped with an automatic TLC sampler (ATS4), an automatic developing chamber (ADC 2), a visualizer and a TLC scanner 4 controlled with WinCATS software. Sample solutions were applied on silica gel 60 F₂₅₄ plates (20 x 10 cm x 0,20mm) purchased from Merck. All plates were developed until
10 70 mm from the lower edge, with humidity control from 33 to 38 % and 20 min of saturation. Mobile phase for plates development was toluene/ethyl acetate/formic acid 96:4:1 v/v. Plates were scanned at 315 nm in reflectance mode, with D2 and W lamp, slit dimension of 8,00 mm x 0,40mm, scanning speed of 20 mm/s and data resolution of 100µm/step.

15 Calibration curve was performed with stock solutions of *Santolina chamaecyparissus* (crude methanolic extract) at 1 mg/mL in methanol. Several amount of the stock solution (1, 2, 6, 8 and 12 µL) were applied on plates which were then developed and scanned. The calibration plots of peak areas versus concentration were polynomial equation (second degree). R² coefficient was acceptable above 0,99. The metabolites
20 eluted with a Rf of 0,42.

Identification of the metabolite through TLC development was performed using isolated compounds.

HPTLC dosage

25 Active compound concentration was compared in each sample as described in Table after pilot extraction. A very high metabolite concentration in all products (between 31,3 and 38,9 mg of active/g of extract) was observed. Also, the addition of cosmetic raw material during the extraction process did not affect the active compound.

Ingredient	Active substance concentration in the extract (mg/g)
Crude extract of <i>Santolina chamaecyparissus</i>	38.9 ± 1.5

<i>Santolina chamaecyparissus</i> + RM1	31,3 ± 1.2
<i>Santolina chamaecyparissus</i> + RM2	36,2 ± 1.8
<i>Santolina chamaecyparissus</i> + RM3	33,6 ± 0.9

Table 9 : active substance concentration in *Santolina chamaecyparissus* extract without and with addition of cosmetic raw materials during extraction process

RM1: raw material 1 (ethylhexylglycerin), RM2: raw material 2 (ethylhexylglycerin/caprylyl glycol), RM3: raw material 3 (caprylyl glycol).

5

For the rest of the study, the three evaluated products are named as follows:

- "Ingredient 1": *Santolina chamaecyparissus* + Ethylhexylglycerin,
- « Ingredient 2 »: *Santolina chamaecyparissus* + Ethylhexylglycerin/caprylyl glycol and
- « Ingredient 3 »: *Santolina chamaecyparissus* + caprylyl glycol.

10

Antimicrobial activity of Santolina chamaecyparissus extract with selected cosmetic raw materials

15

Antimicrobial activity of the methanolic crude extract and the three ingredients containing the crude extract and selected cosmetic raw materials was evaluated against five microorganisms at 0,4 and 0,04 % during 48 to 72 h:

20

- *Aspergillus niger*,
- *Escherichia coli*,
- *Candida albicans*,
- *Pseudomonas aeruginosa*, and
- *Staphylococcus aureus*.

Details of results are described in Tables 10 to 13 below.

Table 10 : Inhibition percentage of microorganisms with crude methanolic extract of *Santolina chamaecyparissus* at 0,4 and 0,04 % at 24, 48 and 72 h. Inhibition > 90 % was noted +++, inhibition > 80 % and at less 70 % was noted ++, inhibition >60 % was noted +, inhibition > 60 % but lots was notes ~, Inhibition < 60 % was noted -.

Sample	Strains	Inhibition percentage (%)						Analyze
		24h		48h		72h		
		0,4%	0,04%	0,4%	0,04%	0,4%	0,04%	
<i>Santolina chamaecyparissus</i> Crude extract	<i>Aspergillus niger</i>			93	50	91	12	0,4% +++
	<i>Escherichia coli</i>	-76	35	29	24	12	24	-
	<i>Candida albicans</i>	103	2	41	17			++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			26	14	18	0	-
Extraction solvent: MeOH			102	-62	100	-38		+++

Table 11 : Inhibition percentage of microorganisms with ingredient 1 at 0,4 and 0,04 % at 24, 48 and 72 h. Inhibition > 90 % was noted +++, inhibition > 80 % and at less 70 % was noted ++, inhibition > 60 % but lots was notes ~, Inhibition < 60 % was noted -.

Sample	Strains	Inhibition percentage (%)						Analyze
		24h		48h		72h		
		0,4%	0,04%	0,4%	0,04%	0,4%	0,04%	
<i>Santolina chamaecyparissus</i> Ingredient 1	<i>Aspergillus niger</i>			96	75	97	60	0,4% +++
	<i>Escherichia coli</i>	100	39	101	54	98	61	+++
	<i>Candida albicans</i>	107	3	101	10			+++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			63	10	53	19	~
Extraction solvent: MeOH			95	-55	98	9		+++

Table 12 : Inhibition percentage of microorganisms with ingredient 2 at 0,4 and 0,04 % at 24, 48 and 72 h. Inhibition > 90 % was noted +++, inhibition > 80 % and at less 70 % was noted ++, inhibition >60 % was noted +, inhibition > 60 % but lots was notes ~, Inhibition < 60 % was noted ~.

Sample	Strains	Inhibition percentage (%)						Analyze
		24h		48h		72h		
		0,4%	0,04%	0,4%	0,04%	0,4%	0,04%	
Santolina chamaecyparissus Ingredient 2 Extraction solvent: MeOH	<i>Aspergillus niger</i>	50	39	88	71	99	22	0,4% +++
	<i>Escherichia coli</i>	104	14	85	13	103	45	++
	<i>Candida albicans</i>			85	-11	84	13	++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66	-99	93	-3			+

Table 13 : Inhibition percentage of microorganisms with ingredient 3 at 0,4 and 0,04 % at 24, 48 and 72 h. Inhibition > 90 % was noted +++, inhibition > 80 % and at less 70 % was noted ++, inhibition >60 % was noted +, inhibition > 60 % but lots was notes ~, Inhibition < 60 % was noted ~.

Sample	Strains	Inhibition percentage (%)						Analyze
		24h		48h		72h		
		0,4%	0,04%	0,4%	0,04%	0,4%	0,04%	
Santolina chamaecyparissus Ingredient 3 Extraction solvent: MeOH	<i>Aspergillus niger</i>	114	32	98	28	97	36	0,4% +++
	<i>Escherichia coli</i>	97	-6	97	5	97	16	+++
	<i>Candida albicans</i>			103	-26	101	8	+++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	102	-105	101	-4			+++

Crude extract was active against *A. niger*, *C. albicans* and *S. aureus* at 0,4 %.

Ingredient 1 was active against *A. niger* and *E. coli* at 0,4 and 0,04 % and against *C. albicans* and *S. aureus* at 0,4 % of *Santolina chamaecyparissus* extract. Finally, it was moderately active against *P. aeruginosa*.

5 Ingredient 2 was active against the five microorganisms at 0,4 % of *Santolina chamaecyparissus* extract and additionally it was active against *A. niger* at 0,04 % during 48 h.

Ingredient 3 was active against the five microorganisms at 0,4 % of *Santolina chamaecyparissus* extract.

10

=> Finally, a better inhibition of all ingredients was observed in comparison to the crude extract alone. These ingredients were also optimized for antimicrobial activity and cosmetic use.

15

3) Evaluation of the antimicrobial activity for cosmetic preparations

Challenge test (description of the test)

The challenge test is designed to provide the level of biological activity possessed by the preservative system of cosmetic products. Briefly, a controlled amount of specific
20 microorganisms is inoculated in products. Mixtures are stocked in controlled conditions and microorganisms are counted at known times for 28 days.

Antimicrobial preservative effectiveness of the formulations was performed following the method recommended by the European Pharmacopeia (7th edition --
25 2011).

25

Microorganisms

Tested microorganisms were:

Bacteria

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

30

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Escherichia coli ATCC 8739

Fungi & mold

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404

These one are potential pathogenic germs and could contaminate products as they are issued from biotypes such as water, skin, intestinal or environmental.

5

Culture Media

Tested strains were prepared as described in Table 14:

Strains	Preservation	Culture media	Densities (CFU/mL)	Incubation temperature
	Storage temperature			
<i>P. aeruginosa</i>	-80°C ± 5°C	Tryptic Soy Agar (TSA)	10 ⁷ -10 ⁸	32,5°C ± 2,5°C
<i>S. aureus</i>	-80°C ± 5°C	Tryptic Soy Agar (TSA)	10 ⁷ -10 ⁸	32,5°C ± 2,5°C
<i>E. coli</i>	-80°C ± 5°C	Tryptic Soy Agar (TSA)	10 ⁷ -10 ⁸	32,5°C ± 2,5°C
<i>C. albicans</i>	-80°C ± 5°C	Sabouraud Dextrose	10 ⁷ -10 ⁸	22,5°C ± 2,5°C
<i>A. brasiliensis</i>	-80°C ± 5°C	Sabouraud Dextrose	10 ⁶ -10 ⁷	22,5°C ± 2,5°C

Table 14 : Strain preparation

10

Procedure

The test organisms specified were to be tested separately in cosmetic products.

The product to be tested is distributed in single-use sterile flasks (20 g of product/flask) and every flask is inoculated with the suspension of one strain to be tested. Final concentration is about 10⁵ to 10⁶ microorganisms/g.

15

Inoculated products were to be held at 22,5 °C ± 2,5 °C in darkness during the test.

Neutralization

Neutralization of preservative system was validated and performed on the 5 strains with LT 100 Broth at 1/10th and 1/100th dilution.

Interpretation

5 Sampling and analysis are done after 2-day, 7-day, 14-day and 28-day period. Each sample was neutralized and enumeration method was applied (results in CFU/g). The microbial densities obtained during the follow-up for each of the tested strains are counted and compared with the thresholds of the logarithmic reduction imposed by the reference table (table 15).

10

European Pharmacopeia

Strains	Criteria	Logarithmic reduction			
		Day-2	Day-7	Day-14	Day-28
Bacteria	A	≥2	≥3	/	NI
	B	/	/	≥3	NI
Fungi/mold	A	/	/	≥2	NI
	B	/	/	≥1	NI

*Table 15 : Table of logarithmic reduction imposed by the European Pharmacopeia
NI: No Increase; /: No minimal reduction required*

Cosmetic formulations

15 Challenge tests were realized with oil-in-water (O/W) emulsions comprising or not *Santolina chamaecyparissus* extract. The O/W emulsion formulations are described in Table 16.

Table 16 : O/W emulsions with Santolina chamaecyparissus extract

Raw material (INCI)	% (w/w)	Procedure
Aqua	Qsp	
	4,00	
A Glycerin	(formula 1)	Heat A at 55°C
	or 10,00	
	(formula 2)	

B	Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,15	Add B
	Polyoxyethylene (2), stearyl ether	2,00	
	Steareth-21, polyethoxylated alcohol	2,00	
	Stearyl alcohol	1,50	
	Glyceryl stearate	3,00	
	Octyldodecanol	3,00	
	Squalane	2,50	
	Isohexadecane	3,00	Heat C at 75°C, heat
C	<i>Simmondsia chinensis</i> (Jojoba) seed oil	1,50	A+ B at 75° and
	<i>Triticum vulgare</i> (weat) germ oil	1,50	emulsified C in A+B
	Butylhydroxytoluene	0,05	
	Butyrospermum parkii butter	2,00	
	Dimethicone	1,50	
	Butyl methoxydibenzoyl-methane	1,00	
	Ethylhexyl methoxycinnamate	1,50	
	Dimethicone	2,00	
D	Triethanolamine	0,11	Add D and E at 60°C
E	Titane dioxyde, paraffin oil	1,25	
	Panthenol, propylène glycol	0,20	
F	Tocopheryl	0,50	Add F, G and H at
G	Sodium hyaluronate	5,85	30°C
H	Perfume	0,10	
I	<i>Santolina chamaecyparissus</i> Extract	0,5-2%	Add the preservative system at 30°C

In the experiments, Formula 1 comprised 4% of glycerin and Formula 2 comprised 10% of glycerin.

- 5 Challenge tests were systematically performed:
- on formulations 1 and 2 comprising either Ingredients 1, 2 or 3. As Ingredients 1, 2 and 3 comprised 50% by weight of *Santolina chamaecyparissus* extract, these formulations comprised in fact 1% (for

- 0.5% *Santolina chamaecyparissus* extract) or 4% (for 2% *Santolina chamaecyparissus* extract) of Ingredient 1, 2 or 3, and
- 5 - on formulations 1 and 2 comprising 0.5% or 2% of ethylhexylglycerin alone (S1), of the mixture ethylhexylglycerin/caprylyl glycol alone (S2) or of caprylyl glycol alone (S3).

Antimicrobial activity

Antimicrobial activity in formulation 1

10 *Santolina chamaecyparissus* extract was first tested at 0,5 % and 2 % in formulation 1 with Ingredient 2 or 3. As ingredients 1 to 3 contained 50 % of plant extract, they were introduced at 1 and 4 % respectively.

The results are in Table 17.

Table 17 : Challenge test results with *Santolina chamaecyparissus* extract at 0,5 and 2% with different cosmetic supports. Comparison with formula 1 without any plant extract. Interpretation following the European Pharmacopoeia (Logarithmic reduction and interpretation)

Strains	<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>							
	D2	D7	D14	D28	D2	D7	D14	D28	D2	D7	D14	D28	D2	D7	D14	D28				
Criteria A	≥2	≥3	-	NI*	≥2	≥3	-	NI	≥2	≥3	-	NI	/	/	/	≥2	NI			
Criteria B	-	-	≥3	NI	-	-	≥3	NI	-	-	≥3	NI	/	/	/	≥1	NI			
Formula 1	1,3	>3	1,1	NCo	0,2	0,0	-0,2	NCo	0,5	0,7	0,0	NCo	/	/	0,0	NCo	/	-0,1	NCo	
Interpretation	B	B	NC	NCo	B	B	NC	NCo	B	B	NC	NCo	NC	NC	NC	NCo	NC	NCo	NC	NCo
Formula 1+S2 (2%)	>3	>3	/	>3	>3	>3	/	>3	>3	>3	/	>3	/	/	>3	>3	/	/	0,1	0,1
Interpretation	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	NC	NC
Formula 1+ingredient 2 (4%)	>3	>3	/	>3	>3	>3	/	>3	>3	>3	/	>3	/	/	>3	>3	/	/	0,9	2,0
Interpretation	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A
Formula 1+S3 (2%)	>3	>3	/	>3	>3	>3	/	>3	>3	>3	/	>3	/	/	>3	>3	/	/	0,4	0,9
Interpretation	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	NC	NC
Formula 1+ingredient 3 (4%)	>3	>3	/	>3	>3	>3	/	>3	>3	>3	/	>3	/	/	>	>	/	/	2,5	>3
Interpretation	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Formula 1+S2 (0,5%)	>3	>3	/	NCo	0,3	0,7	2,6	NCo	>3	>3	/	NCo	/	/	1,1	NCo	/	/	0,1	NCo

Interpretation	A	A	A	NCo	B	B	NC	NCo	A	A	NCo	B	NCo	NC	NCo
Formula 1+ingredient2 (1%)	>3	>3	/	NCo	0,5	>3	>3	NCo	>3	/	NCo	/	>3	NCo	/
Interpretation	A	A	A	NCo	B	A	A	NCo	A	A	NCo	A	NCo	NC	NCo
Formula 1+S3 (0,5 %)	>3	>3	/	NCo	0,5	>3	>3	NCo	>3	/	NCo	/	>3	NCo	/
Interpretation	A	A	A	NCo	B	A	A	NCo	A	A	NCo	A	NCo	NC	NCo
Formula 1+ingredient3 (1%)	>3	>3	/	NCo	1,1	>3	>3	NCo	>3	/	NCo	/	>3	NCo	/
Interpretation	A	A	A	NCo	B	A	A	NCo	A	A	NCo	A	NCo	NC	NCo
Formula 2	0,9	>3	>3	NCo	1,1	2,0	>3	NCo	0,9	0,9	1,1	NCo	/	0,2	NCo
Interpretation	B	A	A	NCo	B	B	A	NCo	B	B	NC	NCo	NC	NC	NCo
Formula 2+ingredient 1 (2%)	>3	>3	/	>3	>3	>3	>3	>3	>3	/	>3	/	>3	>3	/
Interpretation	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B

/ : No minimal reduction required, NI : No Increase, NC : not compliant ; NCo: Test not continued

The results show that 0,5 % of *Santolina chamaecyparissus* extract was sufficient to be in accordance with criteria A of European pharmacopeia against *P. aeruginosa*, *E. coli* and *C. albicans* and in accordance with criteria B against *S. aureus*.

5 At 2% of crude extract in Ingredient 2 (= 4 % of ingredient 2), challenge test on formula 1 was in accordance with criteria A against all bacteria and yeast, and with criteria B against mold. It was noted that after 28 days of incubation, formula 1 was in keeping with criteria A against all microorganisms. The antifungal activity against *A. brasiliensis* was only slower than expected in the method.

10 With 2 % of *Santolina chamaecyparissus* in ingredient 3 (= 4 % of ingredient 3), challenge test on formula 1 was in accordance with criteria A against all microorganisms.

Antimicrobial activity in formulation 2

15 Ingredient 1 was tested at 2 % in formulation 2 (= 1 % of crude extract). As shown in Table 17, 1 % of *Santolina chamaecyparissus* extract was sufficient to be in accordance with criteria A of European pharmacopeia against *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* and with criteria B against *A. brasiliensis*.

Example 6: Validation of the optimized extract for a high source of compound (I) into *Santolina chamaecyparissus* L.

Optimization of solvent extraction

25 As the inventors demonstrated that antimicrobial activity is in relation with active metabolite (compound of formula (I)) concentration, optimization of the extraction process was performed with modification of solvents, temperature of extraction and the time of extraction.

Ethanol/Water gradient

30 The initial solvent of extraction was a mix of ethanol/water 75:25 v:v. A different plant batch, more abundant in compound (I) was used, to which the extraction gradient ranging from 60% to 100% of ethanol was assessed, as described in Table

18. Two successive extraction steps were performed prior to extract concentration and analysis.

Table 18 : EtOH/Water solvent extraction gradient

Ethanol (%)	Water (%)	Active substance (formula (I)) concentration (mg/g)
100 (absolute EtOH)	0	74.5
100 (96° EtOH)	0	86.8
80	20	51.5
60	40	24.0

5

These crude extracts were then analyzed using UV-HPLC at 310 nm and the active metabolite was quantified following the method described in example 4. Higher concentration was found for EtOH/Water 99:1 v:v gradient. Higher active substance concentration was found for 80% and 98% of ethanol and decreased then for higher purity of ethanol.

10

=> Optimal gradient was thus confirmed between 75 and 98% v/v of ethanol.

Temperature of extraction

The second step involved an evaluation of the impact of different temperatures of extraction on extraction yield and compound (I) concentration. Only one extraction step was performed during the optimization of the temperature of extraction.

15

Table 19 : Active substance concentration vs the temperature of extraction

Temperature (°C)	Active substance (formula (I)) concentration (mg/g)
Ambient temperature	80.4
50°C	93.8
Under Reflux	77.4

As shown in Table 19, a higher concentration in the active substance (I) was reached at 50°C rather than when lower temperatures were used.

5 *Extraction time*

The plant extraction was performed at 50°C, as previously optimized.

Extraction time	Active substance (I) concentration (mg/g)
30 min	14.5
1h30	53.4
3h	93.8
4h	73.7

Table 20 : Active substance concentration in function of the extraction time

10 As mentioned in Table 20, only 3 hours and no more are required to reach the highest concentration in active substance (I) contained within the said *Santolina chamaecyparissus* L. extract.

15 **Example 7 : Evaluation of the antimicrobial activity of the crude extract of example 6**

The optimized extract was then assessed for its antimicrobial activity and more particularly in order to determine the minimum bactericidal concentration for the following microbial strains: *Staphylococcus aureus* (gram-negative bacteria),
20 *Escherichia coli* (gram-negative bacteria), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-positive bacteria), *Aspergillus niger* (fungus) and *Candida albicans* (yeast).

Due to a higher active substance (I) content, it convinces to evaluate the impact on its antimicrobial activity.

25

Crude optimized extract	MBC (mg/mL)				
	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
S. chamaecyparissus	nd	10.1	5	1.2	20.3

nd : not determined

Table 21 : Minimum bactericidal concentration of microorganisms

Example 8 : Evaluation of the antimicrobial activity of the crude extract (of example 6) on *P. acnes*

5

The optimized extract was then assessed for its antimicrobial activity and more particularly in order to determine the minimum inhibitory concentration for *Propionibacterium acnes* (gram-positive bacteria). Methyl paraben and phenoxyethanol, as universal antimicrobial agents, were used as positive control.

10

Due to the a higher active substance (I) content, the impact on the antimicrobial activity and more particularly on an anaerobic bacteria was evaluated.

Crude optimized extract	MIC (mg/mL)
	<i>P. acnes</i>
S. chamaecyparissus	1.27
Methyl paraben	2.53
Phenoxyethanol	10.13

Table 22 : Minimum inhibitory concentration of *P. acnes*

15

Surprisingly, the said extract is able to strongly inhibit the growth of this anaerobic bacteria acting only at 1.27 mg/mL.

Example 9 : Evaluation of the antimicrobial activity of the decolored and deodorised extract of example 6

20

In order to decrease its color and odor impact in a cosmetic formulation, the Santolina extract was (crude extract) deodorized and decolored using activated carbon. This step was performed at ambient temperature or at 50°C and the treatment

time lasted at least 30 min using from 1% w/w extract to 20% w/w extract of activated carbon. Preferably, 5-15% w/w extract of activated carbon was used. After this step, a decrease on the active substance (I) content was observed. The optimized extract was then assessed for its antimicrobial activity and more particularly in order to determine the minimum bactericidal concentration for the following microbial strains: *Staphylococcus aureus* (gram-negative bacteria), *Escherichia coli* (gram-negative bacteria), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-positive bacteria), *Aspergillus niger* (fungus) and *Candida albicans* (yeast). The following conditions of decoloration/deodorization were assessed with activated carbon:

10

Temperature	Dry extract	Charcoal w/w % extract
50°C	2%	5%
50°C	2%	10%
50°C	2%	15%
50°C	5%	5%
50°C	5%	10%
50°C	5%	15%
Reflux	2%	5%
Reflux	2%	10%
Reflux	2%	15%
Reflux	5%	5%
Reflux	5%	10%
Reflux	5%	15%

Table 23 : Various conditions for an efficient decoloration/deodorization step

As mentioned below in the Table 24, the decolorized/deodorized extract used is representative to the above conditions of decoloration/deodorization. Despite the decrease of the active substance (I) content, the level of active substance (I) remained sufficient to maintain a protection against large antimicrobial spectrum.

15

	Relative active substance concentration (mg/g)	MBC (mg/mL)				
		<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Crude extract	81.0	nd	10.1	5	1.2	20.3
Decolored/deodorized extract	67.0	nd	20.4	5.1	2.5	10.2

nd : not determined

Table 24 : Minimum bactericidal concentration of microorganisms

Example 10 : Evaluation of the antimicrobial activity on *P. acnes* of the decolored and deodorised extract of example 9

5

The optimized extract was then assessed for its antimicrobial activity and more particularly in order to determine the minimum inhibitory concentration for *Propionibacterium acnes* (gram-positive bacteria). Methyl paraben and phenoxyethanol, as universal antimicrobial agents, were used as positive control.

10

Due to the a higher active substance (I) content, it convinces to evaluate the impact on its antimicrobial activity and more particularly on an anaerobic bacteria.

15

As mentioned below in the Table 25, despite the decrease of the active substance (I) content, the level of active substance (I) remained sufficient to inhibit the microbial growth of *P. acnes*.

Crude optimized extract	MIC (mg/mL)
	<i>P. acnes</i>
Decolored/deodorized extract of <i>S. chamaecyparissus</i>	1.27 ± 0.03
Methyl paraben	2.53
Phenoxyethanol	10.13

Table 25 : Minimum inhibitory concentration of *P. acnes*

References

Cunliffe, W.J., Shuster, S., 1969. Pathogenesis of acne. *The Lancet* 293, 685-687.

5 Feldman, S., Careccia, R.E., Barham, K.L., Hancox, J., 2004. Diagnosis and treatment of acne. *American Family Physician* 69, 2123-2138.

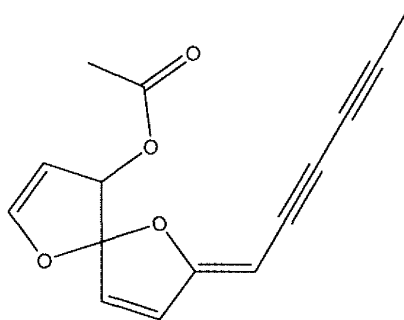
Gollnick, H., Cunliffe, W., Berson, D., Dreno, B., Finlay, A., Leyden, J.J., Shalita, A.R., Thiboutot, D., 2003. Management of acne: a report from a Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. *Journal of the American Academy of Dermatology* 49, S1-S37.

10

CLAIMS

1. Extract of *Santolina chamaecyparissus L.* obtained by extraction of the aerial parts with a solvent chosen from methanol, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, tetrahydrofuran, supercritical carbon dioxide and a mixture ethanol : water in a ratio of from 70:30 % v/v to 99:1 % v/v.
2. Extract of *Santolina chamaecyparissus L.* according to claim 1 further decolorized and/or deodorized
3. Process for preparing an extract of *Santolina chamaecyparissus L.* according to claim 1 or 2, comprising the following steps:
- a) mixing aerial parts of *Santolina chamaecyparissus L.* with a solvent chosen from methanol, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, tetrahydrofuran, supercritical carbon dioxide and a mixture ethanol : water in a ratio of from 70:30 % v/v to 99:1 % v/v,
 - b) macerating the mixture obtained in a) during at least 1h,
 - c) filtering the mixture obtained in b), so as to obtain the filtrate and the retentate, the filtrate being the crude extract.
4. Process according to claim 3 which comprises a further step c1) comprising decoloration and/or deodorization of the crude extract using activated carbon
5. Process according to claim 3 or 4, wherein the mixture ethanol : water of step a) has a ratio of 96:4 % v/v.
6. Process according to claim 3, 4 or 5 wherein the maceration of the mixture in step b) is at ambient temperature or at around 50°C
7. Process according to any one of claims 3 to 6, which comprises a further step d) comprising:
- d1) mixing the retentate of step c) with the same solvent as the one used in

- step a),
d2) macerating the mixture obtained in d1) during at least 1h,
d3) filtering the mixture obtained in d2), so as to obtain the filtrate and the
retentate, and
5 d4) mixing the filtrate of step c) with the filtrate of step d3), said final
mixture being the extract.
8. Process according to any one of claims 3 to 7, which comprises a further step
e) of evaporation of the solvent of the extract, such as vacuum-concentration.
- 10 9. Process according to claim 8, wherein step e) comprises:
e1) the addition of a cosmetic compound chosen from polyols, alkyl-
glucosides and alkyl polyglucosides and monoglycerides to the extract, and
e2) the evaporation of the solvent of the extract obtained in e1), such as
15 vacuum-concentration.
10. Process according to claim 9, wherein the cosmetic compound of step e1) is
chosen from ethylhexylglycerin, caprylyl glycol and their mixtures.
- 20 11. Extract of *Santolina chamaecyparissus L.* obtainable by the process according
to any one of claims 3 to 8.
12. Extract according to claim 1, 2 or 11, comprising the compound of formula
(I):

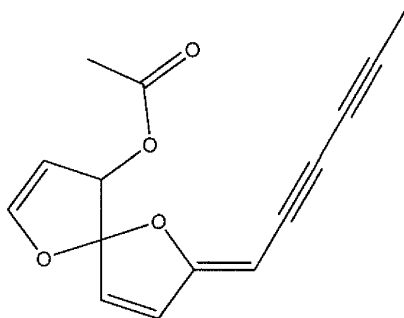


25

(I)

13. Extract according to claim 1, 2, 11 or 12, wherein it is not an essential oil.
14. Composition comprising, in a physiologically acceptable medium, an extract of *Santolina chamaecyparissus L.* according to claim 1, 2, 11, 12 or 13, or obtainable by the process according to any one of claims 3 to 8.
15. Use of an extract of *Santolina chamaecyparissus L.* according to claim 1, 2, 11, 12 or 13, or of a composition according to claim 14, as preservative, antioxidant, bactericide and/or fungicide.

16. Use of the compound of formula (I):

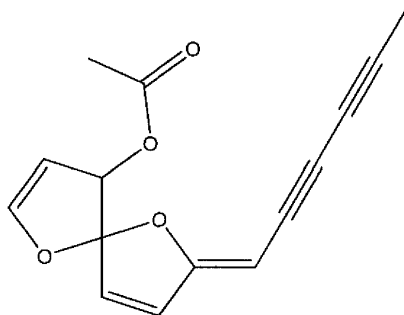


(I)

as preservative, antioxidant, bactericide and/or fungicide.

15

17. Use of a composition comprising the compound of formula (I):



(I)

as preservative, antioxidant, bactericide and/or fungicide.

18. Use of a composition according to claim 14 to prevent and/or treat the cutaneous disorders related to *Propionibacterium acnes*
- 5 19. Use of a composition according to claim 18 to prevent and/or treat wherein the cutaneous disorders related to *Propionibacterium acnes* is the acne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/055910

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A01N65/12 A61K36/28 A01P3/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GINER R M ET AL: "Inhibitory effects of santolina chamaecyparissus extracts against spasmogen agonists", JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 27, no. 1-2, 1 November 1989 (1989-11-01), pages 1-6, XP025499170, ISSN: 0378-8741, DOI: 10.1016/0378-8741(89)90071-8 [retrieved on 1989-11-01] the whole document ----- -/--	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 May 2015		Date of mailing of the international search report 26/05/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lorenzo Varela, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/055910

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Jorgen Lam ET AL: "Chemical constituents of Santolina chamaecyparissus", Department of Organic Chemistry, University of Aarhus, Denmark, 1 January 1989 (1989-01-01), pages 799-802, XP055124310, Denmark Retrieved from the Internet: URL:http://actachemscand.org/pdf/acta_vol_43_p0799-0802.pdf [retrieved on 2014-06-19] the whole document	1-19
X	J. L. RÍOS ET AL: "Isolation and identification of an antiinflammatory principle from santolina chamaecyparissus", PHYTOTHERAPY RESEARCH, vol. 3, no. 5, 1 January 1989 (1989-01-01), pages 212-214, XP055124313, ISSN: 0951-418X, DOI: 10.1002/ptr.2650030513 the whole document	1-19
X	ARACELI SALA ET AL: "Anti-phospholipase A2 and anti-inflammatory activity of Santolina chamaecyparissus", LIFE SCIENCES, vol. 66, no. 2, 1 December 1999 (1999-12-01), pages PL35-PL40, XP055124316, ISSN: 0024-3205, DOI: 10.1016/S0024-3205(99)00578-0 the whole document	1-19
X	JUNG CHOI ET AL: "A correlation between antioxidant activity and metabolite release during the blanching of Chrysanthemum coronarium L.", BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, vol. 75, no. 4, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 674-680, XP055124350, ISSN: 0916-8451 the whole document	1-19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/055910

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CLARA GROSSO ET AL: "Supercritical fluid extraction of the volatile oil from Santolina chamaecyparissus", JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE, vol. 32, no. 18, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 3215-3222, XP055124321, ISSN: 1615-9306, DOI: 10.1002/jssc.200900350 the whole document</p> <p align="center">-----</p>	1-19

Fom PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Comptes Rendus Chimie

www.sciencedirect.com



Full paper/Mémoire

Development of a natural ingredient – Natural preservative: A case study



Développement d'un ingrédient naturel: Étude de cas d'un conservateur naturel

Audrey Kerdudo^{a, b}, Pauline Burger^a, Florence Merck^a, Alexandre Dingas^b,
Yohan Rolland^c, Thomas Michel^a, Xavier Fernandez^{a, *}

^a Institut de chimie de Nice, UMR CNRS 7272, Université de Nice–Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2, France

^b SO.F.I.A. Cosmétiques, 1^{re} avenue, 1^{re} rue, 06514 Carros, France

^c Naturex, 250, rue Pierre-Bayle, BP 81218, 84911 Avignon cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2015

Accepted 20 June 2016

Available online 25 July 2016

Keywords:

Santolina chamaecyparissus

Natural ingredient

Spirokétalenol

Preservative

Cosmetic

Antimicrobial activity

Mots clés:

Santolina chamaecyparissus

Ingrédient naturel

Spirokétalenol

Conservateur

Cosmétique

Activité antimicrobienne

ABSTRACT

Lately, the cosmetic and personal care market has been more and more driven toward natural ingredients by the rising consumers' awareness about personal health and safety and their will for safer cosmetics free of harmful chemicals. Preservatives are no exception to the rule: evidence or suspicion of the toxicity of certain synthetic preservatives that have been around for decades pushed the cosmetic industry forward to seek for natural alternatives, as the selection of natural preservatives already available is quite limited. Sourcing active metabolites and developing new natural ingredients are long-term procedures that are thoroughly described in the present paper, via the example of the design of a natural preservative based on the *Santolina chamaecyparissus* extract, and of the assessments of its preservative effectiveness.

© 2016 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

RÉSUMÉ

Récemment, sous la pression grandissante de consommateurs toujours plus avertis en matière de santé publique, le marché de la cosmétique s'est tourné vers les ingrédients naturels afin de formuler des produits cosmétiques plus sûrs et dénués autant que faire se peut de produits chimiques dangereux. Les conservateurs ne constituent pas une exception : les suspicions et preuves de toxicité de certains conservateurs de synthèse, pourtant utilisés depuis des décennies, ont impulsé la recherche en matière de solutions alternatives naturelles, étant donné qu'à l'heure actuelle le choix en matière de conservateurs naturels est encore restreint. Le *sourcing* de métabolites secondaires et le développement de nouveaux ingrédients naturels, procédures de longue haleine, sont décrits dans cet article, à travers l'exemple du développement d'un conservateur naturel à base d'extrait de *Santolina chamaecyparissus* et de l'évaluation de ses propriétés conservatrices.

© 2016 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail addresses: audreykerdudo@gmail.com (A. Kerdudo), Pauline.BURGER@unice.fr (P. Burger), florence.merck@live.fr (F. Merck), adingas@sofiacosmetique.fr (A. Dingas), y.rolland@naturex.com (Y. Rolland), Thomas.MICHEL@unice.fr (T. Michel), Xavier.FERNANDEZ@unice.fr (X. Fernandez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2016.06.004>

1631-0748/© 2016 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

The worldwide cosmetic industry has largely developed over the past decade (worth expected to reach \$390 billion by 2020; [1]) and its solid growth continues to be driven essentially by consumers expecting increasingly innovative products, as well as efficacy and quality. However, rising awareness about personal health and safety also led the consumers to look forward to safer cosmetics free of harmful chemicals. Hence, the dramatically increasing global trade in natural ingredients sourced from vegetable, mineral or marine renewable sources has perfectly illustrated this important trend in the last years. The predominance of such natural ingredients is largely due to the various roles they can play in a single cosmetic formula, acting as active ingredients (e.g., moisturizers), excipients (e.g., surfactants), additives (e.g., preservatives), etc., the last ones being particularly sought for by cosmetic manufacturers.

Microbial growth could occur in cosmetics and personal care products under usual manufacturing and usage conditions and numerous sources of contamination have been identified: the raw materials, the packaging, or even the manufacturing processes and environments that are often not sufficiently sterile. These products can also be exposed to temperature variations, and be notably subject to temperatures higher than recommended in shops and consumers' bathrooms, hence increasing the micro-organism growth rate. Furthermore, once the cosmetic or personal care product is opened, and until it is discarded, it is highly susceptible to further contamination due to consumer use (constant dipping of non-sterile fingers in the product, contact with non-sterile bodies, etc.). Micro-organisms can hence easily multiply and cause unpleasant discolouration and odour, and can degrade active compounds in products, leading to the instability of finished products [2,3]. Cosmetics and personal care products are hence expected to resist microbial attack within their intended period of use [4]: preservatives are then necessary to prevent product spoilage and subsequently consumers' infections caused by harmful micro-organisms. Strict rules govern the inclusion of preservatives in cosmetics. Throughout Europe, manufacturers must carefully choose among preservatives listed in Annex V of Regulation (EC) [4] that have previously been subjected to scientific tests and approval procedures: every cosmetic formulation requires a tailor-made preservative system to meet its specific needs (selection of the appropriate nature and dosage of a specific preservative) [5].

Synthetic preservatives employed over decades such as *p*-hydroxybenzoic acid, phenoxyethanol and imidazolidinyl urea [3], display a whole lot of benefits including notably their more than affordable price, their broad-spectrum of activity against bacteria and fungi, their compatibility with other ingredients, and the fact that they generally do not interfere with fragrance, colour, or other aspects of a given formulation. However, although common synthetic preservatives do extend the lifespan of the products and help to keep them free from micro-organisms, many of them have developed negative

reputations in consumers' minds and their use has become more and more controversial over the last years. In fact, often petroleum-based, they can be unhealthy and can notably promote irritations or infections, particularly on damaged skin, or the sensitive areas around the eyes [6]. Some of them can even cause higher health issues: 4-hydroxybenzoic acid esters, better known as parabens have been the most widely used preservatives (entering the composition of about 80% of the worldwide cosmetics; [7]), but have recently been reported to mimic oestrogen, to increase female breast cancer incidence and to influence the development of malignant melanoma [8]. Following the controversies about parabens and phenoxyethanol, cosmetic formulators are under increased pressure to turn more and more to innovative natural ingredients [7], because they are not only healthier alternatives for consumers but they also provide a wonderful marketing angle. In fact, the discovery and usage of a natural ingredient with preservative properties offers cosmetic industries the chance to communicate about the "preservative free" aspect of their products, as these new natural ingredients do not fall under the legislation and are hence not listed among preservatives in Annex V of Regulation (EC) [4]. Furthermore, if such a natural ingredient, besides its preservative action, also displays another interesting property, e.g., anti-oxidizing effect, the marketing communication opportunities will become even larger. Finally, rising consumer demand for products formulated with natural raw materials also offers cosmetic companies a chance to raise the awareness of consumers to biodiversity that becomes a strategic issue as a rich source for innovative molecules. Sourcing new natural ingredients engage cosmetic industries in a 'green economy' policy presided over by the respect of the principles of the Nagoya Protocol introduced on 29 October 2010, and issued from a number of implements of the original Convention on Biological Diversity (CBD) ratified in 1992 by 168 States at the United Nations' Earth Summit held in Rio de Janeiro [9]. The CBD constituted the first international document to recognize the urgent need to protect biodiversity, the sustainable use of its resources, and the equal and rightful sharing of the benefits it represents. Application of high throughput screening technologies to natural product samples accelerates the discovery, development and use of natural ingredients but such a screening is still a long-term undertaking as only five in every 100 genetic resources identified as being potentially of interest will ever end up in cosmetic and personal care formulae as they also have to pass all the efficacy, quality and safety tests right throughout the development chain [10].

Regions presenting high biodiversity and a high percentage of endemic flora and fauna that are especially endangered are recognized as biodiversity hotspots [11,12] and constitute protection priorities. With the generalized awareness of this richness threatened with extinction it appeared worth preserving this biodiversity and valuing plant species in the form of new ingredients intended notably for cosmetic and pharmaceutical industries. The Mediterranean region was identified as one of these biodiversity hotspots [12] due to its remarkable flora and specially its high rate of endemic species:

representing only 2% of the world's surface, this area houses 20% of the world's total floristic richness [13,14]. This Mediterranean biome hence constitutes a choice target to source natural products intended both for cosmetics and drug design.

Considering this, 50 Mediterranean plants were initially selected from over 2000 for the present study, based on a literature survey and on the basis of their traditional use: 17 of them were accessible for further evaluation of their potential use as preservatives in cosmetics. A screening of their antimicrobial activities was engaged and the optimization of the most interesting crude extract was then investigated for practical cosmetic formulation.

2. Results and discussion

2.1. Antimicrobial activity screening

A screening of the antimicrobial activities of 17 of the 50 plants initially selected was undertaken to pinpoint plants presenting potential as cosmetic preservatives. For this, solvent crude extracts were prepared at respectively 2% (massic concentration in the raw extract; results displayed in Table 1) and 0.2% (data non shown): EtOH/H₂O 75:25 (v/v) extracts were preferentially tested because such a solvent system is non-toxic and enables the extraction of a broad range of metabolites. Their antimicrobial activity was

evaluated in compliance with the regulation against the yeast *Candida albicans*, the filamentous fungus *Aspergillus niger* and the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, using 96-well microplate assays based on microbial growth inhibition assessed after respectively 24 and 48 h for yeast and fungus, and 48 and 72 h for bacteria. Tests were performed on several extracts from plants collected at different seasons over a 2–3 years period, and the results shown in Table 1 represent the mean activity of each extract.

As shown in Table 1, almost all of the tested extracts display good to excellent *S. aureus* growth inhibition activities. On the contrary, only the *Pistacia lentiscus* extract (EtOH/H₂O 70:30 v/v) seems to present a good activity against the growth of *P. aeruginosa* after 48 h.

Interesting activities against the three remaining microorganisms have been observed for the *Laurus nobilis* L. and *Hypericum perforatum* L. extracts (EtOH/H₂O 75:25 v/v). The prominent antibacterial activity of the ethanolic extract of *L. nobilis* L. fresh leaves and twigs was already assessed [15]. Similarly, the effective antibacterial activity of the methanolic extract of *L. nobilis* L. seed oil was observed by Ozcan et al. [16] and one of the supercritical fluid extracts of *L. nobilis* L. leaves was observed by Santoyo et al. [17]. In a similar way, the antibacterial activity of various extracts of *H. perforatum* L. has already been assessed [18–20].

Table 1
Antimicrobial activity screening of Mediterranean plant extracts.

Plant name	Plant part	Localization	Extraction solvent	Antimicrobial activity at 2%							
				<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>A. niger</i>		<i>C. albicans</i>	
				48 h	72 h	24 h	48 h	48 h	72 h	24 h	48 h
<i>Cistus albidus</i> L.	Twigs	1	70% EtOH	–	~	+++	++	+++	~	++	~
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Twigs	1	70% EtOH	++	~	++	++	~	–	–	–
<i>Salvia verbenaca</i> L.	Aerial parts	1	70% EtOH	–	–	++	–	+	–	–	–
<i>Ruta chalepensis</i> L.	Aerial parts	1	75% EtOH	–	–	+++	+++	++	+	~	~
<i>Coronilla emerus</i> L.	Flowered aerial parts	2	75% EtOH	–	–	++	–	++	+	–	–
<i>Laurus nobilis</i> L.	Twigs	1	75% EtOH	–	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Flowered branches	4	75% EtOH	–	–	+++	+++	~	~	–	–
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Flowered aerial parts	5	75% EtOH	–	–	+++	+++	+++	~	–	+
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	Flowered aerial parts	2	75% EtOH	–	–	+++	+++	+++	+++	+++	~
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	Twigs	5	75% EtOH	~	+	+++	+++	+++	~	+	~
<i>Juniperus communis</i> L.	Branches bearing fruits	5	75% EtOH	–	–	+++	+++	+	–	–	–
<i>Myrtus communis</i> L.	Flowered aerial parts	n.c.	75% EtOH	–	–	++	+++	++	–	+	~
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Flowered aerial parts	n.c.	75% EtOH	–	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Twigs	n.c.	75% EtOH	–	–	+++	+++	–	–	–	–
<i>Athalia petiolata</i> (M. Bieb.) Cavara & Grande	Aerial parts	6	75% EtOH	–	–	+++	+++	–	–	–	–
<i>Helichrysum stoechas</i> L.	Aerial parts	7	75% EtOH	–	–	+++	+++	~	–	–	–
<i>Satureja montana</i> L.	Flowered aerial parts	8	75% EtOH	–	–	–	–	–	–	–	–
Positive standard (methylparaben tested at 0.4%)	/	/	/	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ysaline – red algae extract (100 mg/ml)	/	/	EtOH/H ₂ O 60/40	–	–	–	–	–	–	–	–
Totarol – <i>Podocarpus totarol</i> extract (100 mg/ml)	/	/	EtOH/H ₂ O 60/40	++	++	+++	+++	++	++	–	–

Localization codes: one Departmental park Estienne d'Orves (Alpes-Maritimes), two Cabris (Alpes-Maritimes), three Roussillon (Tinée valley, Vaucluse), four St Jeannet (Alpes-Maritimes), five Rimplas (Alpes-Maritimes), six Brénon (Var), seven Var bed (at the confluence with the Vésubie, Alpes-Maritimes), eight Isola 2000 (Alpes-Maritimes), n.c.: not communicated.

Light grey: commercial natural extracts with preservative properties.

(+++): 90% < inhibition < 100%; (++) : 70% < inhibition < 90%; (+) : 60% < inhibition < 70%; (–) : 40% < inhibition < 60%; (–) : inhibition < 40%.

Bold row corresponds to the selected active extract.

The EtOH/H₂O 75:25 (v/v) crude extract of the flowered aerial parts of *Santolina chamaecyparissus* display the best unprecedented results against these micro-organisms (inhibition superior to 90% of the growth of *C. albicans*, *A. niger* and *S. aureus*), except for *P. aeruginosa*.

S. chamaecyparissus L., commonly known as cotton lavender, is a species of flowering plant belonging to the Asteraceae family. It is native to Southeastern (Croatia and Italy) and Southwestern Europe (France and Spain) and is mainly used as an ornamental plant [21].

This extract was analysed by using a High Performance Liquid Chromatography-Diode array Detector-Evaporative Light Scattering Detector (HPLC-DAD-ELSD; Fig. 1): besides polar (e.g., sugars and amino acids) and some hydrophobic compounds, this extract is mainly constituted by flavonoids and spiroketal derivatives, among which a major unknown compound eluting after 26 min is detected. This extract was then selected for further investigation and optimization for practical cosmetic formulation.

2.2. Bioguided fractionation of the *S. chamaecyparissus* extract

In order to identify the active compounds, the EtOH/H₂O 75:25 (v/v) extract of *S. chamaecyparissus* was then fractionated over silica gel (normal phase). The fractionation of 2.2 g of the bulk extract led to the recovery of five distinct fractions: F1 (cyclohexane; 8 mg), F2 (cyclohexane/AcOEt 1/1; 249 mg), F3 (AcOEt; 88 mg), F4 (EtOAc/MeOH 1/1; 781 mg) and F5 (MeOH; 412 mg).

The resulting fractions were further evaluated for their antimicrobial activity. Fraction solutions were concentrated at 100 mg/mL in DMSO and their activities were assessed the same way as one of the crude extracts.

Table 2 shows the inhibition percentages of the five resulting fractions against four bacteria, yeast and fungi at a

concentration of 0.4% (w/v) (the results obtained for the extract at a concentration of 0.04% are not shown in the present article). Methyl-paraben at 0.4% (w/v) was used as the positive control.

No activity was observed for the cyclohexane (F1) and MeOH fractions (F5). The EtOAc/MeOH fraction (F4) was only active at 0.4% (w/v) against *A. niger* (inhibition percentage higher than 60%). The ethyl acetate fraction (F3) was significantly active at 0.4% (w/v) against *A. niger* and *C. albicans*, but no activity was observed against *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

Finally, the cyclohexane/AcOEt fraction (F2) was the most interesting one, exhibiting a strong antimicrobial activity against the four evaluated strains over 48 h (*C. albicans* and *S. aureus*) and over 72 h (*P. aeruginosa* and *A. niger*).

2.3. Isolation and identification of the active metabolite

HPLC-DAD-ELSD analysis of both the crude extracts of *S. chamaecyparissus* and the five resulting fractions showed the presence of a major metabolite in F2 (Fig. 2) that is absent in other fractions: this major metabolite was suspected to be responsible for the antimicrobial activity of *S. chamaecyparissus* crude extracts or at least a contributor to it.

Semi-preparative HPLC was then performed on this active fraction in order to confirm this assumption: multiple injections of this fraction concentrated at 50 mg/mL were carried out and 9 mg of the molecule were obtained.

Its molecular formula C₁₅H₁₂O₄ was deduced from UPLC-ESI-HRMS experiments ([M+H]⁺ m/z 257.0816, C₁₅H₁₃O₄). The UV spectrum showed the band of maximum absorption centred at 310 nm.

¹H and ¹³C NMR, associated with COSY, HSQC and HMBC experiments revealed the presence of an acetoxy group, as suggested by the signal at δ_H 2.1 (3H,s, H-15),

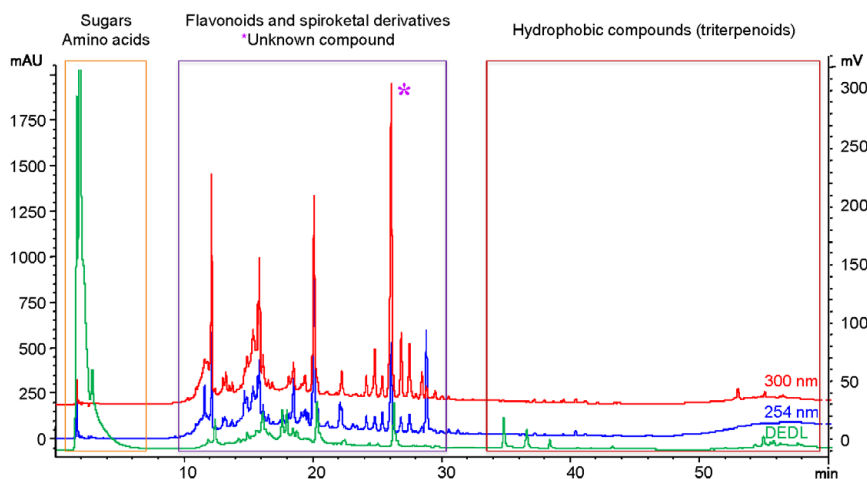


Fig. 1. HPLC-DAD-ELSD profile of the crude extract of *S. chamaecyparissus* showing the major families of metabolites identified.

Table 2
Antimicrobial activities of the *S. chamaecyparissus* crude extract and of the resulting F1–F5 fractions compared to those of a commercial preservative.

Sample	Strains	Growth inhibition at 0.4%			Average inhibition
		24 h	48 h	72 h	
Crude extract of <i>S. chamaecyparissus</i>	<i>A. niger</i>		102	101	+++
	<i>C. albicans</i>	100	100		+++
	<i>P. aeruginosa</i>		1	–	–
	<i>S. aureus</i>	97	98		+++
	<i>A. niger</i>		–	–	–
F1	<i>C. albicans</i>	–	–	–	–
	<i>P. aeruginosa</i>	–	–	–	–
	<i>S. aureus</i>	–	–	–	–
	<i>A. niger</i>		100	100	+++
	<i>C. albicans</i>	99	98		+++
F2	<i>P. aeruginosa</i>		94	90	+++
	<i>S. aureus</i>	105	113		+++
	<i>A. niger</i>		90	103	+++
	<i>C. albicans</i>	96	44	–	~
	<i>P. aeruginosa</i>		6	–	–
F3	<i>S. aureus</i>	–	15	–	–
	<i>A. niger</i>		68	7	~
	<i>C. albicans</i>	17	13	–	–
	<i>P. aeruginosa</i>		13	8	–
	<i>S. aureus</i>	36	56	–	~
F4	<i>A. niger</i>		0	4	–
	<i>C. albicans</i>	–	–	–	–
	<i>P. aeruginosa</i>		–	21	~
	<i>S. aureus</i>	32	30		~
	<i>A. niger</i>		100	100	+++
Methylparaben	<i>C. albicans</i>	99	100		+++
	<i>P. aeruginosa</i>		75	81	++
	<i>S. aureus</i>	80	93		++

(+++): average inhibition > 90%; (++): 70% < average inhibition < 90%; (+): 60% < average inhibition < 70%; (–): 20% < average inhibition < 60%; (–): average inhibition < 20%.

and at δ_C 20.5 (C-15) and 170.5 (C-14). Then δ_H and δ_C signals suggested the presence of a polyacetylene chain (C₂–C₃–C₄–C₅) while the four quaternary carbons present a δ_C from 64.8 to 80.5; the interpretation is further confirmed using HMBC. Complete correlations are presented in Table 3. The structural analyses enabled the identification of (5S,7Z)-7-(hexa-2,4-dien-1-ylidene)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dien-4-yl acetate, from the polyacetylene family, already found in *Santolina* species (Fig. 3) [22–25]: commonly named spiroketalenol, it is referred to as SKE in the present article. No mention of any kind of the assessed antimicrobial activity was reported for this substance in the literature.

2.4. SKE antimicrobial activity

Pure SKE appeared to be unstable once isolated, particularly in aqueous and acidic conditions. Since antimicrobial assays are performed in water, its antimicrobial activity could not be directly evaluated as for crude plant extracts or fractions. Thus there was a need to develop a methodology to establish a relationship between the biological activity of crude extracts and their SKE content.

Such a quantitation of SKE was performed by HPLC-UV at 310 nm (SKE absorption maximum): a calibration curve was constructed using (*E*)-cinnamic acid as a standard and the active substance concentration was expressed as mg equivalent of (*E*)-cinnamic acid per gram of the crude extract.

Once the SKE concentrations in various extracts were determined, the corresponding antimicrobial activities were assessed. As shown in Table 4, a relationship between the SKE concentration and the antimicrobial activity, especially against *A. niger* and *C. albicans* can be evidenced: no activity against these two strains was detected when no SKE was quantified in the extract. On the contrary, as the SKE concentration increases, antimicrobial activity is observed and appears to be maximal when the SKE concentration is higher than 9.1 mg equiv/g of the extract.

However, the activity against *S. aureus* seems to be independent of the SKE presence: in fact, almost all the extracts containing SKE or not were active against this strain.

Finally, it was highly difficult to conclude about the activity against *P. aeruginosa* as only one extract containing SKE at 17.6 mg equiv/g was active against this last strain.

2.5. Stability assessment

The instability of isolated SKE has already been stated; it appeared crucial to test its stability in the *S. chamaecyparissus* extract incorporated into a cosmetic formulation before any further ingredient development.

Creams formulated with 0.5 (data not shown) and 2% of the *S. chamaecyparissus* extract together with various cosmetic supports were then subjected to stability tests: these cosmetic products were kept either at room temperature or at 42 °C for 13 weeks. The evolution of the SKE concentration in these finished products was followed by

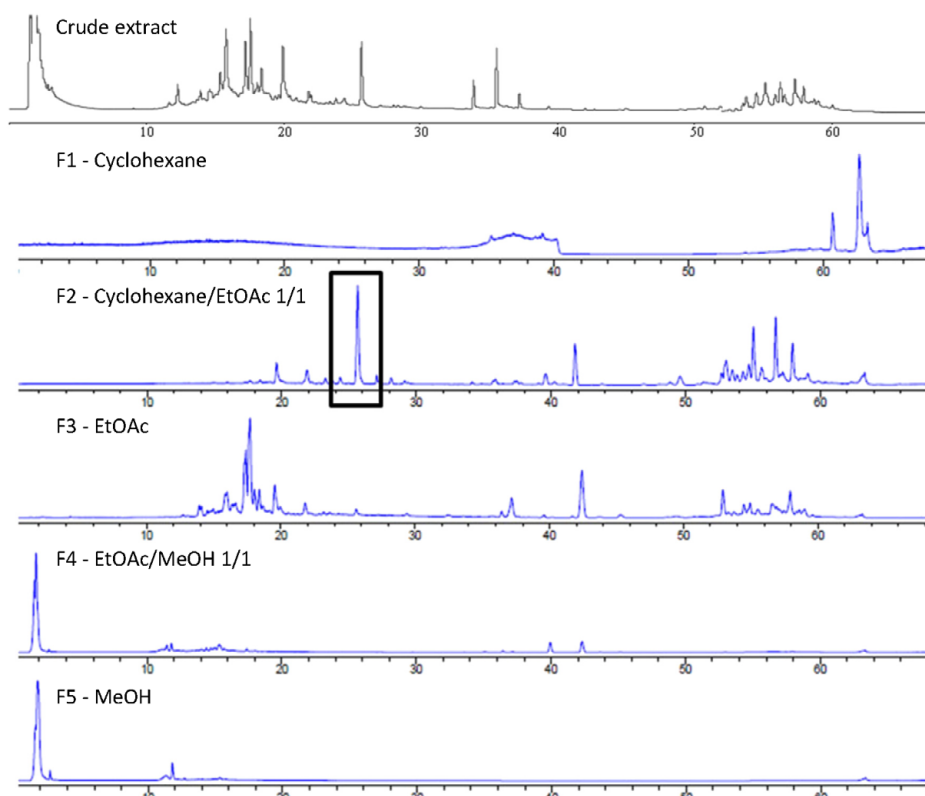


Fig. 2. HPLC-ELSD profiles of the crude extract of *S. chamaecyparissus* and the resulting F1–F5 fractions.

HPTLC, using an appropriate mobile phase to properly separate SKE from the other ingredients (retention factor $R_f = 0.42$).

A stability test was performed over 6 weeks at room temperature; then one week later (day 49), the formulated creams were either stored at room temperature or at 42 °C.

Table 3
 ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts and multiplicity.

C	δ_c (ppm)	C	δ_H (ppm)	Multiplicity
1	4.8	CH ₃	2.0	s
2	80.5	C _q	–	–
3	64.8	C _q	–	–
4	77.7	C _q	–	–
5	70.3	C _q	–	–
6	83.1	CH	5.1	br s
7	168.9	C _q	–	–
8	133.8	CH	6.3	dd ($J = 5.7$; $J = 1.6$ Hz)
9	126.1	CH	6.8	d ($J = 5.7$ Hz)
10	117.3	C _q	–	–
11	148.6	CH	6.6	d ($J = 3.0$ Hz)
12	100.8	CH	5.2	dd ($J = 2.5$ Hz; $J = 3.0$ Hz)
13	75.2	CH	5.7	d ($J = 2.5$ Hz)
14	170.5	C _q	–	–
15	20.5	CH ₃	2.1	s

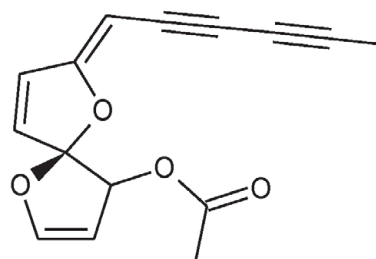
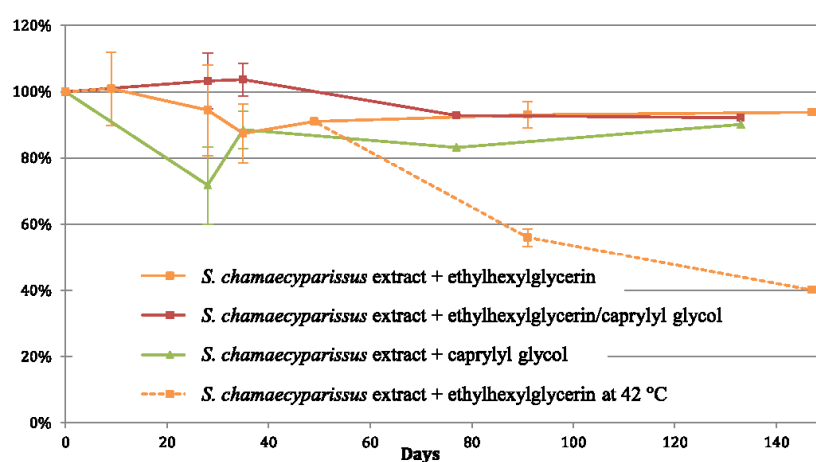


Fig. 3. Spiroketalenol structure (thick bonds correspond to COSY correlations).

As shown in Fig. 4, the SKE concentration remained stable at room temperature with the three cosmetic supports tested. However, SKE degradation was observed in a cream placed at 42 °C after 7 weeks at room temperature (only 40% of SKE was measured in the cream after 20 weeks): one can suggest that SKE, stable at room temperature, is heat sensitive, but further investigations should confirm this observation and appropriate storage conditions could be defined.

Table 4SKE concentrations (mg equiv. cinnamic acid/g of extract) and antimicrobial activities of *S. chamaecyparissus* crude extracts as functions of harvesting place and period.

Crude extracts		SKE concentration (mg equiv/g of extract)	Antimicrobial activity			
Harvesting place	Harvesting period		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>
HP1	06/2010	7.9	–	+	+	–
HP1	02/2011	1.1	–	+	+	+
HP1	03/2011	0.4	–	+	–	+
HP1	06/2011	0.2	–	+	–	–
HP2	06/2011	1.4	–	+	–	+
HP2	02/2012	9.1	–	+	+	+
HP2	09/2012	17.6	+	+	+	+
HP2	03/2013	9.3	–	+	+	+
HP3	04/2011	0.3	–	–	~	–
HP4	06/2011	0.0	–	+	–	–
HP4	07/2011	0.0	–	+	–	–
HP5	12/2012	5.8	–	+	+	–

**Fig. 4.** Evolution of the SKE content in creams formulated with 2% of the *S. chamaecyparissus* extract and subjected to stability tests.

Furthermore, it would be necessary to push these stability tests forward once the definite formulation has been determined: tests at room temperature and at 42 °C should be supplemented with tests in an ageing chamber where the effect of temperature variations mimicking the ones a finished product is subjected to, from formulation to consumer's use, could be monitored.

2.6. Natural ingredient design

Once the stability of the active molecule has been established in cosmetic formulae, the corresponding natural cosmetic ingredient can be developed.

The necessary requirements for such a development are quite numerous, as evidenced in Fig. 5: natural substances that show antimicrobial activity are usually not directly incorporable into a formulation as they may display undesirable qualities.

First, there is a necessity to respect the integrity of the active molecule during the extraction process, and hence

to optimize this extraction process via the development of an appropriate non-toxic extraction solvent system or via the use of modern extraction techniques such as microwave assisted extraction, ultrasonic assisted extraction or supercritical fluid extraction. Secondly, some substances may display offensive odours and/or colours that would be unacceptable in skin care products [7] and therefore need to be subjected to further processing, including notably a discolouration procedure. Finally, the addition of a cosmetic support, either liquid or solid, may be necessary to facilitate its incorporation into a cosmetic formulation.

As the antimicrobial activities appeared to be correlated with extract's SKE concentration, optimization of the extraction process was in the first place performed via the modification of the solvent system used. Several extraction replicas were performed using each solvent system tested to testify individual repeatability: the extraction repeatability was good as the mean standard deviation per solvent system never exceeded 10%.

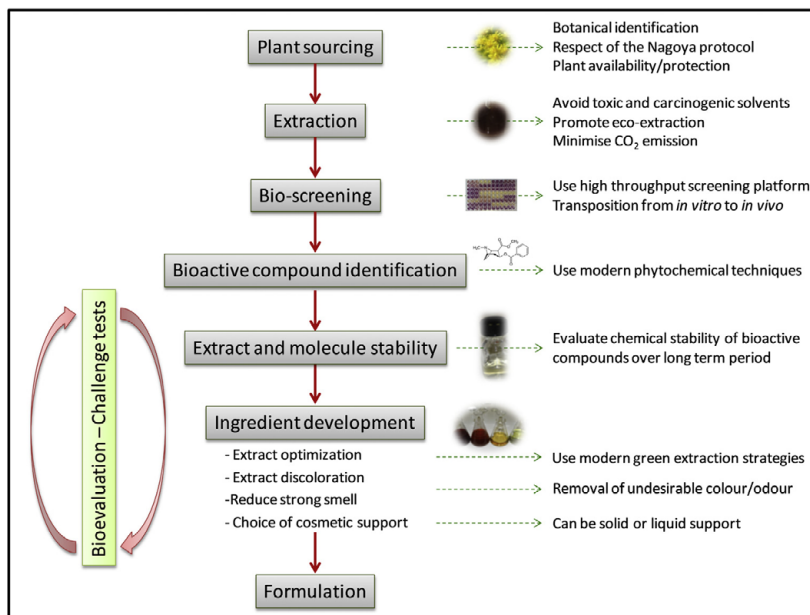


Fig. 5. Strategy adopted to develop a natural cosmetic ingredient, from plant sourcing to formulation.

A comparison of EtOH/H₂O gradients was initially performed, testing gradients ranging from 100% EtOH to 100% H₂O. As shown in Table 5, the highest SKE concentration (19.9 mg equiv/g) was obtained using EtOH/H₂O 80:20 (v/v). The more the water ratio in the extracting solvent system increased, the weaker the SKE concentration was. Similarly, using absolute EtOH rather than EtOH 96% leads to a decrease in the SKE concentration. An optimal ratio was thus established containing between 60 and 96% EtOH (v/v).

Other solvents were also compared to the extract of the plant. Methanol appears to be the extraction solvent giving the highest concentration of metabolite (44.3 mg equiv/g). Dichloromethane, acetone and ethyl acetate were also good candidates for the extraction of *S. chamaecyparissus* (40.8, 31.0 and 20.3 mg equiv/g, respectively). All these four solvents gave higher active concentration than ethanol/water 80:20. Methanol was subsequently selected for the following optimization of the extraction process to produce a cosmetic ingredient based on the *S. chamaecyparissus* extract [26]. However, caution should be taken as methanol as well as dichloromethane is CMR (carcinogenic/mutagenic/reprotoxic) solvent, and its use in the extraction of the cosmetic ingredient is highly contraindicated and shall be progressively banned: any residual trace of extraction solvent in the finished product is scrutinized [27–29].

The antimicrobial activity of the methanolic extract was tested (see Table 6): a significant activity was observed against *S. aureus*, *A. niger* and *C. albicans*, whereas only a moderate activity was noted against *P. aeruginosa* and no activity at all was observed against *Escherichia coli* at 0.4%.

As already stated, the presence of pigments (e.g., chlorophylls, anthocyanins, etc.) in solvent crude extracts dedicated to the development of cosmetic ingredients is unacceptable. Discolouration of such extracts can be performed using either activated carbon or molecular distillation. Both techniques were tested in the second phase of the optimization of a natural cosmetic ingredient based on the *S. chamaecyparissus* extract obtained using EtOH/H₂O 80/20 (v/v).

Molecular distillation of cosmetic raw materials enables removing undesirable odours, colour and some of the

Table 5
SKE concentrations (mg equiv cinnamic acid/g of extract) as a function of extraction solvent system.

Extraction solvent	SKE concentration (mg equiv/g)
Absolute EtOH	8.5
EtOH 96%	15.0
EtOH/H ₂ O 80:20	19.9
EtOH/H ₂ O 60:40	2.9
EtOH/H ₂ O 40:60	0.3
EtOH/H ₂ O 20:80	0.0
H ₂ O	0.0
MeOH	44.3
EtOAc	20.3
THF	12.0
Acetone	31.0
DCM	40.8
MethylTHF	16.4

Bold corresponds to the most active extracts. EtOH: Ethanol, H₂O: Water, MeOH: Methanol, DCM: Dichloromethane, EtOAc: Ethyl acetate, THF: Tetrahydrofuran.

Table 6
Antimicrobial activity of the MeOH extract of *S. chamaecyparissus*.

Crude extracts	Antimicrobial activity at 0.4%				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
MeOH extract	~	+	+	+	–

impurities that are present in the starting materials. This distillation is performed in an extreme vacuum environment at high temperature for a very short contact time. This technique was applied on *S. chamaecyparissus* crude extracts using liquid medium-chained triglyceridic support: the resulting liquid product presents a translucent yellow to orange colour, quite interesting for cosmetic formulation. Unfortunately, once tested for anti-microbial activity, it appeared that the resulting extract do not display any interesting microbicidal activity. Furthermore, to perform such a distillation process, it is necessary to use an almost non-volatile solvent, traces of which, unacceptable in cosmetics, are quite difficult to remove thereafter.

Discolouration by adsorption of the undesirable molecule on activated carbon is quite easy as the powdered activated carbon can easily be added to the liquid extract, and then removed by settling and filtration. Discolouration of *S. chamaecyparissus* crude extracts was performed with 10% of active carbon. The active compound content was then dosed in discoloured extracts and in almost all cases, enrichment in SKE was observed as presented in Table 7.

The next step of this optimization procedure consisted in the addition of an adequate cosmetic support. Maltodextrine, a solid cosmetic support, was tested but it appears that after solvent evaporation, the *S. chamaecyparissus* extracts on maltodextrin were thick and doughy, inducing the necessity for a tedious solubilization step for subsequent incorporation into cosmetic formulations. Furthermore, this support only leads to the “dilution” of extract's antimicrobial activity, as maltodextrin itself do not display any interesting microbicidal potential.

Polyols and monoglyceride esters, liquid cosmetic supports, were then judiciously selected for the development of such a cosmetic preservative based on the *S. chamaecyparissus* extract, as they present potentially interesting antimicrobial activity, which could improve the antimicrobial activity of the final ingredient [7,30–32]. The solubility of the *S. chamaecyparissus* extract was hence evaluated in the following cosmetic supports: ethylhexylglycerin (S1), a mixture of ethylhexylglycerin and

Table 7
SKE concentrations (mg equiv cinnamic acid/g of extract) in crude and discoloured extracts.

Crude extracts		SKE concentration (mg equiv/g)	
Harvesting place	Harvesting period	Crude extract	Discoloured extract
HP1	04/2012	1.5	20.4
HP1	05/2012	29.4	26.7
HP1	06/2012	18.8	35.8
HP1	12/2012	24.0	51.2
HP1	01/2013	3.2	6.4
HP2	10/2012	5.3	44.0

caprylyl glycol (S2), caprylyl glycol (S3), glyceryl caprate (S4), capryloyl glycine, glyceryl caprylate, glycerin, propylene glycol, butylene glycol and propanediol. The *S. chamaecyparissus* extract presented the highest solubilities in S1, S2, S3 and S4, and were only moderately soluble in the other raw materials tested. The first three were selected for further investigations and the resulting ingredients corresponding to the mixture of the crude extract of *S. chamaecyparissus* with either S1, S2 or S3 were subsequently named ingredient 1 to ingredient 3.

The antimicrobial activities of these three new ingredients were tested and compared to one of the crude extracts alone: results are presented in Table 8. Optimal activity (>90% of microbial inhibition) was observed for all ingredients against *A. niger*. The activity of ingredient 2 appears to be very good (>80% of inhibition) against *E. coli* and *C. albicans* and good (>60% of inhibition) against *S. aureus*, whereas it remained optimal with ingredients 1 and 3. Finally, ingredient 1 only displays a medium to poor activity against *P. aeruginosa*, whereas ingredient 2 presents a good one and ingredient 3, an optimal one against the latter strain.

So, all ingredients evaluated at this step of the study were highly active against the micro-organisms tested and were effectively more active than the crude extract alone: they were then selected for the next steps of the preservative development.

2.7. Cosmetic evaluation

The microbial safety of a cosmetic product constitutes a pre-requisite for its production and commercialization: the results of challenge tests are required to prove its microbiological stability [33].

To comply with this requirement, the three optimized ingredients were incorporated into various cosmetic formulations (O/W emulsions), one of which is described in Table 9. The features of the optimized cream were in accordance with those previously described by Kerdudo et al. 2015 [34].

Cosmetics containing antimicrobial extracts at concentrations ranging from 0.5 to 2.0% were exposed, as recommended by the FDA, to challenge tests to ensure the safety (e.g., the ability of the preservative system to protect the product from microbial growth) of both the ingredients alone and the finished cosmetic products prior to marketing and consumer use. As expected, the control cream, e.g.,

Table 8
Antimicrobial activities of the crude extract of *S. chamaecyparissus* and of ingredients 1, 2 and 3 (0.4% of extract).

Crude extracts	Antimicrobial activity at 0.4%				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
Crude extract	~	+++	+++	~	–
Ingredient 1	~	+++	+++	+++	++
Ingredient 2	++	+	+++	++	++
Ingredient 3	+++	+++	+++	+++	+++

(–): inhibition < 60%; (~): >60% but loss; (+): inhibition > 60%; (++): inhibition > 80%; (+++): inhibition > 90%.

Table 9
Cream (O/W) formulation.

Phases	Ingredients commercial name	INCI name	Supplier	Quantity (%)
A	/	Aqua		qsp 100
	Glycerin 99,5%	Glycerin	Interchimie	4.00
B	Carbopol EDT 2020	Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	Gattefosse	0.15
C	Brij 72	Polyoxyethylene(2) (and) stearyl ether	Croda France SAS	2.00
	Brij 721P	Steareth-21 (and) polyethoxylated alcohol	Quimica massa	2.50
	Lanette 18	Stearyl alcohol	Ami	1.50
	Cutina GMS-V	Glyceryl stearate	Ami	3.00
	Eutanol G	Octyldodecanol	Ami	3.00
	Sophiderm	Squalane	Sophim	2.50
	Arlamol HD	Isohexadecane	Quimica massa	3.00
	Virgin jojoba oil	<i>Simmondsia chinensis</i> (Jojoba) seed oil	Olvea	1.50
	Refined wheat germ oil	<i>Triticum vulgare</i> (wheat) germ oil	Olisud	1.50
	Refined shea butter	<i>Butyrospermum parkii</i> butter	Interchimie	2.00
	Silicone oil baysilone M350	Dimethicone	Interchimie	1.50
	Eusolex 9020	Butyl methoxydibenzoyl-methane	IES	1.00
	Uvinul MC 80	Ethylhexyl methoxycinnamate	IES	1.50
	Silicone oil SF1202	Dimethicone	Brenntag specialties	2.00
D	TEA 99%	Triethanolamine	Brenntag Côte d'Azur	0.11
E	–	Isononyl Isononanoate, Titanium Dioxide	–	1.25
F	D panthenol 50P	Panthenol (and) propylene glycol	Laserson	0.20
G	Vitamin E acetate	Tocopheryl	IES	0.50
H	–	Sodium hyaluronate	–	5.85
I	Crude extract of <i>S. chamaecyparissus</i>	–	–	0.00–2.00

without preservative of any sort, was not in accordance with the European Pharmacopoeia standards [35]. The three assays containing 2% of the respective ingredient produced interesting results. The cream containing ingredient 3 appears to be resistant enough to conform to criteria A of the European Pharmacopoeia against all microorganisms [26,35]. Furthermore, the cream containing ingredient 2 appears to be in compliance with criteria A of the European Pharmacopoeia against *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* and with the criteria B of the European Pharmacopoeia against *Aspergillus brasiliensis*. Finally, the finished product containing ingredient 1 was also of interest as it was active against all microorganisms (criteria A of the European Pharmacopoeia) except against *A. brasiliensis*.

These assays were stopped after 14 days of challenge tests.

3. Materials and methods

3.1. Materials

Water (Chromasolv® for HPLC, purity > 99.8%), acetonitrile (Chromasolv® for HPLC, purity > 99.9%), 2-propanol (Chromasolv® for HPLC, purity > 99.9%), formic acid (Puriss, purity > 98%), (*E*)-cinnamic acid, ethanol, methanol, acetone and dichloromethane were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Deuterated chloroform (CDCl₃) for NMR experiments was purchased from Euriso-top (Saint-Aubin, France). Glycerin (99.5%), butylene glycol and propylene glycol were purchased from Interchimie (Bobigny, France). Sensiva SC50 (ethylhexylglycerin stabilized with vitamin E) and Sensiva SC10 (caprylyl glycol and ethylhexylglycerin stabilized with vitamin E) were obtained from Schülke (Gentilly France). Microcare Emollient CLG (caprylyl glycol) was distributed by Coptis (Croissy-sur-Seine, France).

Dermosoft GMC (glyceryl caprate) and Dermosoft GMCY (glyceryl caprylate) were purchased from Dr. Straetmans (Hamburg, Germany). Zemea (propanediol) was obtained from Dupont Solvents.

3.2. Plant material

All the plants initially selected were collected in 2010 in the Provence-Alpes-Côte d'Azur region, in the Alpes-Maritimes, Var and Vaucluse departments.

Aerial parts of *S. chamaecyparissus* L. were collected from Cabris, Isola, Mouans-Sartoux in the Alpes-Maritimes department, and from Mont Caume and Mont Coudon in the Var department.

The plant material was botanically authenticated by J.-L. Polidori and F. Boillot, both botanists, and a specimen of *S. chamaecyparissus* L. collected from Mont Caume, Var, in April 2013 has been deposited at the Regional Botanical Conservatory of Nice (voucher n° C 3746).

3.3. Plant extraction

Aerial parts of *S. chamaecyparissus* L. were harvested, dried, ground into powder and extracted under mechanical stirring using organic solvents. Two consecutive 2 h-extractions were performed at 25 °C and the resulting extracts were filtered, gathered together and vacuum-concentrated.

When cosmetic support was added, solvent extraction was performed as previously: the raw cosmetic material was added before solvent extraction in proportion 1:1 (w/w).

3.4. Sample preparation

Crude extracts and fractions were diluted at 20 mg/mL in methanol (MeOH) and filtrated over 0.45 µm PTFE syringe filter before HPLC analysis.

For HPTLC analyses, crude extracts and creams were dissolved in MeOH at 2 and 20 mg/mL respectively, ultrasonicated for 15 min and centrifuged: 2 μ L of each supernatant were systematically applied on the HPTLC plate for analysis.

3.5. HPLC

Crude extracts and fractions were analysed using an HPLC Agilent 1200 system (Courtaboeuf, France) equipped with a DAD and an ELSD operating under the following conditions: injection volume: 20 μ L, flow rate: 1.0 mL/min, UV-detection performed at 310 nm. The mobile phase consisted in a gradient of water (A), acetonitrile (B) and 2-propanol (C), all acidified with 0.1% acid formic: 0–5 min, 5% B; 5–35 min, 5–100% B; 35–45 min, 100% B; 45–50 min, 100–40% B and 0–60% C, 50–60 min, 40% B and 60% C, 60–65 min, 40–5% B and 0–95% A, 65–70 min, 5% B and 95% A.

Quantification of the active molecule was performed by HPLC-UV at 310 nm (wavelength corresponding to the absorption maximum of the active molecule) under the same analytical conditions and with the same solvent gradient (but stopped after 43 min) as the one described previously. A calibration curve was constructed using (E)-cinnamic acid dissolved in methanol at concentrations ranging from 0.0078 to 1 mg/mL as a standard. SKE concentrations, expressed as mg equivalent of (E)-cinnamic acid per gram of the crude extract, were determined thanks to the linear regression equation generated by the calibration curve after integration and area measurement of the corresponding peak in various extracts.

Semi-preparative HPLC of the cyclohexane/ethyl acetate fraction resulting from the column fractionation of the *S. chamaecyparissus* extract (see Compound isolation) was performed on a Luna C18 column (Phenomenex, 250 \times 10 mm; 5 μ m). Elution was performed using a gradient of non-acidified water (A) and acetonitrile (B): 0–5 min, 60% B; 5–35 min, 75% B and 35–45 min, 100% B.

3.6. HPTLC

High performance thin-layer chromatography (HPTLC) was performed on 10 cm \times 20 cm HPTLC silica (0.20 mm) gel 60F₂₅₄ pre-coated glass plates (Merck). Standards and samples were applied as 8 mm large bands (15 tracks per plates, 50 nL/s delivery speed), 20 mm from the both plate edges by means of an automated ATS4 sampler (Camag). Two microlitres of each standard and samples were applied on silica gel plate. The mobile phase consisted of a solution of toluene/ethyl acetate/formic acid 98:2:1 (10 ml). The separation on the silica gel plate was performed in an automatic ADC2 developing chamber (Camag) with the tank previously saturated for 20 min with 25 ml of the developing solvent (humidity previously controlled for 10 min: 33–38%). Developing distance was 70 mm from the lower edge of the plate. Documentation of chromatographic plates (visualization and image capture) was performed at 254 nm, 366 nm and under white light by the TLC Visualizer documentation (Camag) operated with winCATS Version 1.4.6 software. Plates were scanned under the

following conditions using the TLC scanner 4 controlled by the WinCATS software: scanning mode, reflectance mode at 315 nm, D2 (deuterium) and W (tungsten) lamps, slit dimension 8.00 mm \times 0.40 mm, scanning speed 20 mm/s, and data resolution 100 μ m/step.

SKE presents a good UV absorbance, reaching a maximum at λ at 315 nm, without any co-elution.

The quantification of SKE content in formulated creams was performed via calibration curves constructed with five relative concentrations of ingredients 1, 2 and 3 diluted in MeOH and applied in triplicate on the HPTLC plate (stock solution prepared at 1 mg/ml; application of respectively, 1, 2, 6, 8 and 12 μ L of the corresponding solutions on the HPTLC plate).

The R² coefficients were all acceptable above 0.999.

3.7. Compound isolation

Open column chromatographic fractionation of the crude extract was performed using silica gel (normal phase) and yielded five fractions: cyclohexane fraction (F1), cyclohexane/ethyl acetate 1:1 v/v fraction (F2), ethyl acetate fraction (F3), ethyl acetate/methanol 1:1 v/v fraction (F4) and methanol fraction (F5).

3.8. ¹H and ¹³C NMR analysis

NMR analyses were carried out on Bruker Avance DRX500 (500 MHz) (Bruker, Wissembourg, France). Mono- (¹H and ¹³C) and bi-dimensional (COSY, HSQC, HMBG, NOESY) NMR spectra were recorded in CDCl₃ at 25 °C (Euriso-top, Saint-Aubin, France); chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm), and coupling constants (*J*) are given in hertz (Hz).

3.9. UPLC-ESI-HRMS

UPLC-ESI-HRMS analyses were performed on a QStar Elite QTOF mass spectrometer (Applied Biosystems SCIEX) operating under atmospheric pressure ionization, in positive-ion mode. Samples diluted in methanol at a concentration of 1 mg/mL, were eluted on an Acquity UPLC BEH C18 column (Waters, 100 \times 2.1 mm, 1.7 μ m, 35 °C); the flow rate was set at 0.6 mL/min and the injection volume was 1 μ L.

The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B), both acidified with 0.1% formic acid: 0–5 min, 0% B; 5–10 min, 0–100% B; 10–15 min, 100% B.

Compound 1: Powder, UV λ_{\max} (MeOH) 310 nm, C₁₆H₁₂O₄, MW = 256.2534, HRMS *m/z* 257.0816 (calcd for C₁₆H₁₃O₄, 257.0816).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ _H 6.8 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.6 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.3 (dd, *J* = 5.7, 1.6 Hz, 1H), 5.7 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.2 (dd, *J* = 2.5, 3.0 Hz, 1H), 5.1 (br s, 1H), 2.1 (s, 3H) and 2.0 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ _C 170.5, 168.9, 148.6, 133.8, 126.1, 117.3, 100.8, 83.1, 80.5, 77.7, 75.2, 70.3, 64.8, 20.5 and 4.8 ppm.

3.10. Antimicrobial activity

The crude extracts (tested at 2% and 0.2%), the subsequent fractions (tested at 0.4% and 0.04%) and the ingredients (tested at 0.4%) were evaluated for their antimicrobial activity against the fungus *A. niger* ATCC 16404, the yeast *C. albicans* ATCC 10231, the gram(–) bacteria *P. aeruginosa* ATCC 9027 and *S. aureus* ATCC and the gram(+) bacteria *E. coli* ATCC 8739 (only the ingredients were tested over *E. coli*). Bacterial and yeast strains were respectively grown in liquid nutrient broth (Difco, Surrey, England) at 37 °C, for 24 and 48 h before antimicrobial testing.

The assays were performed in 96-well plates as follows: extract samples were diluted in sterile water. Each concentration was assessed in triplicate with one supplementary control well containing no microbial strain. Negative control was constituted of the solvent mixture used to prepare the sample solutions, and positive control consisted of methylparaben, a synthetic preservative, at 0.4%. The 96-well plates were incubated at 37 °C, and the optical density (OD) reading was obtained at 620 nm, 24, 48 and 72 h after the beginning of the incubation to evaluate inhibition of microorganism growth. The results were expressed as a percentage of inhibition according to the formula:

$$\% \text{ inhibition} = [(OD_{(\text{control})} - OD_{(\text{sample})}) / OD_{(\text{control})}] * 100$$

where $OD_{(\text{control})}$ correspond to the optical density read for the well containing only water and $OD_{(\text{sample})}$ the optical density read for the well containing the crude extracts, the subsequent fractions or the ingredients.

3.11. Cosmetic formulation

All the formulations were prepared on a 100 g final mass-basis. Stirring was performed using a propeller mixer (Turbotest laboratory mixer equipped with an axial flow propeller, Rayneri, VMI). The cream formulations were prepared as described by Kerdudo et al. 2015 [34], using the ingredients listed in Table 9.

3.12. Challenge test

Antimicrobial preservative efficiency evaluation was performed by an external laboratory (Ideatest, Plouzané, France) following the procedure described in the European Pharmacopoeia [35].

Five potential pathogenic germs were chosen for this study (a cosmetic contamination by these microorganisms could notably cause skin infection or respiratory diseases): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739, *C. albicans* ATCC 10231 and *A. brasiliensis* ATCC 16404 [36]. Tryptic soy agar and Sabouraud dextrose were respectively used as culture media for bacteria and for yeast/fungus. Cosmetic formulations were sampled in single-use sterile flasks and every flask was inoculated with strain suspension (at 22.5 ± 2.5 °C in the dark). The inoculation concentration was fixed at 10^6 CFU/mL, 10^5 CFU/mL and 10^4 CFU/mL respectively, for bacteria, yeast, and fungus. The validation of the neutralization of the preservative

Table 10

European Pharmacopoeia criteria (logarithmic reduction as a function of days D).

European Pharmacopoeia					
Strains	Criteria	Logarithmic reduction			
		D2	D7	D14	D28
Bacteria	A	2	3	/	NI ^a
	B	/	/	3	NI
Yeast and molds	A	/	/	2	NI
	B	/	/	1	NI

^a NI: No Increase, /: no minimal reduction required.

was realized on the five strains, in the 1/10th and 1/100th dilution, with LT100 broth. The microbial densities were counted by inclusion (results in CFU/g or mL), and compared with the logarithmic reduction criteria of the European Pharmacopoeia presented in Table 10.

4. Conclusion

The present paper presents the development of a natural preservative for cosmetics, from plant sourcing to the final product formulation and challenge test, via the isolation of the bioactive molecule. When it comes to the development of new active ingredients for cosmetics, biodiversity is a rich source for inspiration and innovation, but as already discussed, such a development is a long-term and often unrewarding procedure. In fact, only five in every 100 genetic resources identified as being potentially of interest will ever end up in a cosmetic formula once their efficacy, quality and safety have been established [10].

After antimicrobial activity screening of 17 Mediterranean plants, *S. chamaecyparissus* was selected and further bioguided fractionation led to the isolation and identification of a major bioactive metabolite, spiroketalenol (SKE).

Quantitation and antimicrobial assays helped to highlight the correlation existing between extracts' SKE content and their corresponding activity against microorganisms.

The stability of SKE in cosmetic formulation was successfully assessed at room temperature, so further optimization of the natural ingredient took place. Extraction assays enabled the selection of methanol as the best solvent to enrich the *S. chamaecyparissus* extract in SKE. Discolouration of the extract performed by adsorption of the molecules responsible for the colouration on activated carbon, led to further SKE enrichment of the *S. chamaecyparissus* extract.

Various cosmetic liquid supports adapted to the cosmetic formulation and those displaying intrinsic antimicrobial activity were successfully added during the extraction process and highly active ingredients were obtained.

Formulation assays were performed using the different ingredients developed and subjected to challenge tests: the cosmetic cream formulated with so-called ingredient 3 consisting of caprylyl glycol and the *S. chamaecyparissus* extract (1:1) conforms to criteria A of the European Pharmacopoeia and so, appears to be a good candidate for future cosmetic use as a natural preservative.

Acknowledgements

The authors are grateful to C. Monin (ACPHYTAROMA) who collected and supplied the plants included in the screening presented in this paper. They also wish to thank the botanists J.-L. Polidori and F. Boillot (Biophyto) for the identification of these plants.

This work was a part of the APRF NATUBAVAL project (Pole PASS), which was made possible thanks to the financial support provided by the FEDER project number 2009_26268/2010_07953 (Provence-Alpes Cotes d'Azur region and European Union) and the ANRT (French National Association for Research and Technology) grant No 748/2010.

References

- [1] Allied market research website, <https://www.alliedmarketresearch.com/cosmetics-market> (last visited December 2, 2015).
- [2] C. Groot, I.R. White, in: R.J.G. Rycroft, T. Menne, P.J. Frosch (Eds.), *Textbook of Contact Dermatitis*, second ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1995, p. 461.
- [3] J.Y. Lee, J.N. Lee, G.T. Lee, K.K. Lee, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 38 (2) (2012) 171.
- [4] Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Off. J. Eur. Union* (2009), L342/59.
- [5] J.J. Kabara, D.S. Orth, in: J.J. Kabara, D.S. Orth (Eds.), *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practices*, Vol. 16, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1997.
- [6] P. Elsner, H.F. Merk, H.I. Maibach, in: *Cosmetic – Controlled Efficacy Studies and Regulations*, Springer Verlag, Stuttgart, Germany, 1999.
- [7] X. Fernandez, F. Merck, A. Kerdudo, *Techniques de l'ingénieur* J2284, 2012.
- [8] G. Robert, G. Jay, V. Guenter, *Crit. Rev. Toxicol.* 35 (5) (2005) 435.
- [9] J. Soares, *ACS Chem. Biol.* 6 (4) (2011) 289.
- [10] V. d'Enfert, *Expr. Cosmétique* 24 (2013) 40.
- [11] R.A. Mittermeier, N. Myers, J.B. Thomsen, G.A.B. Da Fonseca, S. Olivieri, *Conserv. Biol.* 12 (1998) 516.
- [12] N. Myers, R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca, J. Kent, *Nature* 403 (2000) 853.
- [13] F. Médail, P. Quézel, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 84 (1997) 112.
- [14] F. Médail, P. Quézel, *Conserv. Biol.* 13 (6) (1999) 1510.
- [15] O. Ertürk, *Biologia* 61 (3) 275.
- [16] B. Ozcan, M. Esen, M.K. Sangun, A. Coleri, M. Caliskan, *J. Environ. Biol.* 31 (5) (2010) 637.
- [17] S. Santoyo, R. Lloria, L. Jaime, E. Ibañez, F.J. Señoráns, G. Reglero, *Eur. Food Res. Technol.* 222 (2006) 565.
- [18] J. Reichling, A. Weseler, R. Saller, *Pharmacopsychiatry* 34 (1) (2001) S116.
- [19] P.K. Mukherjee, A. Wahile, K.F.H.N. Ahamed, S. Rajan, *Orient. Pharm. Exp. Med.* 3 (3) (2003) 111.
- [20] Z. Saddige, I. Naeem, A. Maimoona, *J. Ethnopharmacol.* 131 (5) (2010) 511.
- [21] USDA, ARS, National Genetic Resources Program, Germplasm Resources Information Network (GRIN) online database, National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?33078> (09 November 2015).
- [22] F. Bohlmann, C. Arndt, J. Starnick, *Tetrahedron Lett.* 4 (1963) 1605.
- [23] F. Bohlmann, C. Arndt, H. Bornowski, K.-M. Kleine, P. Herbst, *Chem. Ber.* 97 (1964) 1179.
- [24] F. Bohlmann, C. Zdero, *Chem. Ber.* 106 (1973) 845.
- [25] J. De Pascual Teresa, I.S. Bellido, M.S. González, S. Vicente, *Phytochem* 25 (1985) 185.
- [26] A. Lavaud, X. Fernandez, F. Merck, C. Monin, Y. Rolland, A. Kerdudo, A. Dingas, A.C. Bily, M. Roller, S. Birtic, WO2015140290 (A1) (24 September 2015).
- [27] N. Dayan, L. Kromidas (Eds.), *Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products*, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 2011.
- [28] B. Fonseca-Santos, M.A. Correa, M. Chorilli, *Braz. J. Pharm. Sci.* 51 (1) (2015) 17.
- [29] R.K. Sivamani, J.R. Jagdeo, P. Elsner, H.I. Maibach (Eds.), *Cosmetics and Active Cosmetics*, third ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2015.
- [30] F. Ibarra, Dr Straetmans, C.H. Johnson, *Cosmet. Toilet.* 123 (2008) 81.
- [31] L. Kunlayakorn, M. Kanlayavattanakul, N. Lourith, *J. Health Res.* 23 (1) (2009) 1.
- [32] D.C. Steinberg (Ed.), *Preservatives for Cosmetics*, third ed., Allured Publishing Corporation, Wheaton, USA, 2012.
- [33] W. Siebert, *Microbiology* 8 (2) (2013) 32.
- [34] A. Kerdudo, F. Fontaine-Vive, A. Dingas, C. Faure, X. Fernandez, *Int. J. Cosmet. Sci.* 37 (2015) 31.
- [35] *European Pharmacopoeia*, seventh ed., Chapter 5.1.3. Efficacy of Antimicrobial Preservation.
- [36] ISO 11930, *Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product*.

Annexe 4 : Dossier « Techniques de l'Ingénieur » J 2284 (2012)



DOSSIER

TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR

l'expertise technique et scientifique de référence

j2284

Conservateurs pour cosmétiques - Généralités et conservateurs antimicrobiens

Par :

Xavier FERNANDEZ

Docteur en sciences, HDR, Maître de conférences à l'Université de Nice-Sophia Antipolis, Directeur du Master 2 Professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL), Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Florence MERCK

Master Valorisation des ressources végétales (Université de Strasbourg), Doctorante en Chimie, Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Audrey KERDUDO

Ingénieur Chimiste (ENSC de Rennes), Doctorante en Chimie, SOFIA Cosmétiques, Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Ce dossier fait partie de la base documentaire

Élaboration des formulations

dans le thème Formulation

et dans l'univers Procédés chimie - bio - agro

Document délivré le 05/11/2012

Pour le compte

7200097598 - éditions ti // nc AUTEURS // 217.109.84.129

Pour toute question :

Service Relation Clientèle • Éditions Techniques de l'Ingénieur • 249, rue de Crimée
75019 Paris – France

par mail : infos.clients@teching.com ou au téléphone : 00 33 (0)1 53 35 20 20



Toute reproduction sans autorisation du Centre français d'exploitation du droit de copie est strictement interdite. © Editions T.I.

Conservateurs pour cosmétiques

Généralités et conservateurs antimicrobiens

par **Xavier FERNANDEZ**

*Docteur en sciences, HDR
Maître de conférences à l'Université de Nice-Sophia Antipolis
Directeur du Master 2 Professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL)
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis*

Florence MERCK

*Master Valorisation des ressources végétales (Université de Strasbourg)
Doctorante en Chimie
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis*

et **Audrey KERDUDO**

*Ingénieur Chimiste (ENSC de Rennes)
Doctorante en Chimie
SOFIA Cosmétiques
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis*

1. Conservation des produits cosmétiques	J 2 284 - 2
1.1 Généralités et enjeux	— 2
1.2 Différents types de conservateurs	— 3
1.3 Conservateurs autorisés	— 3
1.4 Tests biologiques appliqués à la conservation des produits cosmétiques	— 6
2. Paramètres influençant la conservation des cosmétiques.....	— 8
2.1 Ingrédients.....	— 8
2.2 Activité de l'eau.....	— 10
2.3 pH	— 11
2.4 De la fabrication au packaging.....	— 12
3. Conservateurs de synthèse	— 13
3.1 Acide sorbique, formol et autres conservateurs de synthèse.....	— 13
3.2 Cas des parabènes	— 13
4. Conservateurs naturels.....	— 16
4.1 Définitions et modes d'obtention	— 16
4.2 Huiles essentielles.....	— 16
4.3 Extraits naturels	— 16
4.4 Mode d'action des conservateurs naturels.....	— 16
4.5 Cas des cosmétiques biologiques	— 18
5. Autres solutions	— 19
5.1 En formulation	— 19
5.2 Stérilisation.....	— 19
5.3 Autres solutions	— 19
6. Conclusions et perspectives.....	— 19
Pour en savoir plus	Doc. J 2 284

Chaque jour, les français achètent en moyenne 525 000 shampoings, 309 000 produits de soins spécifiques et 157 000 flacons de parfum. En 2008, le marché de la cosmétique en France représentait un chiffre d'affaires de plus de 16 milliards d'euros. Ce secteur est en croissance constante et était

cette même année le quatrième secteur exportateur de l'industrie française, derrière l'aéronautique, l'automobile et les boissons (hors armement). Au sein même de ce marché lucratif, la cosmétique biologique et naturelle est en progression continue, répondant ainsi à la demande accrue des consommateurs.

On entend par produit cosmétique toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect et/ou de corriger les odeurs corporelles et/ou de les protéger ou de les maintenir en bon état.

Que l'orientation choisie soit la cosmétique classique ou naturelle, les industriels de ce secteur sont tous confrontés à un problème majeur : la conservation des produits cosmétiques.

En effet, il est indispensable de protéger toute formule de la contamination microbienne afin de garantir au produit une durée de vie suffisante, mais également une sécurité d'utilisation maximale au consommateur. De plus, les conservateurs doivent protéger les produits des contaminations extérieures, notamment celles venant du consommateur par contact avec le produit, de l'air, du stockage...

Les conservateurs utilisés peuvent être d'origine **synthétique** ou **naturelle**. Ainsi, on dénombre une cinquantaine de conservateurs antimicrobiens d'origine synthétique autorisés en Europe. Parmi eux, les esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, également connus sous le nom de **parabènes**, présents dans 80 % des produits cosmétiques.

Ces parabènes ont fait l'objet d'études scientifiques et sont controversés en raison de leur cancérogénicité potentielle. Cela a conduit les autorités françaises à légiférer pour interdire l'utilisation des parabènes en cosmétique. Un intérêt massif est depuis porté aux conservateurs d'origine naturelle, aux cosmétiques biologiques, considérés comme sains et dénués de tout risque. Cependant, des **conservateurs naturels** comme les huiles essentielles sont souvent à l'origine d'allergies. D'autres considérés comme écocompatibles, tels que l'alcool, peuvent provoquer un dessèchement de la peau. C'est pourquoi il est important d'étudier les alternatives de conservation permettant une **formulation plus écologique** et orientée vers le « naturel », à savoir les autres solutions naturelles, mais également les solutions directement liées aux **paramètres de formulation, au packaging et au conditionnement des produits cosmétiques**.

Sauf indications contraires, les pourcentages indiqués dans ce texte sont massiques.

1. Conservation des produits cosmétiques

1.1 Généralités et enjeux

On appelle **conservateur** toute substance ou mélange de substances permettant de lutter contre la dégradation chimique ou microbiologique d'un produit. Plus particulièrement, les **conservateurs antimicrobiens** s'opposent aux dégradations d'origine bactérienne ou fongique (champignons microscopiques ou levures).

Les conservateurs jouent plusieurs rôles dans la protection des produits cosmétiques. Ils permettent tout d'abord la protection des produits cosmétiques des contaminations pouvant être apportées lors de la production par :

- les matières premières (principes actifs, eau, colorants...);
- les articles de conditionnement ;

- l'atmosphère des locaux ;
- le personnel.

Ils ont également un rôle de protection lors de l'utilisation du produit par le consommateur qui le pollue lors du prélèvement.

Tous les produits cosmétiques doivent contenir des conservateurs. Néanmoins, selon leur nature, composition ou packaging, leur présence et concentration peuvent être très différentes.

Ainsi, un produit pauvre en éléments nutritifs pour les micro-organismes (eau, sucres, vitamines, protéines ou acides aminés) peut contenir peu de conservateur, alors qu'un produit riche en éléments nutritifs et/ou en pot doit en contenir une grande quantité qui peut aller jusqu'à la quantité maximale autorisée, à savoir 1 % de phenoxyéthanol ou encore 0,5 % d'urée diazolidinyle par exemple, sachant que les formulateurs privilégient bien souvent un mélange de conservateurs en quantités inférieures, plutôt qu'un seul à son maximum autorisé. Dans certains cas, un produit anhydre ou sous forme d'aérosol et contenant de l'alcool peut ne pas contenir de conservateur.

Liste des acronymes	
Sigle	Définitions
AFNOR	Association française de normalisation
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ARPP	Autorité de régulation professionnelle de la publicité
ATCC	American Type Culture Collection
BDIH	<i>Bundesverband der Industrie- und Handelsunternehmen</i> (Association fédérale des entreprises commerciales et industrielles)
BPF	Bonnes pratiques de fabrications
CCM	Chromatographie sur couche mince
CFU (ou UFC)	<i>Colony Forming Unit</i> (unité formant colonie)
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CMC	Concentration micellaire critique
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COSMOS	<i>Cosmetic Organic Standard</i> (norme cosmétique biologique)
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EN	Norme européenne
IMI	International Mycological Institute, Royaume-Uni
IP	Institut Pasteur
ISO	International Standardization Organisation (Organisation internationale de normalisation)
KCTC	<i>Korean Collection for Type Culture</i>
NBRC	<i>National Biological Resource Center</i>
NCIMB	<i>National Collection of Industrial and Marine Bacteria</i>
NCPF	<i>National Collection of Pathogenic Fungi</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
NF	Norme française
PP	Polypropylène
PE	Polyester
PS	Polystyrène
PVC	Chlorure de polyvinyle
SCCP	Scientific Committee on Consumer Products (Comité scientifique des produits de consommation)

1.2 Différents types de conservateurs

On distingue plusieurs catégories de conservateurs antimicrobiens :

- les bactériostatiques : empêchent le développement des bactéries ;
- les bactéricides : tuent les bactéries ;
- les fongistatiques : empêchent le développement des champignons ;
- les fongicides : tuent les champignons.

Leur activité peut s'expliquer par trois grands modes d'action :

- la dénaturation des protéines ;
- l'altération des systèmes enzymatiques de la cellule bactérienne ;
- la modification du système de reproduction en dénaturant les acides nucléiques.

Les conservateurs antimicrobiens ont pour mission de protéger les produits cosmétiques des contaminations qui peuvent être apportées par la fabrication. Celles-ci peuvent provenir de différentes sources : les matières premières (l'eau, les principes actifs d'origine biologique, les colorants ou encore le talc), les articles de conditionnement, l'air ambiant ou les manipulateurs.

Leur rôle consiste également à protéger le produit de la contamination par l'utilisateur au moment de son prélèvement. Les **bonnes pratiques de fabrication (BPF)** permettent d'obtenir un produit fini très peu contaminé (§ 2.4.1). Certaines méthodes de conditionnement permettent d'échapper à l'emploi d'un conservateur dans la formulation (§ 2.4.2 et § 5). Ils peuvent empêcher leur développement en étant bactériostatiques ou fongistatiques, et les tuer en étant bactéricides ou fongicides.

1.3 Conservateurs autorisés

En Europe, les conservateurs antimicrobiens pouvant être utilisés dans les produits cosmétiques sont inscrits sur une liste positive : l'**annexe V de la Directive cosmétique européenne** (arrêté du 6 février 2001 pour la législation française). Cette réglementation fixe également leurs concentrations, leurs limites et conditions d'utilisation.

Certaines de ces substances (elles sont alors notées avec le symbole (*)) peuvent également être utilisées à d'autres concentrations et à d'autres fins dans les produits cosmétiques.

Dans cette annexe, on entend par :

- **sels**, les sels des cations sodium, potassium, calcium, magnésium, ammonium et éthanolamine ; des anions chlorure, bromure, sulfate, acétate ;
- **esters**, les esters de méthyle, d'éthyle, de propyle, d'isopropyle, d'isobutyle et de phényle.

Les différentes restrictions sont très variables selon les structures. Ainsi, tous les produits formulés contenant du formaldéhyde ou une substance libérant du formaldéhyde doivent présenter obligatoirement sur leur étiquette la mention « contient du formaldéhyde » si la concentration dans le produit fini dépasse 0,05 %.

Certaines substances peuvent également être utilisées dans la formulation de produits cosmétiques et posséder des propriétés antimicrobiennes, elles contribuent ainsi à la conservation du produit. Néanmoins, ces substances – principalement des **alcools et huiles essentielles** – n'étant pas dans l'annexe V, ne peuvent être considérées comme des conservateurs.

1.3.1 Conservateurs de synthèse

Même si plusieurs dizaines de conservateurs antimicrobiens de synthèse sont autorisées (tableau 1), le formulateur se contente généralement de quelques-uns d'entre eux qui sont fréquemment utilisés.

Tableau 1 – Exemple de conservateurs autorisés en cosmétique				
Numéro CE	Substance	Concentration massique maximale autorisée	Limitations et exigences	Conditions d'emploi et avertissement à reprendre obligatoirement sur l'étiquetage
1	Acide benzoïque, ses sels et ses esters (*)	0,5 % (en acide)		
2	Acide propionique et ses sels (*)	2 % (en acide)		
3	Acide salicylique et ses sels	0,5 % (en acide)	À ne pas utiliser dans les préparations destinées aux enfants au-dessous de 3 ans, à l'exception des shampoings	Ne pas employer pour les soins d'enfants au-dessous de trois ans
4	Acide sorbique et ses sels	0,6 % (en acide)		
5	Formaldéhyde et paraformaldéhyde	0,2 % (sauf pour hygiène buccale)	Interdiction dans les aérosols (sprays)	
		0,1 % (pour hygiène buccale) Concentration exprimée en formaldéhyde		
8	Sels du zinc du pyridine-1-oxy-2-thiol (*) (pyrithione de zinc)	0,5 %	Autorisé dans les produits rincés après usage. Interdits dans les produits pour les soins buccaux	
18	Acide undécylénique et ses sels (*)	0,2 % (en acide)		
48	Glutaraldéhyde (1,5-pentanedial)	0,1 %	Interdit dans les aérosols (sprays)	Contient du glutaraldéhyde (dans la mesure où la concentration en glutaraldéhyde dans le produit fini dépasse 0,05 %)

Pendant très longtemps les esters de l'acide 4-hydroxybenzoïques ou parabènes furent les plus utilisés. Fin 2010, ils étaient présents dans plus de 80 % des produits cosmétiques, principalement les esters propyliques et méthyliques. Ils possèdent de très bonnes activités bactéricides et fongicides et sont très bon marché. Ils sont généralement vendus et utilisés en mélange pour présenter un spectre d'activité le plus large possible.

D'autres conservateurs de synthèse (figure 1) sont également couramment utilisés, il s'agit de :

- l'acide sorbique (fongicide) ;
- l'acide déhydroacétique et son sel de sodium (fongicide) ;
- l'acide benzoïque (fongicide) ;
- l'acide salicylique (fongicide et bactéricide) ;
- le formol (bactéricide, fongicide, mais allergisant) ;
- les donneurs de formol (*Germall 11*, Imidazolidine urée, *Bronidox*, *Bronopol* (bromonitropropanediol), *Dowicil 200*, *Glydant*) ;
- le chlorure de benzalkonium (fongicide et bactéricide) ;
- le triclosan (fongicide et bactéricide) ;
- la chlorhexidine (fongicide et bactéricide) ;
- le glutaraldéhyde (fongicide et bactéricide).

Les alcools possèdent des propriétés conservatrices mais à forte concentration uniquement. Ainsi, l'éthanol peut être considéré

comme un conservateur si sa concentration dans la formule est supérieure à 20 %.

1.3.2 Conservateurs naturels

De nombreux extraits naturels (huiles végétales, huiles essentielles, extraits aqueux ou organiques...) possèdent des propriétés antimicrobiennes. Cependant, ne faisant pas partie de la liste des 56 conservateurs autorisés, ils ne peuvent pas être utilisés et étiquetés comme conservateurs. Néanmoins, le rejet des conservateurs de synthèse par les consommateurs depuis la polémique sur les parabènes conduit progressivement à une augmentation de leur utilisation.

On recense un grand nombre de publications sur ce sujet, plus de 5 000 références pour une recherche relative au concept **extraits conservateurs** (*extract preservative*) sur la base de données SciFinder (*Chemical Abstract Service CAS*), dont la majeure partie ces dix dernières années, et de nombreux nouveaux extraits commercialisés dans ce but ces dernières années.

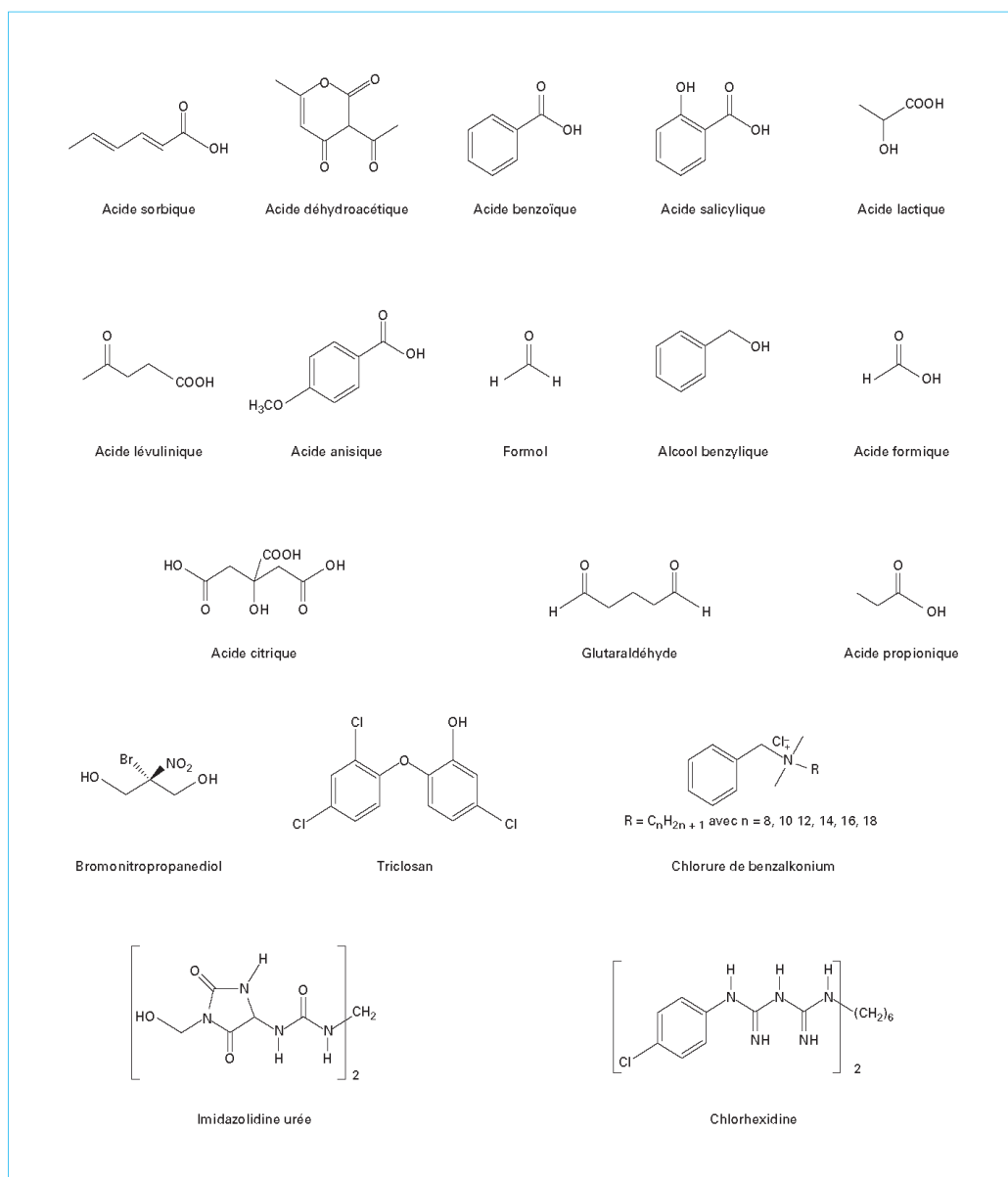


Figure 1 - Formules développées de conservateurs couramment utilisés

Introduction à la microbiologie [1] [2]

Les **micro-organismes** contre lesquels les conservateurs doivent avoir une activité sont, soit des bactéries, soit des champignons ou levures.

Les **bactéries** sont des micro-organismes unicellulaires sans noyau (procarotes), alors que les **champignons** sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires (contiennent un noyau). Les **levures** sont des champignons unicellulaires.

Comme toute cellule vivante, les micro-organismes sont dotés d'une membrane cytoplasmique formée d'une bicouche lipidique incrustée de protéines. La composition de cette membrane diffère selon les micro-organismes.

Chez les champignons comme *Candida albicans* ou *Aspergillus*, la membrane plasmique est recouverte d'une paroi externe composée de chitine et de glucane. Les inhibiteurs de la synthèse de ces deux composés ont donc des propriétés antifongiques.

Les bactéries synthétisent (grâce à des enzymes) une paroi autour de cette membrane plasmique. La nature de la paroi permet de distinguer (figure 2) :

- les **bactéries Gram(+)** (par exemple, *Staphylococcus aureus*) ; paroi constituée majoritairement de peptidoglycane ou muréine et d'acide téichoïque qui est en contact direct avec la membrane cytoplasmique ;
- les **bactéries Gram(-)** (par exemple, *Pseudomonas aeruginosa*) ; paroi constituée d'une couche de peptidoglycane [plus fine que chez les Gram(+)], d'une couche de lipoprotéines et d'une couche superficielle de lipopolysaccharides. Cette membrane externe de phospholipides est percée de pores (porines). Enfin, cet ensemble de couches qui forme la membrane externe est séparé de la membrane cytoplasmique par un espace périplasmique.

Ainsi, les conservateurs bactéricides ou fongicides doivent agir sur la paroi bactérienne ou sur la membrane cytoplasmique.

L'objectif de l'industriel cosmétique est donc de proposer un produit non contaminé selon la réglementation et dont le système de conservation protège de toute prolifération microbienne avant et pendant son utilisation [4] [5].

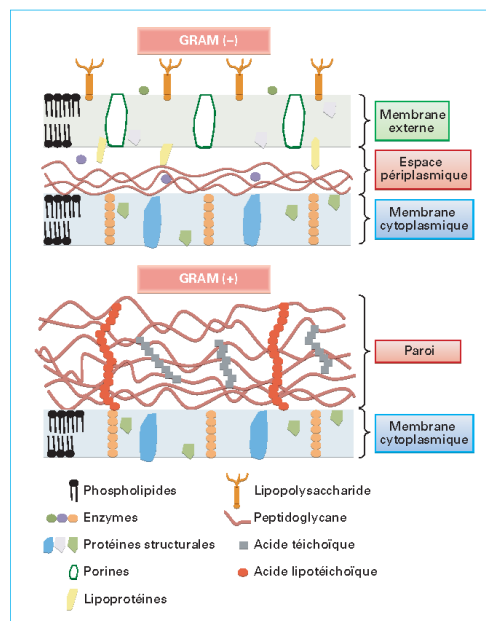


Figure 2 - Représentation schématique des membranes cellulaires des bactéries à Gram positifs et négatifs

Une attention particulière doit être accordée aux produits cosmétiques utilisés sur le contour des yeux, sur les muqueuses en général, sur une peau lésée, chez les enfants de moins de trois ans, chez les personnes âgées et chez les personnes au système immunitaire fragilisé. Ces produits sont dits de catégorie 1, les autres étant dits de catégorie 2. Ces produits doivent répondre aux contraintes suivantes (en Europe).

• **Catégorie 1** : le nombre total de micro-organismes mésophiles aérobies (micro-organismes pouvant se développer à des températures entre 20 et 45 °C, en présence d'oxygène atmosphérique [3]) acceptable ne doit pas excéder 10² CFU/g (Unité Formant Colonie) ou 10² CFU/ml dans 0,5 g ou 0,5 ml de produit (limite maximale acceptable 5 × 10² CFU/ml).

• **Catégorie 2** : le nombre total de micro-organismes mésophiles aérobies acceptable ne doit pas excéder 10³ CFU/g ou 10³ CFU/ml dans 0,1 g ou 0,1 mL de produit (limite maximale acceptable 5 × 10³ CFU/ml) [4].

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus* (figure 2) et *Candida albicans* sont les souches pathogènes à risque dans les produits topiques car elles peuvent engendrer des infections cutanées ou ophtalmologiques. Elles ne doivent donc pas être détectées dans 0,5 g ou 0,5 ml de produits de catégorie 1, ni dans 0,1 g ou 0,1 ml de produits de catégorie 2. La détection d'autres sortes de micro-organismes (par exemple des indications de contamination fécale telles qu'*Escherichia coli*) peut aussi s'avérer nécessaire car leur présence laisse penser à une défaillance de l'hygiène au cours du processus de fabrication.

Ainsi, la qualité microbiologique des produits fabriqués doit être évaluée tout au long de la chaîne de fabrication, de la matière première au produit fini, en passant par l'environnement de production.

1.4 Tests biologiques appliqués à la conservation des produits cosmétiques

1.4.1 Tests d'activité antimicrobienne

L'annexe I du règlement CE 1223 2009 du parlement européen pour la cosmétique précise que le rapport de sécurité du produit doit comporter les **spécifications microbiologiques** dudit produit, ainsi que les **résultats du challenge test** pour la conservation. Le challenge test est un test réglementé permettant d'évaluer l'efficacité du système conservateur (§ 1.4.1.2).

1.4.1.1 Analyse microbiologique du produit

Afin de déterminer quels sont les produits nécessitant une analyse microbiologique en vue d'une détection de micro-organismes spécifiques et non spécifiques, il est conseillé aux industriels d'effectuer une analyse du risque microbiologique selon la norme NF EN ISO 29621 de juin 2011. En effet, les produits présentant un faible risque microbiologique ne nécessitent pas la mise en œuvre des normes internationales de microbiologie relatives aux cosmétiques.

On peut citer par exemple les produits défrisants qui présentent un pH ≥ 10,0 ou encore les vernis à ongles à base de solvants.

Tableau 2 – Exemple de neutralisants de l’activité antimicrobienne de conservateurs

Conservateurs	Composés chimiques pouvant neutraliser l’activité antimicrobienne des conservateurs
Produits phénoliques : parabènes, phénoxyéthanol, etc. Phényléthanol Anilides	Lécithines, Polysorbates 80 Condensat d’oxyde d’éthylène d’alcools gras Tensioactifs non ioniques
Isothiazolinones, Imidazoles	Lécithines, saponines Amines, sulfates, mercaptans, bisulfite de sodium, thioglycolate de sodium
Oxydants	Thiosulfate de sodium

Tableau 3 – Critères d’évaluation de l’efficacité antimicrobienne d’un produit cosmétique
(inspiré de la norme NF T 75-611)

Profil	Bactéries			Levures			Moissures	
	T 7 j	T 14 j	T 28 j	T 7 j	T 14 j	T 28 j	T 14 j	T 28 j
Profil A	≥ 3 lg	NI	(NI)	≥ 1 lg	NI	(NI)	NI	NI
Profil B		≥ 3 lg	NI		≥ 1 lg	NI	NI	NI

Ce critère d’évaluation correspond à la réduction du nombre de microorganismes viables.
NI pour *No Increase* : pas d’augmentation de la population microbienne par rapport au temps précédent.
Les cases vides comportent un critère correspondant à des déterminations facultatives.
Les critères entre parenthèses sont à considérer comme informatifs.

Afin d’effectuer ces examens microbiologiques au sein du laboratoire, certaines contraintes sont à respecter pour la viabilité du test :

- toute contamination de l’échantillon à tester doit être évitée, celle-ci pouvant avoir lieu lors du transport, de la réception, du stockage ou de la manipulation de l’échantillon ;
- l’inhibition potentielle de la croissance microbienne par l’échantillon doit être neutralisée avant le début du test de recherche ou de dénombrement des micro-organismes viables dans le produit (tableau 2), (cf. dossier [P 3 352] – *Analyses en microbiologie – Produits non stériles*).

Les laboratoires de contrôle de la propreté microbiologique de produits cosmétiques doivent être en possession d’un équipement de stérilisation adéquat pour le matériel, les milieux de culture et les réactifs (stérilisation par chaleur sèche, humide et filtration) et de hottes microbiologiques (hotte à flux laminaire ou de sécurité) afin de pouvoir manipuler dans des conditions de sûreté et de rigueur optimales [5].

Le laboratoire effectuant les tests possède une certaine liberté quant au choix de la préparation des échantillons, plus particulièrement la préparation des milieux de culture. Il est possible de préparer entièrement les milieux selon des compositions décrites dans les normes AFNOR pour le contrôle microbiologique des cosmétiques. Il est également possible d’utiliser des milieux de culture déshydratés conformément aux instructions du fabricant ou encore des milieux prêts à l’emploi.

1.4.1.2 Challenge test

Différentes normes définissent un test d’efficacité de la conservation antimicrobienne ou challenge test :

- **NF T 75-611** : Cosmétiques – Microbiologie – Évaluation de la protection antimicrobienne d’un produit cosmétique ;
- **pharmacopée européenne 7.0 EP 5.1.3** : Efficacité de la conservation antimicrobienne ;
- **pharmacopée US – USP 51** : *Preservative Efficacy Testing and Preservative Challenge Testing by Antimicrobial Test*.

Le challenge test permet de tester le comportement d’une formulation cosmétique face à une contamination volontaire et arti-

cielle par des micro-organismes de référence afin que les produits mis à disposition du consommateur ne présentent pas de risque particulier. Les micro-organismes de test sont inoculés en quantité déterminée puis l’évolution de la population viable est suivie par dénombrement des germes dans des échantillons prélevés à intervalles de temps donnés (en général à J2, J7, J14 et J28). La température et la durée des essais sont contrôlées.

- Cet essai d’efficacité de conservation doit être effectué :
 - à la conception du produit pour sélectionner le système le plus efficace ;
 - lors de l’étude de stabilité, afin de s’assurer de son efficacité à la date de péremption du produit ;
 - à chaque changement d’un élément de la formulation ou du conditionnement.

Les essais doivent être menés en utilisant comme organismes de test les souches suivantes :

- ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027** (souches équivalentes : CIP 82.118, NCIMB 8626, NBRC 13275, KCTC 2513) ;
- ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** (souches équivalentes : CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276, KCTC 1916) ;
- ***Escherichia coli* ATCC 8739** (souches équivalentes : CIP 53.126, NCIMB 8545, NBRC 3972, KCTC 2571, NCTC 8545) ;
- ***Candida albicans* ATCC 10231** (souches équivalentes : IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594, KCTC 17205) ;
- ***Aspergillus niger/brasiliensis* ATCC 16404** (souches équivalentes : IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455, KCTC 6317).

La Pharmacopée européenne 5.1.3 (01/2011 : 50103) recommande de tester *Escherichia coli* pour les préparations orales.

Avant tout challenge test, la qualité microbiologique du produit doit être déterminée car une flore initialement présente dans le produit interférera avec les résultats de l’essai.

Selon les résultats du test, deux profils de produits sont définis selon le tableau 3 (inspiré de la norme NF T 75 611:2007). Un produit de profil A satisfait aux exigences de protection antimicrobienne. S’il répond aux critères du profil B, des éléments de l’analyse de risques doivent justifier un niveau de maîtrise du risque microbiologique conforme [conditionnement, pH, activité de l’eau (a_w)...]. Si la formule ne correspond pas aux profils A ou B, le

responsable de la mise sur le marché du produit doit apporter les arguments de maîtrise renforcée du risque microbiologique du produit.

Il est à noter qu'en fonction de la norme appliquée (NF T 75-611, Pharmacopée européenne 7.0 5.1.3 ou USP32-NF27), certaines variantes sont observées dans les critères d'acceptation [6].

1.4.2 Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits naturels

Plusieurs techniques permettent de mesurer l'activité antimicrobienne d'extraits naturels. Elles peuvent fournir soit un résultat qualitatif (présence ou absence d'activité), soit un résultat quantitatif (le plus souvent en termes de **concentration minimale inhibitrice (CMI)**). Ces méthodes peuvent être mises en œuvre dans un milieu solide ou liquide, ou encore en phase vapeur. La **technique de diffusion en milieu solide** reste la plus utilisée, notamment pour les huiles essentielles, qui sont insolubles dans l'eau. Cette technique est qualitative et différentes manières de procéder sont envisageables.

La **méthode des disques** consiste à saturer un papier filtre stérilisé de 6 mm de diamètre avec la solution contenant l'extrait à la concentration déterminée puis à déposer ce papier imbibé sur une boîte de Petri gélosée inoculée au préalable avec les micro-organismes testés. Pendant l'incubation, un halo clair apparaît autour du disque lorsque l'extrait présente une activité. Le diamètre d'inhibition (incluant le diamètre du disque) donne une information sur les propriétés antimicrobiennes de l'extrait testé.

La **méthode des puits** est similaire à la précédente, mais à la place du disque de papier, un trou de 6 mm de diamètre est creusé stérilement dans la gélose ensemencée puis un volume contrôlé de l'extrait à tester y est déposé. L'activité antimicrobienne dépend du diamètre du halo clair autour du puits, traduisant l'absence de croissance microbienne.

La **méthode de dilution** est quantitative et permet de déterminer la concentration minimale d'inhibition ou CMI. Cette technique est réalisée dans des tubes à essais ou en microplaques de 96 puits, contenant un bouillon de culture, ainsi qu'une suspension microbienne et différentes concentrations de l'extrait à tester. Le premier tube ou puits de la gamme de concentrations testées présentant l'absence de croissance microbienne donne la CMI de l'extrait [7] [8] [9].

La **technique en phase vapeur** est adaptée pour tester l'activité antimicrobienne de composés volatils (huiles essentielles). Elle est également réalisée à partir d'une boîte de Petri ensemencée. Seulement, un papier filtre imbibé d'huile essentielle ou une cupule contenant de l'huile essentielle est déposé au centre du couvercle de la boîte de Petri, celle-ci étant incubée à l'envers (couvercle en bas). Ainsi, seuls les composés volatils entrent en contact avec le milieu ensemencé, permettant d'en révéler l'activité antimicrobienne [10] [11] [12].

Enfin, la **bioautographie** [14] est une méthode appliquée à la chromatographie sur couche mince (CCM). Elle consiste à déposer et faire migrer les échantillons à analyser sur une plaque, dans des conditions à définir selon le type d'échantillon. Trois techniques de bioautographie ont été décrites :

- les méthodes générales, consistant à placer la plaque CCM sur des boîtes de Petri ensemencées afin de déterminer les zones d'inhibition correspondant aux composés actifs, après incubation ;
- la bioautographie directe, pour laquelle il faut pulvériser directement une suspension de micro-organismes (sous forme de spores, par exemple), sur la plaque développée, et incubé le tout ;
- la bioautographie dite « d'immersion » consiste à recouvrir la plaque CCM de milieu gélosé liquide, et après solidification de ce milieu, à inoculer des micro-organismes. Après quelques heures de repos, les plaques sont incubées.

2. Paramètres influençant la conservation des cosmétiques

De la bactérie à l'humain, tout organisme vivant requiert des conditions spécifiques pour se développer. L'élément essentiel à la croissance de toute cellule est l'**eau**. Cet élément est donc l'un des critères déterminant pour le développement des micro-organismes. Chaque micro-organisme possède également un **domaine de pH** dans lequel la prolifération est optimale. De plus, la présence de **nutriments**, de **minéraux** et d'**oxygène** est nécessaire [13].

Les facteurs favorisant le développement et la croissance des micro-organismes étant connus, il est donc possible de trouver des solutions de formulation pour limiter, voire empêcher ce phénomène [14].

2.1 Ingrédients

2.1.1 Tensioactifs

Les **tensioactifs** sont des **molécules amphiphiles** très utilisées par l'industrie cosmétique, tout particulièrement pour leur capacité à abaisser la tension interfaciale entre deux milieux immiscibles tels qu'une phase aqueuse et une phase huileuse par exemple. Ils sont donc majoritairement utilisés en tant qu'agents détergents, moussants, mouillants, solubilisants ou dispersants [15] [16]. Les tensioactifs sont composés d'une chaîne apolaire (hydrophobe) qui porte à son extrémité une fonction polaire (hydrophile).

Ils sont classés en fonction de la nature de leur tête polaire. Sont ainsi distingués les tensioactifs anioniques, cationiques, non ioniques et amphotères ou zwitterioniques (cf. [K 342] – *Tensioactifs*). Parmi ces classes de tensioactifs, certaines sont connues pour présenter un spectre d'activité antimicrobienne plus ou moins important. Les interactions entre les tensioactifs antimicrobiens et leurs cellules cibles sont pour la plupart très complexes car elles peuvent découler d'interactions électrostatiques, d'effets hydrophobes ou de la formation de structures secondaires ([J 2 265] – *Tensioactifs non ioniques – Mise en œuvre industrielle* et [J 2 266] – *Tensioactifs non ioniques – Propriétés : tableaux comparatifs*) [17].

L'activité bactéricide des **tensioactifs cationiques**, en particulier les sels d'ammonium quaternaire, a été très étudiée. Cette famille de molécules altère la perméabilité des cellules membranaires bactériennes, diminuant l'activité et menant à la mort des bactéries cibles. De plus, ces tensioactifs présentent un large spectre d'activité sur l'échelle de pH communément rencontrée en cosmétique, une faible toxicité aux concentrations usuelles, une solubilité élevée dans l'eau et sont bien tolérés par la peau. Il faut néanmoins noter leur inactivation par des tensioactifs anioniques (dont les savons et acides gras libres), les fibres du coton et certaines protéines.

Les **tensioactifs amphotères** ont des propriétés bactéricides notables mais inférieures à celle des sels d'ammoniums quaternaires.

Les savons d'acides gras appartiennent à la classe des **tensioactifs anioniques**. Ils possèdent une activité antimicrobienne qui dépend de l'alcalinité et de l'activité de l'eau du milieu. Lorsqu'ils sont incorporés en concentration supérieure à leur CMC (Concentration micellaire critique), ils ont un effet chaotrope sur les cellules membranaires microbiennes (par exemple, le Sodium Dodecyl Sulfate SDS). Plus précisément, l'action chaotrope entraîne la destruction de la structure spatiale des macromolécules biologiques en interférant avec les liaisons faibles intramoléculaires de type

Tableau 4 – Famille de molécules tensioactives dont plusieurs dérivés ont montré une activité antibactérienne et/ou antifongique significative

Classe de tensioactifs	Famille de tensioactifs
Anioniques	Savons d'acides gras
Cationiques	Sels d'ammoniums quaternaires Aminimides
Amphotères	Alkyl bétaines Alkyl amidopropylbétaines Alkyl aminopropionates et Alkyl iminodipropionates Alkyl imidazolines Dérivés d'acides aminés
Non ioniques	Monoesters d'acides gras Monoesters d'acides alkyldihydroxybenzoïques Polyéthylène glycol Alkanolamides Dérivés polyoxyéthyléniques Esters de sucres Alkyl glycosides ou Alkyl glycopyranosides Oligosaccharides contenant un groupe amino Diéthanolamides de N-lauroyl dipeptides

liaisons hydrogène, forces hydrophobes et de Van der Waals [18] [19]. De manière générale, les tensioactifs anioniques sont plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif. Les autres familles de tensioactifs anioniques ont une activité antimicrobienne faiblement marquée.

Les **tensioactifs non ioniques** sont généralement utilisés en tant qu'agents solubilisants. Leur potentiel antimicrobien dépend souvent de leur concentration. En effet, en deçà de leur CMC, ils peuvent exercer une activité contre les micro-organismes, alors qu'au-delà de cette valeur, ils risquent d'inhiber l'activité biocide, les agents antimicrobiens se retrouvant en partie encapsulés dans les micelles de tensioactifs [20] [21] [22]. Cet antagonisme peut toutefois être prévenu en évitant la comicellisation [23].

Le tableau 4 donne un aperçu des familles de molécules dont plusieurs dérivés ont montré une activité antibactérienne et/ou antifongique significative. Il faut cependant toujours garder à l'esprit que les interactions entre les tensioactifs et les nombreuses molécules présentes au sein des formules cosmétiques peuvent avoir un fort impact sur cette activité.

2.1.2 Acides gras et leurs esters

Les premières études axées sur l'activité germicide des acides gras se sont déroulées au cours des années 1920 à 1940, puis plus tard avec John J. Kabara dans les années 1970 [24] [25].

Des tests d'activité antimicrobienne ont été effectués sur des acides gras saturés de chaînes carbonées C6 à C20. Puis, l'effet des insaturations, de l'isomérisation et de l'estérification sur l'activité a été évalué.

■ **Acides gras saturés.** Les acides gras sont généralement plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif. L'acide laurique (C12) est l'acide gras le plus actif contre la plupart des bactéries alors que les acides gras de chaînes C8 et C18 sont généralement plus actifs contre les levures et moisissures.

Tableau 5 – Concentrations d'inhibitions minimales (CIM) en mmol/L d'acides gras saturés et insaturés

Acides gras	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Caproïc (6:0)	NI (1)	NI
Capric (8:0)	NI	NI
Caproïc (10:0)	2,90	2,90
Lauric (12:0)	2,49	2,49
Myristic (14:0)	4,37	4,37
Myristoleïc (14:1)	0,44	0,55
Palmitic (16:0)	NI	NI
Palmitoleïc (16:1)	0,98	0,49
Stearic (18:0)	NI	NI
Oleïc (18:1)	NI	NI
Elaidic (18:1)	NI	NI
Linoléïc (18:2)	NI	0,46
Linolénic (18:3)	1,79	NI
Linolélaïdic (18:2)	NI	NI
Arachidonïc (20:4)	NI	NI

(1) NI (*No Increase*) absence d'inhibition aux concentrations testées (1,0 mg/ml ou 30-60 mmol/L).

■ **Acides gras mono- et polyinsaturés.** Les acides gras monoinsaturés sont généralement plus actifs que les acides gras saturés. L'activité optimale a été montrée pour l'acide palmitoléique (C16:1). La présence d'une double liaison augmente l'activité antimicrobienne sans que la position de la liaison sur la chaîne n'ait d'impact. De plus, il faut noter que les isomères (Z) présentent systématiquement une inhibition plus importante que les isomères (E). Enfin, les dérivés acétyléniques sont plus actifs contre les champignons que les dérivés éthyléniques (tableau 5).

■ **Acides gras estérifiés.** L'utilisation des esters méthyliques et éthyliques de ces mêmes acides gras réduit l'activité antimicrobienne, les rendant quasi inactifs. Par contre, les esters d'alcool polyhydrique montrent une activité d'intérêt. Les esters de polyglycérol montrant en particulier d'excellentes propriétés antimicrobiennes, les plus actifs étant les esters de caprate et laurate de polyglycéryle, plus actifs que les acides gras correspondants. Parmi les esters de monoglycérol, les caprate et laurate sont également les plus actifs [25]. Enfin, les essais réalisés sur les sucroesters montrent qu'à l'exception du sucrose laurate, ils sont plus actifs que leurs acides gras correspondants.

De manière générale, il existe une relation structure/activité. Les acides gras utilisés pour estérifier le glycérol déterminent le potentiel biocide de l'ester résultant, à l'exemple de l'ester de monoglycérol laurate. En effet, leur structure spécifique (longueur de chaîne) leur permet de pénétrer et déstabiliser la cellule membranaire des microbes, entraînant la destruction du micro-organisme. Enfin, l'activité antimicrobienne de ces molécules peut être améliorée par la diminution du pH, la présence d'un agent chélatant et/ou antioxydant [24] [26] [27] [28].

Ainsi, le marché de la cosmétique se voit proposer depuis quelques années de nombreuses matières premières composées d'esters de monoglycéryl purs ou en mélange, dont les fonctions premières sont les propriétés émulsifiantes et hydratantes mais dont l'activité antimicrobienne est largement étudiée (par exemple : glycéryl caprate, glycéryl caprylate, glycéryl laurate). Ces matières

premières ne sont donc pas déclarées en conservateurs. Leur grand avantage est qu'elles présentent une activité optimale sur une échelle de pH allant de 4,5 à 7, ce qui est largement compatible avec les contraintes cosmétiques. Leur activité étant généralement meilleure contre les bactéries et levures que contre les moisissures, il peut être avantageux de les combiner à un acide organique [29].

2.1.3 Agents chélatants

Les agents chélatants ou séquestrants sont des molécules qui permettent entre autres de maintenir la transparence d'une formule, de protéger les parfums, de stabiliser les agents épaississants, de prévenir le rancissement, de stabiliser les colorants.

Mais ils ont également la capacité d'augmenter l'efficacité antimicrobienne contre les bactéries à Gram négatif, les levures et moisissures. Ils sont particulièrement efficaces contre *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa* (bactéries à Gram négatif). Les agents chélatants que l'industrie cosmétique utilise sont, par exemple, l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique), le disodium EDTA, l'acide citrique, le citrate de sodium, le citrate de potassium, le trisodium phosphate...

La contribution à l'activité antimicrobienne de l'EDTA a été très étudiée. Cette molécule provoque la dissolution des couches externes des membranes des bactéries à Gram négatif. Cela a pour conséquence la libération de solutés intracellulaires ainsi qu'une solubilisation partielle de l'enveloppe cellulaire des bactéries. Grâce à cette action, la perméabilité des cellules bactériennes est augmentée, ce qui les rend plus vulnérables à l'action d'autres agents de conservation. En effet, la complexité de la structure des membranes cellulaires des bactéries à Gram négatif les rend plus résistantes que celles à Gram positif et souvent difficiles à combattre. Néanmoins, bien que très efficace contre *P. aeruginosa*, l'action de l'EDTA contre cette bactérie n'est pas complète s'il est utilisé comme seul agent antibactérien. Différents travaux ont montré une synergie très importante entre l'EDTA et de nombreux conservateurs usuels en cosmétique contre *P. aeruginosa*. Des études ont également montré le potentiel de l'EDTA pour avoir un effet synergique avec des conservateurs naturels tels que des huiles essentielles ou des extraits végétaux [30] [31] [32] [33] [34] [35].

2.1.4 Alcools

Les alcools aliphatiques les plus utilisés par l'industrie cosmétique sont l'éthanol, l'alcool *n*-propylique et l'alcool isopropylique. Plus la masse moléculaire et la longueur de chaîne augmentent et plus l'efficacité antimicrobienne est accrue. Ainsi, lorsqu'un produit fini contient une concentration en alcool supérieure à 20 % en volume, il est autoconservé et ne nécessite pas d'essais microbiologiques (tableau 6). En effet, l'alcool (agent chaotrope) déstabilise les cellules membranaires, dénature les protéines et tue les micro-organismes lorsqu'il est introduit en quantité suffisante.

Tableau 6 – Concentrations minimales d'éthanol permettant l'inhibition des micro-organismes

Micro-organismes	Concentration volumique d'éthanol (%)
Bactéries	8 à 11
Levures	8 à 11
Moisissures	15 à 18

En concentration inférieure à 20 % en volume, l'alcool contribue à la conservation, ce qui permet de diminuer la quantité de conservateur à introduire, ou il faut alors combiner son effet à d'autres facteurs physico-chimiques tels que le pH (NF EN ISO 29621) [13] [19].

Cependant, il ne faut pas oublier que l'alcool est asséchant et irritant pour les peaux sensibles, ce qui peut limiter son utilisation à des concentrations trop élevées.

2.1.5 Eau

L'eau est une matière première utilisée en très grande quantité dans une grande partie des produits cosmétiques. Plusieurs types d'eau sont utilisés : l'eau adoucie, l'eau déminéralisée et l'eau stérile.

L'eau stérile est à la fois déminéralisée et débarrassée de tous les micro-organismes. Pour cela, on peut utiliser deux grands procédés :

- la distillation (eau distillée) ;
- la filtration sur des membranes de cellulose spéciales de très faible porosité (0,22 µm).

La distillation est un procédé qui consomme beaucoup d'énergie, c'est donc le procédé de filtration stérilisante qui est généralement utilisé.

L'eau étant le milieu de croissance des micro-organismes, plus le produit cosmétique en contient, et plus les micro-organismes pourront proliférer. Ainsi, on comprend aisément que l'absence de micro-organismes dans cette matière première, souvent prédominante en cosmétique, est un facteur clé pour la propreté microbiologique du produit fini. L'utilisation d'une eau stérilisée est donc une alternative qui permet de diminuer la quantité de conservateur à incorporer. En effet, si l'eau contient un certain nombre de micro-organismes au moment du procédé de fabrication, le rôle premier du conservateur sera de les éliminer ou de lutter contre leur prolifération avant même que le consommateur n'ouvre son produit, alors que l'utilisation d'une eau stérile évite cette consommation prématurée.

2.2 Activité de l'eau

Afin de se multiplier, les micro-organismes doivent être en présence d'eau en quantité suffisante. La quantité d'eau nécessaire à cette croissance microbienne correspond à la quantité « d'eau libre » ou « eau disponible » présente dans la formule ([F 1 011] *L'eau et la conservation des aliments*). L'eau libre est communément définie par le terme « activité de l'eau », noté a_w (*Water Activity*) [13].

L'activité de l'eau correspond à la mesure des molécules d'eau non complexées à d'autres molécules en présence dans la formule. Elle est définie par la pression de vapeur de la solution P (solutés dans l'eau) divisé par la pression de vapeur du solvant P_0 (eau pure) à température constante [36] :

$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

Par définition, la pression de vapeur est la pression sous laquelle la formule, placée seule à une température constante, est en équilibre avec sa vapeur. L'activité de l'eau a_w et l'humidité relative d'équilibre HRE (%) sont liées par la relation suivante :

$$HRE (\%) = a_w \cdot 100$$

Ainsi, l'activité de l'eau peut être comprise entre 0,00 (absence totale d'eau) et 1,00 (eau pure) [13] [37].

Tableau 7 – Valeurs d'activité de l'eau minimales permettant la croissance de micro-organismes représentatifs, à 25 °C	
Micro-organismes	a_w minimale
Bactéries	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,97
<i>Escherichia coli</i>	0,95
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
Levures et moisissures	
<i>Aspergillus niger</i>	0,77
<i>Candida albicans</i>	0,87

2.2.1 Activité de l'eau et conservation

Pour se développer de manière optimale, les micro-organismes doivent être en présence d'eau libre en quantité suffisante. Généralement, une diminution de l' a_w entraîne donc un net ralentissement de la croissance microbienne [38]. En effet, afin de survivre et de se développer, les micro-organismes doivent maintenir un état de turgescence à l'intérieur de la cellule, phénomène possible par osmose (phénomène de diffusion à travers une membrane semi perméable, sous l'effet d'un gradient de concentration) avec le milieu extracellulaire. La perte de turgescence aboutit à une augmentation de la phase de latence, une diminution de la croissance et à une réduction du nombre total des cellules microbiennes (NF EN ISO 29621). Ainsi, des produits tels que le talc ou des déodorants sticks, relativement anhydres, ne nécessitent normalement pas que des conservateurs y soient ajoutés. Seulement, les industriels choisissent souvent d'en incorporer afin d'éviter toute contamination inhérente au consommateur. Ce dernier peut en effet ajouter de l'eau au produit par inadvertance [13].

Chaque espèce de micro-organisme étant spécifique, la valeur minimale de a_w pour laquelle la multiplication cellulaire peut avoir lieu varie. Typiquement, les levures et moisissures peuvent se développer pour des a_w plus faibles que les bactéries.

Le tableau 7 donne quelques valeurs minimales d' a_w pour la croissance de micro-organismes spécifiques pour la cosmétique. Il faut cependant noter que ces valeurs peuvent varier en fonction de nombreux facteurs spécifiques à la formulation ou au conditionnement.

Ainsi, la diminution de l' a_w d'une formulation permet une protection contre la multiplication des micro-organismes mais n'entraîne pas une réduction de la population contaminante, comme peuvent le faire des conservateurs. Un produit cosmétique qui serait uniquement conservé selon le facteur « activité de l'eau » doit donc être fabriqué dans des conditions réglementaires strictes et être conditionné dans un packaging approprié [37] [38] [39].

2.2.2 Facteurs ayant une influence sur l'activité de l'eau

D'après la définition de l' a_w , il est aisé de comprendre qu'en diminuant le pourcentage d'eau présent dans une formule, l'activité de l'eau s'en trouve abaissée. Mais en réalité, l'eau est l'ingrédient principal d'une grande majorité de produits cosmétiques. Ce facteur n'est donc pas suffisant pour affecter notablement la valeur de l' a_w .

Des études ont montré que certaines matières premières spécifiques et très utilisées par l'industrie cosmétique ont une influence sur cette valeur. Les humectants, tels que le glycérol, propylène glycol, sorbitol et autres matériaux hydrosolubles diminuent l' a_w et augmentent le stress imposé aux micro-organismes. Les sels inorganiques, les acides et bases utilisés pour ajuster le pH et la viscosité diminuent l' a_w . Les hydrocolloïdes (gomme de xanthane, gomme de guar, etc) utilisés pour augmenter la viscosité ainsi que les alcools utilisés pour améliorer la pénétration de certains ingrédients, diminuer la viscosité ou solubiliser des matières premières permettent d'abaisser la valeur de l' a_w [13] [40].

Peuvent avoir une influence sur la valeur de l' a_w des facteurs tels que :

- l'ordre dans lequel les matières premières sont ajoutées ;
- la méthode et le temps d'agitation ;
- l'intervalle de temps entre chaque ajout d'ingrédient ;
- la température de chaque ingrédient ;
- la présence ou l'absence d'agent de surface [38].

2.2.3 Méthode de mesure

Plusieurs techniques de mesures sont envisageables [37] [38] :

- **mesure de la pression de vapeur** : à l'aide d'un manomètre : cette technique est peu coûteuse et relativement précise. Ses inconvénients sont la fragilité des manomètres ainsi que la plage de pressions mesurables qui reste peu étendue ;

- **hygromètre à cheveu** : cette méthode est basée sur l'hygroscopie des cheveux humains et leur allongement sous l'effet de l'hydratation. Méthode peu coûteuse mais peu sensible ;

- **hygromètre électrique** : c'est la mesure de la résistance électrique d'un sel hygroscopique ou bien la mesure de la capacité d'un condensateur contenant un polymère hygroscopique. Les capteurs mesurent l'humidité relative de l'air environnant l'échantillon (les températures du capteur et de l'échantillon devant être identiques). Techniques simples à mettre en œuvre et de bonne précision ;

- **abaissement du point de congélation** : cette mesure se fait par rapport au point de congélation de l'eau pure. La technique n'est applicable que pour les solutions ;

- **méthode du point de rosée** : la chambre de mesure hermétique où se trouve l'échantillon contient un miroir dont on peut faire varier la température. Ce miroir est refroidi jusqu'à l'apparition de condensation à sa surface. La température d'apparition de la condensation est notée ainsi que celle de la surface de l'échantillon, ces deux valeurs permettant de calculer l' a_w . La méthode est très précise mais onéreuse et nécessitant un savoir-faire ;

- **interpolation graphique** : cette méthode est basée sur le fait que l' a_w est l'humidité à laquelle le produit n'absorbe ni ne rend d'humidité à une température donnée. Des mesures de gain et de perte de poids sont donc effectuées dans une succession de chambre à différentes humidités relatives. Le tracé d'une courbe permet de déterminer l'humidité relative à laquelle il n'y a ni perte, ni gain de poids de l'échantillon, ce qui donne l' a_w [37] [38].

Différents a_w -mètres sont disponibles sur le marché en fonction de l'utilisation envisagée. Très faciles d'utilisation, de nombreux a_w -mètres fonctionnent sur le principe de la technique de l'hygromètre électrique, la mesure étant effectuée à l'aide d'un capteur électrolytique. L'échantillon est placé dans une chambre de mesure étanche. L'eau libre humidifie ou assèche l'air. Cet échange dure jusqu'à l'équilibre puis l'unité de mesure détermine les conditions d'humidité de la chambre de mesure et le logiciel converti cette donnée en a_w .

2.3 pH

Tout micro-organisme possède un pH de croissance optimale (tableau 8). Les pH de croissance se situent généralement entre 5 et 8 [41]. D'une manière générale, les bactéries se développent mieux dans des milieux proches de la neutralité alors que les levures et moisissures sont généralement acido-résistantes avec un pH de croissance optimal se situant entre 4 et 6 mais avec des valeurs extrêmes de 2 à 9 pour les levures et de 2 à 11 pour les moisissures.

Le fonctionnement cellulaire microbien dépend du maintien du pH intracellulaire approprié (pHi). Ainsi, plus le pH du milieu dans lequel se trouvent les cellules s'éloigne du pHi, plus les micro-organismes se trouvent dans des conditions de stress défavorables à tout développement. Il faut cependant noter que les bactéries sont capables de maintenir un pHi plutôt constant, même si le pH extracellulaire fluctue.

Micro-organismes	pH de croissance
Bactéries	4,0 à 9,0
Levures	1,5 à 8,0
Moisissures	5,0 à 11

En effet, les membranes cellulaires ont une perméabilité sélective, permettant ainsi le passage d'ions et de composés spécifiques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, ce qui assure un maintien du pH intracellulaire qui peut être très différent du pH externe (jusque 2 unités de pH). Cependant, cette régulation est limitée dans le temps [57] [60].

Le formulateur possède un large choix d'acides pour équilibrer le pH de ses formules. Il faut noter que les acides forts (par exemple, acide chlorhydrique) ne jouent un rôle que sur le pH externe des cellules microbiennes alors que les acides faibles, plus lipophiles, sont capables de traverser la membrane cellulaire et d'agir sur le pH cytoplasmique (§ 3.1) [29] [42].

2.4 De la fabrication au packaging

2.4.1 Bonnes Pratiques de Fabrication

L'hygiène des locaux est primordiale et facilitée par des surfaces lisses et non absorbantes. Il faut particulièrement veiller aux tuyauteries apparentes et difficiles à atteindre, aux courants d'air, au taux d'humidité ainsi qu'aux eaux stagnantes qui peuvent devenir des sources de contamination. Il est nécessaire de privilégier des matériaux de fabrication en acier inoxydable. Un choix judicieux des tuyauteries et robinetteries à nombres limités de coudes par exemple, limite les risques. Afin d'optimiser les décontaminations, les nettoyages à l'aide de détergents germicides (bactéricides et fongicides) sont à privilégier ([P 3 355] *Analyses en microbiologie. Environnement microbien (air, surfaces, eau)*).

Le personnel opérant doit également porter une tenue adaptée et répondre à des normes d'hygiène strictes afin de véhiculer un minimum d'agents contaminants [36].

Les matières premières utilisées dans la fabrication des produits peuvent contenir des micro-organismes et contaminer le produit *in situ*. L'eau est ainsi la source première de contamination et sa propreté microbiologique doit être scrupuleusement vérifiée. De plus, des produits d'origine végétale tels les poudres végétales, les extraits, les gommes, les alginates... ou encore d'origine tellurique telles les argiles, mais également certains colorants, agents de surface... peuvent être porteurs de germes et contaminer le produit fini. Il est donc nécessaire que les tests de contrôle de la qualité microbiologique de ces ingrédients soient rigoureusement appliqués [36].

2.4.2 Design du packaging

Le choix du packaging est d'une importance cruciale lorsque le souhait du fabricant est d'optimiser la conservation du produit fini. En effet, une fois fabriqué et conditionné, les sources de contaminations majeures d'un produit sont les contacts répétés entre le produit et le doigt du consommateur, l'air et l'eau. De même, une température de conservation élevée (par exemple, dans les salles de bains) peut favoriser la multiplication des germes. La contamination peut avoir lieu alors que le consommateur prélève le produit dans le tube ou le pot, packaging nécessitant un contact direct du produit avec l'air et avec le doigt de l'utilisateur, chargé de micro-organismes.



Figure 3 - Exemple de flacon *airless*

Ainsi, des packagings spécifiques ont été élaborés afin de limiter au maximum la pénétration des micro-organismes dans le contenant.

De nombreux packaging permettent de protéger avec plus ou moins d'efficacité le produit fini de la contamination microbienne avant et après ouverture.

Les *pompes airless* (figure 3) ou encore certains dispositifs de fermetures spécifiques développés par des laboratoires dermatologiques comme *Avène®*, sont des solutions proposées aux industriels et qui ont pour but de limiter, voire d'empêcher tout contact entre le produit et le consommateur et entre le produit et l'environnement extérieur au packaging ([J 2 285] - *Conservateurs pour les cosmétiques. Antioxydants et anti-UV*) [40] [42] [43].

Les *packagings monodoses* sont une autre solution à la portée de l'industriel (figure 4). En effet, dans le cadre de l'utilisation unique, il n'y a pas de contamination extérieure du produit. Ainsi, le formulateur peut diminuer, voire supprimer la quantité de conservateur à incorporer dans le produit. En effet, des fabricants de contenants monodoses proposent des packagings ayant subi une étape de stérilisation. Différents processus de stérilisation sont envisageables :

- stérilisation ETO : gaz d'oxyde d'éthylène aux propriétés bactéricides, fongicides, sporicides et virucides. Il est mélangé à de l'azote ou du dioxyde de carbone. Il s'infiltre dans l'emballage et au cœur du produit, détruisant ainsi les micro-organismes ;
- stérilisation aux rayons gamma ;
- stérilisation aux rayons bêta.

Bien que l'option de la monodose stérile soit séduisante pour celui qui souhaite éliminer complètement les conservateurs, l'un

Ce document a été délivré pour le compte de 7200097598 - éditions ti // nc AUTEURS // 217_108.84.129



Figure 4 – Exemple de tubes monodoses stériles (doc. Lameplast group)

des inconvénients majeurs est la quantité de packagings, qui se trouve décuplée pour un volume de produit donné par rapport aux multidoses. Or, dans une société où les contraintes de développement durable sont de plus en plus exigeantes, l'usage unique semble sortir de ces considérations.

2.4.3 Matériaux

Les matériaux constituant le packaging ont un rôle primordial dans l'optimisation de la conservation d'un produit cosmétique. En effet, certains conservateurs sont par exemple sensibles à la lumière (alcool benzylique, sorbate de potassium, acide sorbique...). Les formules contenant ce type de conservateurs doivent être conditionnées dans des packagings tenant compte de ce facteur.

Certains plastifiants tels que les phtalates d'alkyles présents en grande quantité dans le Chlorure de PolyVinyle souple (PVC) sont connus pour migrer lentement du packaging vers la formule. Ils sont alors capables d'inactiver les conservateurs phénoliques. Les polyuréthanes peuvent, quant à eux, diminuer l'activité des conservateurs phénoliques et des ammoniums quaternaires. Il est également connu que l'alcool benzylique interagit avec le polyéthylène (PE) et le polystyrène (PS). Les acides sorbique et déhydroacétique sont instables dans des contenants en verre brun, en PVC et en polypropylène (PP) [44].

Alors que la tendance actuelle dans la conception des packagings est d'utiliser des matériaux d'origine naturelle et biodégradables ou recyclables, leur impact sur la conservation demeure préoccupant. En effet, les matériaux dérivés de fibres organiques ou les polymères d'origine naturelle constituant certains de ces contenants peuvent avoir un impact important sur les interactions packaging/produit et entraîner l'inactivation d'une partie du système conservateur.

Il est donc nécessaire que le fabricant prenne en compte la nature des conservateurs et du packaging lors de l'optimisation de la conservation de produit fini [45].

3. Conservateurs de synthèse

3.1 Acide sorbique, formol et autres conservateurs de synthèse

Les conservateurs autorisés sont tous d'origine synthétique. Ils présentent des modes d'action, activités, propriétés physico-chimiques très variables.

Les **acides organiques** sont une des classes de conservateurs très utilisés. Ils possèdent un double effet antimicrobien. Tout d'abord par l'acidification du milieu (§ 2.3), mais également par un effet

spécifique de l'acide utilisé. En effet, les acides organiques faibles peuvent agir pour inhiber les micro-organismes. Ils sont lipophiles, donc capables de traverser la membrane des micro-organismes et ainsi de pouvoir modifier le pH cytoplasmique. C'est la forme non dissociée ou protonée (COOH) qui présente un effet spécifique sur les micro-organismes. En effet, une fois la membrane cellulaire traversée, l'acide se dissocie, ce qui a pour effet de changer le pH intracellulaire. Les micro-organismes doivent alors évacuer les protons et absorber des ions sodium pour maintenir le pH physiologique de la cellule. Ce procédé consomme de l'énergie à la bactérie et diminue donc sa vitesse de reproduction. Ce procédé abaisse également le pH en périphérie de la cellule, favorisant ainsi la formation de la forme protonée de l'acide qui est l'espèce active. L'aboutissement de ce procédé est la mort du micro-organisme. Ce sont donc ces acides qu'il faut privilégier dans le cas d'une formule dont on veut optimiser l'autoconservation. Les acides organiques sont pour la plupart des acides faibles et sont donc à privilégier. Ainsi, plus le pH est acide, plus la concentration sous forme protonée de l'acide est importante et plus son efficacité est élevée. Donc, pour un pH donné, l'acide est d'autant plus actif qu'il possède un pKa faible. Mais il faut également tenir compte de la solubilité de l'acide qui doit être suffisante en phase aqueuse. De plus, l'acide doit être disponible dans sa forme protonée au pH de la formule [29] [42]. Le tableau 9 présente les principaux acides organiques utilisés comme conservateurs, leurs propriétés physico-chimiques et leurs particularités. Le référentiel Ecocart autorise ainsi l'utilisation de différents acides organiques et leurs sels en tant que conservateurs de synthèse (figure 1) dans les produits finis cosmétiques :

- acide benzoïque, ses sels et esters ;
- alcool benzylique ;
- acide formique et son sel de sodium ;
- acide propionique et ses sels ;
- acide salicylique et ses sels ;
- acide sorbique et ses sels ;
- acide déhydroacétique (DHA) [46].

Les **acides citrique et lactique** sont également très utilisés en cosmétique pour ajuster le pH. L'acide citrique agit plus en tant qu'agent chélatant et présente donc une activité antibactérienne. L'acide lactique est un agent bactériostatique et permet également de diminuer l' a_w .

Les **acides lévulinique et anisique** sont également deux formes actives contre les micro-organismes et qui figurent comme parfums dans la liste des ingrédients, conformément à leur fonction première [29] [42].

3.2 Cas des parabènes

Les parabènes sont des conservateurs à large spectre antimicrobien. Ils sont utilisés depuis 1920 et sont présents dans de nombreux produits que nous consommons quotidiennement : aliments, produits cosmétiques, médicaments. Les concentrations et types de parabènes utilisés sont différents selon les produits.

Ils existent également à l'état naturel dans de nombreux aliments comme les fruits rouges (mûres, fraises, cassis...), l'oignon ou encore la carotte [47] [48] [49] [50] [51].

En cosmétique, ils sont autorisés aux concentrations de 0,4 % (acide) pour les esters et 0,5 % (acide) pour les mélanges d'esters mais sont employés à très faibles concentrations. Ils sont hydrolysables par l'organisme et présentent une bonne tolérance.

Les plus utilisés, sous leur forme sodée ou non sodée, sont :

- le méthyl parabène ;
- l'éthyl parabène ;
- le propyl parabène ;
- le butyl parabène.

Ils sont généralement vendus sous forme de mélanges qui contiennent trois ou quatre parabènes différents, pouvant parfois être associés à un alcool (*Nipastat*®, *Phenonip*®) ou à des précurseurs du formaldéhyde ou des isothiazolinones.

Tableau 9 – Structures et propriétés physico-chimiques des principaux acides organiques utilisés en cosmétiques

Acide	N° CAS	Masse molaire des acides (g/mol)	pKa	Aspect	Solubilité dans l'eau	Activité	Toxicité
Acide formique et ses sels	Acide : 64-18-6	46,03	3,75	Acide : liquide	Miscible	Actif contre bactéries, levures et moisissures	Peu toxique DJA : 3 mg/kg
Acide propionique et ses sels	Acide : 79-09-4 Sel de sodium : 137-40-6	74,08	4,87	Acide : liquide Sels : poudres	Acide et sels solubles	Surtout actif contre les moisissures	Non toxique aux doses utilisées
Acide sorbique et ses sels	Acide 110-44-1 Sel de potassium : 590-00-1	112,13	4,76	Acide : cristallin Sels : poudres	Acide : très peu soluble (0,16 g/L) Sels : solubles utilisés principalement pour les corps gras	Essentiellement antifongique, actifs également contre les levures et certaines bactéries Gram(-)	DJA : 25 mg/kg
Acide benzoïque et ses sels	Acide : 65-85-0 Sel de sodium : 532-32-1	122,12	4,2	Acide et sels : poudres	Acide : très peu soluble (0,3 g/L) Sels : solubles (56 g/L pour le sel de sodium)	Surtout efficace contre les levures, dans une moindre mesure contre les moisissures	Problème de toxicité DJA : 5 mg/kg
Acide salicylique et ses sels	Acide : 69-72-7	138,12	3,0	Acide : poudre cristalline	Acide : très peu soluble (0,2 g/L) Sels : meilleure solubilité	Meilleure activité contre Gram(+) et certaines Gram(-) Bonne activité antifongique	
Acide déhydro-acétique et ses sels	Acide : 520-45-6	168,15	5,27	Acide et sels : poudres	Acide : peu soluble Sels : solubles (33 g/L)	Surtout efficace contre les levures et moisissures	

DJA : dose journalière admise, par kg de poids corporel et par jour.

3.2.1 Structures et modes d'actions

Les parabènes sont des composés simples, constitués d'un cycle aromatique, d'une fonction hydroxy et ester en position para. Leur nom vient de la compression du nom PARAhydroxyBENzoatE.

Le tableau 10 présente la structure et les propriétés physico-chimiques des principaux parabènes utilisés en cosmétique.

Les produits cosmétiques sous forme liquide ou gel présentent généralement un pH compris entre 5 et 7. Avec un pKa proche de 8, les parabènes se présentent sous leur forme protonée dans cette gamme de pH.

Mode d'action des parabènes

Les microorganismes procaryotes possèdent une membrane plasmique qui contient trois types de canaux mécanosensibles (MscM, MscS et MscL) impliqués dans la régulation de la pression osmotique de l'organisme.

Les parabènes auraient une action sur les canaux MscL et MscS et les activeraient. Cela conduirait à une ouverture anormale de ces canaux pour réguler la pression osmotique et à l'expulsion d'une partie du contenu cytoplasmique, indispensable à la survie de l'organisme et à la lyse cellulaire.

Cependant, ce mode d'action n'est pas encore complètement admis et d'autres proposent des mécanismes d'action différents, tous centrés autour de la lyse cellulaire.

Ils sont très efficaces contre les champignons et les bactéries. Concernant ces dernières, ils sont plus actifs contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*...) que contre celles à Gram négatif (*Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*).

Lorsque la longueur de leur chaîne alkyle augmente, leurs propriétés antibactériennes augmentent, mais leur solubilité en phase aqueuse diminue. Cette dernière phase étant la plus sensible aux attaques microbiennes, il est alors fréquent d'utiliser les plus solubles dans l'eau, bien que moins actifs.

Cette différence d'activité/solubilité selon la longueur de la chaîne explique l'utilisation de la combinaison de plusieurs parabènes.

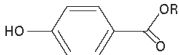
Les parabènes sont bactéricides. Leur mécanisme d'action (cf. encadré) sur les micro-organismes est encore mal connu. Ils agissent contre un grand nombre de micro-organismes au niveau de voies métaboliques clés [52].

Ils agiraient en se fixant sur la membrane cytoplasmique des micro-organismes entraînant une rupture puis une destruction de cette dernière. L'organisme se viderait alors d'une partie de son contenu, ce qui conduirait à sa mort.

Les parabènes présentent de très nombreux avantages, ce qui explique qu'ils représentaient jusqu'il y a peu la grande majorité des conservateurs utilisés par l'industrie cosmétique. En effet, leurs intérêts sont nombreux :

- une large activité ;
- un faible coût ;
- une bonne tolérance (peu irritants et sensibilisants) ;
- une faible toxicité aiguë ;

Tableau 10 – Structures et propriétés physico-chimiques des principaux parabènes utilisés en cosmétique

Structure générale.....				
R	Méthyl	Éthyl	Propyl	Butyl
N° CAS.....	99-76-3	120-47-8	94-13-3	94-26-8
N° EINECS.....	202-785-7	204-399-4	202-307-7	202-318-7
Masse molaire..... (g/mol)	152,05	166,6	180,08	94,0
Température de fusion..... (°C)	131	116 à 118	96 à 98	68 à 69
Température d'ébullition..... (°C)	270 à 280	397 à 298	Dégradation	156 à 157
Solubilité dans l'eau à 25 °C..... (%)	0,25	0,17	0,05	0,02
pKa	8,17	8,22	8,35	8,37
Apparence (à 25 °C)	Cristaux sans couleurs, odeur, ni goût			

- des propriétés organoleptiques parfaitement adaptées à une utilisation en cosmétique (inodores, insipides et incolores) ;
- une excellente stabilité thermique ;
- une bonne biodégradabilité ;
- des propriétés photosensibilisantes et phototoxiques très faibles...

Néanmoins, ils présentent une très faible activité contre les bactéries à Gram négatif, principalement celles du genre *Pseudomonas*. De plus, leur activité peut être affectée par la formule du produit (pH, pigments, concentration en huile...).

3.2.2 Polémique

Par définition, tous les conservateurs sont biologiquement actifs. Donc, tout conservateur peut conduire potentiellement à des problèmes de sécurité/toxicité. Ainsi, les parabènes sont classés « excipients à effet notoire » pour leur risque allergisant.

Mais la polémique sur les parabènes a réellement commencé en 2004 suite à la publication d'une étude britannique. Dans cette étude menée par Philippa Dardre de l'Université de Reading, du méthyl parabène avait été retrouvé dans des biopsies de tumeurs du sein [53]. Cela démontrait qu'au moins une partie des parabènes pouvait être absorbée et retenue dans les tissus du corps humain sans être métabolisée. Bien qu'elle présentait plusieurs faiblesses méthodologiques (doses concernées très supérieures à celles utilisées en cosmétique, nombre de sujets peu élevé...), dont certaines reconnues par l'auteur elle-même, les autorités et le grand public n'ont pas tardé à réagir.

L'AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des aliments et des produits de santé) a alors réuni un groupe d'experts pour statuer sur cette famille de produits. En juin 2005, le bulletin des vigilances de l'AFSSAPS indiquait que le groupe d'experts a conclu que les parabènes « sont peu toxiques et bien tolérés, bien que des réactions allergiques puissent survenir chez certaines personnes ». Cependant, ce groupe de scientifiques a tout de même mis en évidence que ces conservateurs pouvaient être à l'origine d'une faible perturbation du système endocrinien. Mais les données recueillies ne permettaient pas de mesurer l'ampleur du risque, notamment cancérigène, pouvant être associé à la perturbation endocrinienne.

Une étude japonaise a également mis en évidence des effets toxiques sur la reproduction du rat. Ce risque était essentiellement observé avec le propyl parabène mais pas avec le méthyl parabène [54].

Au niveau de la communauté européenne, l'avis de 2008 du SCCP (Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs, SCCP/1183/08) a conclu à une utilisation sûre pour les méthyl et éthyl parabènes et a demandé des informations supplémentaires sur la pénétration, le métabolisme et la pharmacocinétique pour les propyl et butyl parabènes.

En 2009, l'AFSSAPS a estimé qu'il n'existait pas de données remettant en cause le rapport entre le bénéfique et les risques de ces conservateurs très efficaces et peu allergisants. Néanmoins, la toxicité à long terme ainsi que l'effet « mélange » d'une exposition à plusieurs composés ne sont pas connus.

Pour des produits aussi largement utilisés que les parabènes, le principe de précaution est dorénavant appliqué. En effet, même si aucune étude scientifiquement fondée n'a pu démontrer jusqu'à présent un réel danger [55], il n'y a que très peu de recul sur les effets des parabènes à long terme.

Ainsi, à la surprise générale, l'Assemblée nationale a adopté en première lecture, le 3 mai 2011, une proposition de loi qui interdit l'utilisation des phtalates et des parabènes : « La fabrication, l'importation, la vente ou l'offre de produit contenant des phtalates, des parabènes ou des alkylphénols sont interdites ». Même si ce texte doit encore être voté par le Sénat pour être appliqué, il n'en a pas moins suscité une vive inquiétude dans le secteur de l'industrie cosmétique.

3.2.3 Quel avenir pour les parabènes

Bien que les industriels affirment la totale innocuité des parabènes aux concentrations présentes dans les produits, leur avenir comme conservateurs en cosmétique semble bien sombre. Ce n'est pas tant la dose de parabènes dans une crème qui est en cause mais plutôt leur accumulation dans l'organisme à long terme. Cela a conduit à un rejet en masse de ces produits par les consommateurs. De plus, pour le législateur, il existe des produits de substitution aux parabènes. Il en est clairement fait référence dans les échanges de l'Assemblée nationale, qui voit dans les conservateurs naturels (« utilisés notamment dans les cosmétiques « BIO ») de bons substituts.

En réalité, même si la recherche est active dans ce domaine, il ne semble pas possible de proposer aujourd'hui des alternatives chimiques ayant une innocuité plus élevée et une activité conservatrice égale aux parabènes.

4. Conservateurs naturels

4.1 Définitions et modes d'obtention

Parmi les conservateurs naturels, on peut distinguer les huiles essentielles, les extraits et certaines huiles végétales. Ils sont tous obtenus à partir de matières premières végétales mais selon des procédés distincts plus ou moins techniques et innovants définissant le type de molécules extraites (volatiles ou non par exemple), ainsi que la galénique finale (liquide, poudre, pâte...). De nombreux végétaux possédant une activité antimicrobienne, on retrouve cette activité dans les extraits, mais la quantité d'actifs est souvent moindre. Aussi, avant d'en envisager une utilisation optimale dans un produit fini, il est souvent nécessaire de procéder à des étapes d'enrichissement, voire d'isolement de molécules actives. De plus, une décoloration ainsi que l'ajout d'un support solide (type maltodextrine ou silice) sont souvent à prévoir pour optimiser l'utilisation du produit en tant que matière première cosmétique aisément formulable.

Pour plus de détails sur les procédés d'obtention, se référer au dossier [J 2 285] *Conservateurs pour les cosmétiques. Antioxydants et anti-UV*.

4.2 Huiles essentielles

Les huiles essentielles étant connues et utilisées depuis des centaines d'années pour leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques, les industriels de la cosmétique tendent à les utiliser pour substituer les conservateurs de synthèse.

Ces propriétés multiples sont liées à la grande complexité des huiles essentielles, puisqu'elles peuvent être constituées de plusieurs dizaines, voire centaines de constituants ([K 345] *Huiles essentielles*). Les molécules responsables de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sont principalement des hydrocarbures (terpènes), des alcools, particulièrement des phénols, des esters, des acides, des aldéhydes ou encore des cétones. Bien souvent, l'activité antimicrobienne d'une plante est directement liée à la composition de son huile essentielle, puisque celle-ci concentre généralement une grande majorité d'actifs. Les groupements fonctionnels de type phénoliques, cétoniques ou aldéhydiques sont principalement responsables de ces activités. Plus particulièrement, les composés ayant la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols : thymol, carvacrol et eugénol. Des composés tels que les acides cinnamique et caféique présentent également une activité antimicrobienne marquée. On trouve par exemple de l'acide caféique dans l'huile essentielle de thym [63].

Le tableau 11 présente quelques exemples d'huiles essentielles pouvant être utilisées pour leurs propriétés conservatrices.

L'utilisation des huiles essentielles pour leurs propriétés conservatrices pose cependant un certain nombre de problèmes tels qu'une odeur marquée, parfois problématique pour une utilisation cosmétique, ou la présence d'allergènes, sources de réactions cutanées, voire d'allergies de contact.

4.3 Extraits naturels

De nombreux extraits végétaux sont connus pour leurs propriétés conservatrices et sont employés à de telles fins. Pourtant, seuls les 56 conservateurs figurant sur la liste positive de l'annexe V de la Directive cosmétique européenne peuvent être utilisés en tant que tels, les autres ne pouvant pas être appelés « conservateurs », bien que possédant de telles propriétés. C'est pourquoi, de plus en

plus, on voit apparaître sur le marché des produits cosmétiques dont le packaging présente la mention « sans conservateur ». Cela peut rassurer le consommateur, certes, puisqu'il entend de toutes parts que les conservateurs de synthèse sont néfastes et dangereux, et peut donc l'induire en erreur. Que cache réellement cette mention ? En fait, hormis les exceptions présentées dans le paragraphe 5, réellement dispensés de conservateurs grâce à de judicieux systèmes de fabrication, tous les produits cosmétiques contiennent des conservateurs. Simplement, la mention « sans conservateur » signifie que les conservateurs présents dans le produit ne figurent pas sur la liste positive précitée. Souvent, ces produits contiennent alors des extraits de plantes dont l'efficacité antimicrobienne a été étudiée et démontrée. Il est indispensable que la non-toxicité de ces substances aux propriétés conservatrices soit également démontrée, et que les tests ayant permis de définir ces extraits comme conservateurs soient fiables. C'est pourquoi cette notion de « sans conservateur » peut avoir un caractère très versatile.

Ainsi, un certain nombre d'extraits végétaux ont été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes et sont aujourd'hui présents sur le marché de la cosmétique.

L'extrait de thé vert contient par exemple des polyphénols poly-fonctionnels présentant en particulier une activité antimicrobienne et antioxydante, intéressante pour la conservation cosmétique.

L'extrait de lichen présente également une activité antibactérienne déjà connue et exploitée dans l'Égypte ancienne. Les molécules actives de cet extrait sont les acides usnique et vulpinique [69] [70] [71].

Les extraits naturels présentent, comme les huiles essentielles, une grande complexité chimique, et souvent leur composition n'est pas bien connue. De ce fait, leur potentiel en termes de valorisation est considérable. En revanche, en raison de la variété des molécules présentes, les extraits sont de polarité très large. Ils présentent donc souvent des problèmes de solubilité, mais également de couleur et d'odeur. Leur forme brute n'est par conséquent pas adaptée à toutes les formules cosmétiques, et il est indispensable d'optimiser leur galénique.

Le tableau 12 présente quelques exemples d'extraits naturels utilisés comme conservateurs, ainsi que leurs conditions d'utilisation.

4.4 Mode d'action des conservateurs naturels

En ce qui concerne leur activité antimicrobienne, les huiles essentielles et les extraits peuvent agir selon deux modes en fonction des micro-organismes concernés et du type de molécules qu'elles contiennent. Elles peuvent :

- soit inhiber la multiplication cellulaire microbienne et ainsi avoir un effet microbiostatique ;
- soit entraîner la mort des micro-organismes et ainsi avoir un effet microbicide.

De manière générale, le mode d'action précis des extraits naturels reste irrésolu, mais il semblerait que, dans le cas des bactéries, les molécules actives telles que les composés phénoliques attaquent la paroi, provoquant une perte du matériel cellulaire par augmentation de la perméabilité. L'intérieur de la cellule serait alors acidifié, entraînant la perte d'ions et la réduction du potentiel membranaire, puis la mort de la cellule des suites de la destruction du matériel génétique [83] [84]. Le système enzymatique bactérien peut également être affecté. Le mode d'action des extraits naturels reste très peu décrit, mais leur activité peut être corrélée avec la présence de certains composés.

Tableau 11 – Exemple d’huiles essentielles aux propriétés conservatrices

Huile essentielle	Nom botanique de la plante	Activité	Composés majoritaires (dont allergènes)	Avantages/Inconvénients	Références
Lavande	<i>Lavandula officinalis</i> L.	Antibactérienne contre Gram(+) Antifongique	Linalyl acétate Linalol	Incorporation en tant qu’actif également	[56] [57] [58] [59]
Arbre à thé	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Antibactérienne contre Gram(+) Antifongique	Terpinen-4-ol γ-Terpinène α-terpinène	Odeur peu adaptée à un usage cosmétique	[56] [59]
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	Antibactérienne contre Gram(+) Antifongique	Thymol Carvacrol	Odeur peu adaptée à un usage cosmétique	[56] [58] [61] [62] [63] [80]
Menthe	<i>Mentha piperata</i>	Antibactérienne contre Gram(+) Antifongique	Menthol		[56] [63]
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Antibactérienne contre Gram(+) et parfois Gram(-) Antifongique	Pipéritone α-Pinène Limonène, 1,8-Cinéole	Odeur peu adaptée à un usage cosmétique	[10] [56] [57] [58] [60] [61] [63]
Genévrier	<i>Juniperus communis</i> L.	Antibactérienne	α-Pinène Limonène	Odeur peu adaptée à un usage cosmétique	[57] [64]
Citron	<i>Citrus lemon</i>	Antibactérienne contre Gram(+) et Gram(-) Antifongique	Limonène		[60]
Citronnelle	<i>Cymbopogon citratus</i>	Antibactérienne contre Gram(+) et Gram(-) Antifongique	Néral Géranial	Pro-oxydant	[56] [60]
Origan	<i>Origanum vulgare</i>	Antibactérienne contre Gram(+) et Gram (-) Antifongique	Carvacrol Thymol p-Cymène γ-Terpinène Carvacrol		[56] [58] [10]
Bois d’inde	<i>Pimenta racemosa</i>	Antibactérienne contre Gram(+) et Gram(-) Antifongique	Eugénol		[56] [58]
Ylang ylang	<i>Cananga odorata</i>	Antibactérienne contre Gram(+) et parfois Gram(-) Antifongique	Linalol β-Caryophyllène γ-Muuroène α-(E, E)-Farnésène		[56] [60]
Petitgrain	<i>Citrus aurantium</i>	Antibactérienne contre Gram(+) Antifongique	Limonène		[56] [65] [66]
Anis	<i>Pimpinella anisum</i>	Antibactérienne contre Gram(+) Antifongique	(E)-Anéthole		[56] [60] [62] [67]
Niaouli	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Antibactérienne contre Gram(+) Antifongique	1,8-Cinéole Viridiflorol		[56] [68]

La composition des huiles essentielles dépend de plusieurs paramètres : mode d’extraction, qualité, origine, etc.
Les composés reconnus comme allergènes par le SCCP (*Scientific Committee on Consumer Products*) sont en italique.

Tableau 12 – Exemple d’extraits conservateurs utilisés par l’industrie cosmétique

Extrait/Mélange d’extraits	Nom commercial	Fournisseur(s)	Préconisations d’utilisation	Actifs	Activité	Références
<i>Asparagopsis armata</i> (algue rouge)	Ysaline® 100 INCI : <i>asparagopsis armata</i> extract	Algues & Mer	Soluble dans l’eau à 0,2 à 1 % en masse	Composés organiques halogénés	Antimicrobienne (<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>E. gergiviae</i> , <i>S. aureus</i>)	[76] [77]
<i>Podocarpus totara</i> (bois de cœur recyclé)	Totaro™ INCI : <i>podocarpus totara wood</i> extract	Essentially NZ	Doit être associé à un antifongique 0,1 %	Totarol (diterpène aromatique C ₂₀ H ₃₀ O)	Antimicrobienne (<i>S. aureus</i>) Antioxydante	[74] [75] [78]
<i>Citrus grandis</i> (pamplemousse), extrait de pépins)	P50 VTF-0373 INCI : <i>citrus grandis seed</i> extract	Chemie Research & Manufacturing Vege Tech Bio-Botanica	0,1 à 1 % (usuellement 0,6 %) Phase aqueuse (sans xanthane)	Flavonoïdes polyphénoliques	Antimicrobienne Antifongique	[72] [73] [78]
<i>Lonicera japonica</i> – Extrait de chèvrefeuille du Japon (bourgeons)	Plantservative WSr, WMr INCI : <i>Lonicera Caprifolium</i> extract, <i>Lonicera Japonica</i> extract	Campo	Liposoluble 2,5 à 3,5 %	Lonicérine (alcaloïde indolique) Acide p-hydroxybenzoïque (parabène) naturel	Antimicrobienne	[78] [81]
<i>Viola Tricolor</i> – Extrait de pensées sauvage	INCI : <i>viola tricolor</i> extract	Alban Müller International		Flavonoïdes Saponines Acide salicylique Vitamine E	Antimicrobienne	[79]
<i>Pimpinella anisum</i> – Extrait d’anis	INCI : <i>pimpinella anisum</i> extract	Active Concepts LLC Alban Müller		Acide p-anisique	Antimicrobienne	[80]
Extrait de lichen (Barbe de Jupiter)	<i>Lichen Herbsaso</i> ® Extract PG	Cosmetochem International	0,3 à 2,0 %	Acides usnique et vulpinique	Antimicrobienne	[69] [78]
<i>Wasabia japonica</i> – Extrait de wasabi (ferment de rhizome)	ACB Wasabi INCI : <i>Lactobacillus/Wasabia Japonica</i> Root Ferment Extract	Active Concepts LLC	1 à 5 %	Isothiocyanate d’allyle	Antimicrobienne	[78] [82]

INCI : International Nomenclature of Cosmetic Ingredients.

4.5 Cas des cosmétiques biologiques

Dans le contexte socio-économique actuel où le retour au naturel est une visée commune aux consommateurs et industriels, la cosmétique naturelle et « bio » connaît un bel essor et ce nouveau marché ne cesse de croître.

Selon le code de déontologie des allégations cosmétiques françaises, un produit cosmétique naturel doit contenir « un minimum de 95 % d’ingrédients définis comme « naturels » ou « d’origine naturelle », selon les règles en usage ». Un produit cosmétique bio, quant à lui, doit remplir au minimum une des conditions suivantes :

- contenir 100 % d’ingrédients certifiés issus de l’agriculture biologique ;
- être certifié biologique par un organisme certificateur qui suit un cahier des charges ;
- avoir été élaboré selon un cahier des charges publié ayant un niveau d’exigence, en termes de composition et de teneurs en ingrédients certifiés issus de l’agriculture biologique, équivalent à celui requis par les organismes certificateurs.

Suivant le cahier des charges rempli, un cosmétique pourra se voir attribuer un **label adapté et spécifique tels qu’ECOCERT ou COSMOS** par exemple.

Néanmoins, les nombreux labels existants sont souvent sources de confusion pour le consommateur et bien rares sont les produits contenant réellement 100 % d'ingrédients issus de l'agriculture biologique [85] [86].

5. Autres solutions

5.1 En formulation

Une alternative à la conservation par voie chimique est l'utilisation de systèmes enzymatiques. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques. Les enzymes qui participent aux mécanismes de défense des organismes vivants sont typiquement des enzymes lytiques ou des enzymes oxydoréductases.

Les **enzymes lytiques**, telles que les lysosomes et les chitinases, peuvent attaquer les parois cellulaires des micro-organismes, ce qui leur confère une activité antimicrobienne.

Les **enzymes oxydoréductases**, à l'exemple de la **lactoperoxydase**, présentent une activité antimicrobienne. Le potentiel antimicrobien de cette enzyme s'exprime uniquement en présence de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et d'anions oxydables (substrats) tels que des ions thiocyanates SCN^- ou iodures I^- par exemple pour former des hypothiocyanates et hypiodites. Cette enzyme est très utilisée par l'industrie laitière et suffit à conserver ces produits à péremption rapide. Des études sont menées afin d'optimiser leur potentiel antimicrobien dans le cas de l'industrie cosmétique. Pour activer la lactoperoxydase, la présence d'eau oxygénée (H_2O_2) est indispensable. Seulement, incorporée en grande quantité dans un produit cosmétique, elle pose des problèmes de stabilité (oxydation par exemple). Ainsi, un système conservateur à base d'enzyme a été optimisé pour la cosmétique. Celui-ci contient, en plus de la lactoperoxydase, du glucose oxydase, du glucose et de l'iodure de potassium, ainsi que du thiocyanate de potassium. Le glucose oxydase réagit avec le dioxygène et le glucose pour former du H_2O_2 qui réagit lui-même avec la lactoperoxydase et les anions présents pour former le complexe antimicrobien. Ce système enzymatique est breveté (*Biovert*[®], Arch Chemicals, LP) [87] [88].

Les avantages du système enzymatique sont les suivants :

- l'enzyme n'est pas consommée après avoir agi contre la cellule cible. Une enzyme reste active tant qu'elle se trouve en présence de catalyseur ;
- le principe est basé sur les systèmes de défenses immunitaires naturelles.

Ses inconvénients sont le prix (environ 20 fois plus cher qu'un système conservateur de synthèse classique), la difficulté de production à grande échelle et une sensibilité à la chaleur. Les produits conservés *via* un complexe enzymatique ne doivent pas être exposés à des températures au-delà de 35 °C pendant une durée prolongée au cours de la production ou pendant le stockage [89].

5.2 Stérilisation

Le principe de la **stérilisation à ultra haute température (UHT)** est une technique brevetée par les laboratoires Dermatherm [90]. Déjà très utilisée en agroalimentaire, notamment pour le lait, la stérilisation se fait par un passage rapide à haute température (135 °C pendant 3 à 7 s) suivi d'un refroidissement immédiat. La quasi-totalité des micro-organismes est ainsi éliminée et les actifs sensibles non affectés. Le procédé de stérilisation est effectué directement après production sur les produits non conditionnés (vracs) avant le conditionnement en bloc stérile dans des packagings de type *airless* munis en plus d'un bouchon antimicrobien.

Une technique de stérilisation plus récente est l'utilisation du **CO₂ supercritique**. En effet, à pression atmosphérique, le CO₂ inhibe la croissance microbienne, mais le phénomène est réversi-

ble. Par contre, lorsque la pression augmente, l'effet du CO₂ sur les micro-organismes augmente et devient irréversible. L'effet du CO₂ pressurisé sur les micro-organismes dépend de plusieurs paramètres tels que la nature des micro-organismes, l'activité de l'eau du milieu, le pH, la température. Le mode d'action du CO₂ n'est pas encore clairement défini. Il a été montré que lors d'un traitement au CO₂ supercritique, la mort cellulaire a lieu pendant la dépressurisation. En effet, le CO₂ supercritique a la capacité de diffuser dans les cellules microbiennes [91]. Ainsi, plusieurs hypothèses ont été émises sur le mode d'action du CO₂ :

- la nature lipophile du CO₂ supercritique solubilise les bicouches de phospholipides de la membrane cellulaire, augmentant fortement la perméabilité de celle-ci ;
- la cellule se rompt à cause de la pression interne ;
- des enzymes nécessaires à la métabolisation des cellules sont inactivées ;
- le pH cytoplasmique est diminué par accumulation du CO₂ dans le cytoplasme interne des cellules, formation de protons en grande quantité et incapacité des cellules à tout expulser pour réguler le pH ;
- le bicarbonate formé est converti en carbonate, entraînant une précipitation intracellulaire de sels.

Ainsi, un certain nombre de points restent à élucider sur la méthode de stérilisation au CO₂ supercritique, néanmoins, ses excellentes propriétés microbicides ainsi que le respect environnemental de la technique laissent présager un intérêt croissant pour cette alternative [92] [93] [94] [95] [96].

5.3 Autres solutions

Comme pour le pH, il existe une plage de température optimale à la survie et à la croissance microbienne. Ainsi, à basse température, la croissance se trouve nettement ralentie et au-delà de la température optimale, les micro-organismes sont tués. En fonction de la sensibilité des produits formulés, le **facteur température** peut donc permettre le contrôle des micro-organismes, soit en appliquant une haute température pendant une courte période de temps, soit en maintenant le produit pendant un intervalle de temps prolongé à une température supérieure à la température optimale (NF EN ISO 29621).

6. Conclusions et perspectives

Malgré l'essor de la chimie de synthèse dans des domaines comme l'industrie pharmaceutique, la tendance actuelle du marché de la cosmétique est aux produits naturels : sans colorants, sans conservateurs, sans parfum, conditionnés dans des flacons recyclables ou biodégradables. Parmi toutes ces contraintes, la suppression des conservateurs chimiques n'est malheureusement pas la plus simple. Néanmoins, comme cela a été exposé, des solutions existent.

Alors que la réglementation concernant la mise sur le marché des produits cosmétiques évolue et se renforce sans cesse, le développement de nouveaux produits dont la conservation se veut optimisée et en accord avec la demande des consommateurs n'est pas des plus aisées. En effet, les industriels du secteur cosmétiques doivent s'adapter aux législations et aux attentes des consommateurs, ce qui les oblige à trouver sans cesse de nouvelles solutions.

Dans le cadre du développement de la formule, l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques tels que l'activité de l'eau, le pH, la température permet d'établir des formulations sans conservateurs (autoconservées) ou nécessitant une quantité de conservateurs moins importante qu'habituellement.

Le conditionnement envisagé est à définir dès le début car le type de packaging ainsi que sa composition influencent très fortement la conservation de la formulation dès leur mise en contact ainsi qu'au moment de la première utilisation du produit par le consommateur.

Une étroite collaboration est nécessaire entre les formulateurs et la production car l'étape de mise à l'échelle peut être critique si une certaine rigueur n'est pas mise en œuvre et suivie. De plus, un produit fabriqué en laboratoire ayant franchi avec succès l'épreuve du challenge test peut montrer des résultats catastrophiques au même test après une fabrication en production, si certains paramètres d'hygiène ou liés aux manipulations effectuées n'ont pas été respectés.

L'utilisation d'alternatives naturelles aux conservateurs chimiques est également envisageable.

Les huiles essentielles sont déjà largement connues pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Un équilibre reste

cependant à trouver entre leur activité, leur potentiel allergisant et leur odeur marquée.

Les extraits naturels, bien moins étudiés, constituent une solution d'intérêt. Un certain nombre d'extraits sont déjà commercialisés et utilisés en tant que conservateurs, bien que non présents sur la liste positive. Cela représente donc une piste à exploiter afin d'approfondir l'étude de leur potentiel antimicrobien et envisager leur valorisation de manière plus importante.

L'avancement de la recherche permet d'envisager des alternatives de plus en plus nombreuses, respectueuses de l'environnement et en adéquation avec la demande du marché. Bien souvent, il n'est pas possible de remplacer les conservateurs de synthèse par une ou plusieurs alternative(s) sans repenser complètement les formules. Le travail des formulateurs, en collaboration avec les microbiologistes, ainsi que la production, dans cette perspective de formules à conservation optimisée, n'est pas simple mais tout à fait envisageable avec une solide connaissance des problématiques à considérer.

Conservateurs pour cosmétiques

Généralités et conservateurs antimicrobiens

par **Xavier FERNANDEZ**

Docteur en Sciences, HDR
Maître de conférences à l'Université de Nice-Sophia Antipolis
Directeur du Master 2 Professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL)
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Florence MERCK

Master Valorisation des ressources végétales (Université de Strasbourg)
Doctorante en chimie
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

et **Audrey KERDUDO**

Ingénieur chimiste (ENSC de Rennes)
Doctorante en chimie
SOFIA Cosmétiques
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Sources bibliographiques

- [1] ALLAIN (P.). – *Les Médicaments, paroi et membrane des micro-organismes*. Les Médicaments, Ed., 3^e édition, CdM Editions, p. 409-420 (2000).
- [2] ORTH (D.S.). – *Acid pH and survival strategies of microorganisms*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs : Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.), Ed., Marcel Dekker, p. 17-43 (1996).
- [3] BRANNAN (D.K.). – *Biology of microbes*. Cosmetic Microbiology : A Practical Approach, GEIS (P.A.), Ed., 2nd Edition, Taylor & Francis, p. 19-69 (2006).
- [4] PORRACCHIA (J.F.). – *Microbiological limit testing : microbial specifications for finished products*. Cosmetic and Drug Microbiology, ORTH (D.S.), KABARA (J.J.), DENYER (S.P.) et TAN (S.K.), Ed., Cosmetic Science and Technology Series, 31, p. 233-242 (2006).
- [5] BRANNAN (D.K.). – *Validation of methods*. Cosmetic Microbiology : A Practical Approach, GEIS (P.A.), Ed., 2nd Edition, Taylor & Francis, p. 147-160 (2006).
- [6] ECK (L.S.). – *Preservative efficacy testing during formula development and stability testing*. Cosmetic and Drug Microbiology, ORTH (D.S.), KABARA (J.J.), DENYER (S.P.) et TAN (S.K.), Ed., Cosmetic Science and Technology Series, 31, p. 109-121 (2006).
- [7] DAS (K.), TIWARI (R.K.S.) et SHRIVASTAVA (D.K.). – *Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent : current methods and future trends*. Journal of Medicinal Plants Research, 4(2), p. 104-111 (2010).
- [8] KARAGÖZ (A.), DOGRUÖZ (N.), ZEYBEK (Z.) et ASLAN (A.). – *Antibacterial activity of some lichen extracts*. Journal of Medicinal Plants Research, 3(12), p. 1034-1039 (2009).
- [9] FLANAGAN (J.J.). – *Preserving cosmetics with natural preservatives and preserving natural cosmetics*. Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products, DAYAN (N.) et KROMIDAS (L.), Ed., Wiley, p. 169-178 (2011).
- [10] LOPEZ (P.), SANCHEZ (C.), BATLE (R.) et NERIN (C.). – *Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils : susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 53, p. 6939-6946 (2005).
- [11] RIOS (J.L.), RECIO (M.C.) et VILLAR (A.). – *Screening methods for natural products with antimicrobial activity : a review of the literature*. Journal of Ethnopharmacology, 23, p. 127-149 (1988).
- [12] HORVÁTH (G.), JÁMBOR (N.), VÉGH (A.), BÖSZÖRMÉNYI (A.), LEMBERKOVICS (E.), HÉTHELYI (E.), KOVACS (K.) et KOCSIS (B.). – *Antimicrobial activity of essential oils : the possibilities of TLC-bioautography*. Flavour and Fragrance Journal, 25, p. 178-182 (2010).
- [13] KABARA (J.J.). – *Principles for product preservation*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs : Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.), Ed., Marcel Dekker, p. 1-14 (1996).
- [14] GEIS (P.A.). – *Preservation strategies*. Cosmetic Microbiology, A Practical Approach, GEIS (P.A.), Ed., 2nd Edition, Taylor & Francis, p. 163-180 (2006).
- [15] MARTINI (M.-C.). – *Matières premières utilisées dans la formulation cosmétique des topiques cutanés*. Introduction à la dermatologie et à la cosmétologie, MARTINI (M.-C.), Ed., Lavoisier, p. 305-332 (2003).
- [16] SPIESS (E.). – *Raw materials*. Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry, WILLIAMS (D.F.) et SCHMITT (W.H.), Ed., Blackie Academic & Professional, p. 1-31 (1992).
- [17] PATRONE (V.), CAMPANA (R.), VITTORIO (E.) et BAFFONE (W.). – *In vitro synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus*. Current Microbiology, 60, p. 237-241 (2010).
- [18] HALLSWORTH (J.E.), HEIM (S.) et TIMMIS (K.N.). – *Chaotropic solutes cause water stress in Pseudomonas putida*. Environmental Microbiology, p. 1-11 (2003).
- [19] INGRAM (L.O.). – *Mechanism of lysis of Escherichia coli by ethanol and other chaotropic agents*. Journal of Bacteriology, 146(1), p. 331-336 (1981).
- [20] COZZOLI (O.). – *The role of surfactants in self-preserving cosmetic formulas*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs : Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.), Ed., Marcel Dekker, p. 75-118 (1996).
- [21] GLOVER (R.E.), SMITH (R.R.), JONES (M.V.), JACKSON (S.K.) et ROWLANDS (C.C.). – *An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes*. FEMS Microbiology Letters, 177, p. 57-62 (1999).
- [22] KABARA (J.J.). – *Hurdle technology for cosmetic and drug preservation*. Cosmetic and Drug Microbiology, ORTH (D.S.), KABARA (J.J.), DENYER (S.P.) et TAN (S.K.), Ed., Cosmetic Science and Technology Series, vol. 31, p. 163-183 (2006).
- [23] RAUWEL (G.), LECLERCQ (L.), CRIQUELION (J.), AUBRY (J.M.) et NARDELLO-RATAJ (V.).

CONSERVATEURS POUR COSMÉTIQUES

- *Aqueous mixtures of di-n-decylidimethylammonium chloride/polyoxyethylene alkyl ether: dramatic influence of tail/tail and head/head interactions on co-micellization and biocidal activity*. *Journal of Colloid Interface Science*, 374, p. 176-186 (2012).
- [24] KABARA (J.J.). – *Fatty acids and esters as multifunctional components*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.), Ed., Marcel Dekker, p. 119-137 (1996).
- [25] BERGASSON (G.), ARNFINNSSON (J.J.), STEINGRIMMSON (O.) et THORMAR (H.). – *In vitro killing of Candida albicans by fatty acids and monoglycerides*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), p. 3209-3212 (2001).
- [26] CONLEY (A.J.) et KABARA (J.J.). – *Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4(5), p. 501-506 (1973).
- [27] KABARA (J.J.), SWIECZKOWSKI (D.M.), COLLEY (A.J.) et TRUANT (J.P.). – *Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(1), p. 23-28 (1972).
- [28] KATO (N.) et SHIBASAKI (I.). – *Comparison of antimicrobial activities of fatty acids and their esters*. *Journal of Fermentation Technology*, 53, p. 793 (1975).
- [29] IBARRA (F.), Dr. STRAETMANS et JOHNSON (C.H.). – *Natural preservation from concepts in nature*. *Cosmetic and Toiletries*, p. 81 (2008).
- [30] KABARA (J.J.). – *Chelating agents as preservative potentiators*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.), Ed., Marcel Dekker, p. 209-226 (1996).
- [31] ORTH (D.S.), LUTES ANDERSON (C.M.), SMITH (D.K.) et MILSTEIN (S.R.). – *Synergism of preservative system components: use of the survival curve slope method to demonstrate anti-pseudomonas synergy of methylparaben and acrylic acid homopolymer/copolymers in vitro*. *Journal of Society of Cosmetic Chemists*, 40, p. 347-365 (1989).
- [32] LAMBERT (R.J.W.), HANLON (G.W.) et DENYER (S.P.). – *The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 96, p. 244-253 (2004).
- [33] NASTRO (A.), CANNATELLI (M.A.), MORELLI (I.), CIONI (P.L.), BADER (A.), MARINO (A.) et ALONZO (V.). – *Preservative properties of calamintha officinalis essential oil with and without EDTA*. *Letters on Applied Microbiology*, 35, p. 385-389 (2002).
- [34] ALZOREKY (N.S.) et NAKAHARA (K.). – *Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia*. *International Journal of Food Microbiology*, 80, p. 223-230 (2003).
- [35] XIE (L.), HETTIARACHCHY (N.S.), JANE (M.E.) et JOHNSON (M.G.). – *Antimicrobial activity of Ginkgo biloba leaf extract on Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, 68, p. 268-270 (2003).
- [36] FOURNIAT (J.). – *Conservateurs antimicrobiens*. Actifs et Additifs en Cosmétologie, MARTINI (M.-C.) et SEILLER (M.), Ed., 3^e édition, Lavoisier, p. 763-807 (2006).
- [37] RYAN (T.). – *L'activité de l'eau, une autre façon de voir l'humidité*. *Mesures Physiques*, 751, p. 38-41.
- [38] ENIGL (D.C.) et SORRELLS (K.M.). – *Water activity and self-preserving formulas*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.), Ed., Marcel Dekker, p. 45-73 (1996).
- [39] ENGLISH (D.J.). – *Factors in selecting and testing preservatives in product formulations*. *Cosmetic and Drug Microbiology*, ORTH (D.S.), KABARA (J.J.), DENYER (S.P.) et TAN (S.K.), Ed., *Cosmetic Science and Technology Series*, vol. 31, p. 57-108 (2006).
- [40] VARVARESOU (A.), PAPAGEORGIOU (S.), TSIRIVAS (E.), PROTOPAPA (E.), KINTZIOU (H.), KEFALA (V.) et DEMETZOS (C.). – *Self-preserving cosmetics*. *International Journal of Cosmetic Science*, 31, p. 163-175 (2009).
- [41] ORTH (D.S.). – *Acid pH and survival strategies of microorganisms*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.), Ed., Marcel Dekker, p. 17-43 (1996).
- [42] VARVARESOU (A.) et PAPAGEORGIOU (S.). – *The development of self-preserving gels*. *Household and Personal Care TODAY*, 4, p. 20-23 (2010).
- [43] BRANNAN (D.K.). – *The role of packaging in product preservation*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.), Ed., Marcel Dekker, p. 227-242 (1996).
- [44] ENGLISH (D.J.). – *Factors in selecting and testing preservatives in product formulations*. *Cosmetic and Drug Microbiology*, ORTH (D.S.), KABARA (J.J.), DENYER (S.P.) et TAN (S.K.), Ed., *Cosmetic Science and Technology Series*, vol. 31, p. 57-108 (2006).
- [45] YABLONSKI (J.I.) et MANCUSO (S.E.). – *Microbial risks and eco-friendly packaging*. Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products, DAYAN (N.) et KROMIDAS (L.), Ed., Wiley, p. 179-211 (2011).
- [46] FLANAGAN (J.). – *Preserving cosmetics with natural preservatives and preserving natural cosmetics*. Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products, DAYAN (N.) et KROMIDAS (L.), Ed., Wiley, p. 169-178 (2011).
- [47] SIRCAR (D.), ROYCHOWDHURY (A.) et MITRA (A.). – *Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology*, 164, p. 1358-1366 (2007).
- [48] KANG (Y.-H.), PARKER (C.C.), SMITH (A.C.) et WALDRON (K.W.). – *Characterization and distribution of phenolics in carrot cell walls*. *Journal of Agricultural Chemistry*, 56, p. 8558-8564 (2008).
- [49] GORINSTEIN (S.), LEONTOWICZ (H.), LEONTOWICZ (H.), NAMIESNIK (J.), NAJMAN (K.), DRZEWIECKI (J.), CVIKROVA (M.), MARTINCOVA (O.), KATRICH (E.) et TRAKHTENBERG (S.). – *Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, p. 4418-4426 (2008).
- [50] ODRIOZOLA-SERRANO (I.), SOLIVA-FORTUNY (R.) et MARTIN-BELLOSO (O.). – *Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments*. *European Food Research and Technology*, 228, p. 239-248 (2008).
- [51] NG (A.), PARKER (M.L.), PARR (A.J.), SAUNDERS (P.K.), SMITH (A.C.) et WALDRON (K.W.). – *Physicochemical characteristics of onion (Allium cepa L.) tissues*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, p. 5612-5617 (2000).
- [52] UYEN (T.), CLARE (B.), GUO (W.) et MARTINAC (B.). – *The effects of parabens on the mechanosensitive channels of E. coli*. *European Biophysics Journal*, 34, p. 389-395 (2005).
- [53] DARDRE (P.D.), ALJARRAH (A.), MILLER (W.R.), COLDHAM (N.G.), SAUER (M.J.) et POPE (G.S.). – *Concentrations of parabens in human breast tumours*. *Journal of Applied Toxicology*, 24, p. 5-13 (2004).
- [54] OISHI (S.). – *Effects of propyl paraben on the male reproductive system*. *Food and Chemical Toxicology*, 40, p. 1807-1813 (2002).
- [55] AUBERT (N.), AMELLER (T.), et LEGRAND (J.J.). – *Systemic exposure to parabens: pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration*. *Food and Chemical Toxicology*, 50, p. 445-454 (2012).
- [56] HAMMER (K.A.), CARSON (C.F.) et RILEY (T.V.). – *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. *Journal of Applied Microbiology*, 86, p. 985-990 (1999).
- [57] ROMEO (F.V.), DELUCA (S.), PISCOPO (A.) et POIANA (M.). – *Antimicrobial effect of some essential oils*. *Journal of Essential Oil Research*, 20, p. 373-379 (2008).
- [58] LANG (G.) et BUCHBAUER (G.). – *A review on recent research results (2009-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals*. *A Review*. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, p. 13-39 (2012).
- [59] KUNICKA-STYCZYNSKA, SIKORA (M.) et KALEMBZ (D.). – *Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems*. *Journal of Applied Microbiology*, 107, p. 1903-1911 (2009).
- [60] BARATTA (M.T.), DORMAN (H.J.D.), DEANS (S.G.), FIGUEIREDO (A.C.), BARROSO (J.G.) et RUBERTO (G.). – *Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils*. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, p. 235-244 (1998).
- [61] BURT (S.A.) et REINDERS (R.D.). – *Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, p. 162-167 (2003).
- [62] RIOS (J.L.) et RECIO (M.C.). – *Medicinal plants and antimicrobial activity*. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, p. 80-84 (2005).
- [63] MURPHY COWAN (M.). – *Plant products as antimicrobial agents*. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 564-582 (1999).
- [64] MANSOURI (N.), SATRANI (B.), GHANMI (M.), EL GHADRAOUI (L.), GUEDIRA (A.) et AAFI (A.). – *Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de Juniperus communis du Maroc*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 80, p. 791-805 (2011).
- [65] KARIMI (E.), OSKOUEIAN (E.), HENDRA (R.), OSKOUEIAN (A.) et JAAFAR (H.Z.E.). – *Phenolic compounds characterization and biological activities of Citrus aurantium bloom*. *Molecules*, 17, p. 1203-1218 (2012).
- [66] WEI (A.) et SHIBAMOTO (T.). – *Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58, p. 7218-7225 (2010).
- [67] GENDE (L.B.), MAGGI (M.D.), FRITZ (R.) et EGUARAS (M.J.). – *Antimicrobial activity of pimpinella anisum and foeniculum vulgare essential oils against paenibacillus larvae*. *Journal of Essential Oil Research*, 21, p. 91-94 (2009).

- [68] GBENOU (J.D.), MOUDACHIROU (M.), CHALCHAT (J.C.) et FIGUEREDO (G.). – *Chemotypes in Melaleuca quinquenervia (Cav.) ST Blake (Niaouli) from Benin using multivariate statistical analysis of their essential oils*. Journal of Essential Oil Research, 19, p. 101-104 (2007).
- [69] KARAGÖZ (A.), DOGRUÖZ (N.), ZEYBEK (Z.) et ASLAN (A.). – *Antibacterial activity of some lichen extracts*. Journal of Medicinal Plants Research, 3(12), p. 1034-1039 (2009).
- [70] BOLZINGER (M.A.). – *Extraits végétaux. Actifs et Additifs en Cosmétologie*, MARTINI (M.-C.) et SEILLER (M.), Ed., 3^e édition, Lavoisier, p. 163-188 (2006).
- [71] KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.). – *Preservative-free and self-preserving cosmetic and drug products: the future*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.), Ed., Marcel Dekker, p. 243-261 (1996).
- [72] ZHANG (M.), DUAN (C.), ZANG (Y.), HUANG (Z.) et LIU (G.). – *The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (Citrus grandis (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (Citrus paradisi) from China*. Food Chemistry, 129, p. 1530-1536 (2011).
- [73] GANZERA (M.), ABERHAM (A.) et STUPPNER (H.). – *Development and validation of an HPLC/UV/MS method for simultaneous determination of 18 preservatives in grapefruit seed extract*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 54, p. 3768-3772 (2006).
- [74] BLOOR (S.J.), MOLLOY (B.P.J.). – *Cytotoxic norditerpene lactones from Ileostylus Micranthus*. Journal of Natural Products, 54(5), p. 1326-1330 (1991).
- [75] KUBO (I.), MUROI (H.) et HIMEJIMA (M.). – *Antibacterial activity of totarol and its potentiation*. Journal of Natural Products, 55(10), p. 1436-1440 (1992).
- [76] LOPES (G.), SOUSA (C.), BERNARDO (J.), ANDRADE (P.B.), VALENTÃO, FERRERES (F.) et MOUGA (T.). – *Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast*. Journal of Phycology, 47, p. 1210-1218 (2011).
- [77] GENOVESE (G.), TEDONE (L.), HAMANN (M.T.) et MORABITO (M.). – *The Mediterranean red alga Asparagopsis: a source of compounds against Leishmania*. Marine Drugs, 7, p. 361-366 (2009).
- [78] DWECK (A.C.). – *Natural preservatives – An update*. Formulating Natural Cosmetics, DWECK (A.C.), Ed., Allured Books, p. 107-130 (2010).
- [79] WITKOWSKA-BANASZCZAK (E.), BYLKA (W.), MATLAWSKA (I.), GOSLINKA (O.) et MUSZYŃSKI (Z.). – *Antimicrobial activity of viola tricolor herb*. Fitoterapia, 76, p. 458-461 (2005).
- [80] GÜLÇİN (I.), OKTAY (M.), KIREÇCI (E.) et KÜFREYİOĞLU (Ö.I.). – *Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (Pimpinella anisum L.) seed extracts*. Food Chemistry, 83, p. 371-382 (2003).
- [81] SHANGA (X.), PANA (H.), LI (M.), MIAO (X.) et DINGD (H.). – *Lonicera japonica thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine*. Journal of Ethnopharmacology, 138, p. 1-21 (2011).
- [82] DEPREE (J.A.), HOWARD (T.M.) et SAVAGE (G.P.). – *Flavour and pharmaceutical properties of the volatile sulphur compounds of Wasabi (Wasabia japonica)*. Food Research International, 31, p. 329-337 (1999).
- [83] LV (F.), LIANG (H.), YUAN (Q.) et LI (C.). – *In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms*. Food Research International, 44, p. 3057-3064 (2011).
- [84] OYEDEMI (S.O.), OKOH (A.I.), MABINYA (L.V.), PIROCHENVA (G.) et AFOLAYAN (A.J.). – *The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris and Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology, 8, p. 1280-1286 (2009).
- [85] CHANG (Y.H.). – *Consumer and formulator of natural cosmetics: understanding and integrating each others needs*. Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products, DAYAN (N.) et KROMIDAS (L.), Ed., Wiley, p. 15-26 (2011).
- [86] ROSHOLT (A.P.). – *Regulatory perspective of natural and organic cosmetic products*. Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products, DAYAN (N.) et KROMIDAS (L.), Ed., Wiley, p. 51-65 (2011).
- [87] The boots Company plc. – *Anti-microbial compositions*. PCT World Patent, WO 91/11105 (1991).
- [88] Knoll Aktiengesellschaft. – *Enzyme concentrate*. PCT World Patent, WO 98/49272 (1998).
- [89] CICCIGNANI (D.T.). – *Cosmetic preservation using enzymes*. Cosmetic and Drug Microbiology, ORTH (D.S.), KABARA (J.J.), DENYER (S.P.), et TAN (S.K.), Ed. Cosmetic Science and Technology Series, vol. 31, p. 185-203 (2006).
- [90] LOPEZ (D.) et LOPEZ (C.). – *Cosmetic product sterilization*. WO 2007/148022 A2 (2007).
- [91] OULÉ (K.M.), DICKMAN (M.) et ARUL (J.). – *Microbicidal effect of pressurized CO₂ and the influence of sensitizing additives*. European Journal of Scientific Research, 41(4), p. 569-581 (2010).
- [92] SPILIMBERGO (S.) et CIOLA (L.). – *Supercritical CO₂ et NO₂ pasteurization of peach and kiwi juice*. International Journal of Food Science and Technology, 45, p. 1619-1625 (2010).
- [93] SPILIMBERGO (S.), ELVASSORE (N.) et BERTUCCO (A.). – *Microbial inactivation by high-pressure*. Journal of Supercritical Fluids, 22, p. 55-63 (2002).
- [94] ANDRÁS (C.D.), CSAJÁGI (C.), ORBÁN (C.K.), ALBERT (C.), ÁBRAHÁM (E.) et MIKLOSSY (I.). – *A possible explanation of the germicide effect of carbon dioxide in supercritical state based on molecular biological evidence*. Medical Hypotheses, 74, p. 325-329 (2010).
- [95] SPILIMBERGO (S.), MANTOAN (D.), QUARANTA (A.) et DELLA-MEA (G.). – *Real-time monitoring of cell membrane modification during supercritical CO₂ pasteurization*. The Journal of Supercritical Fluids, 48, p. 93-97 (2009).
- [96] WHITE (A.), BURNS (D.) et CHRISTENSEN (T.W.). – *Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide*. Journal of Biotechnology, 123, p. 504-515 (2006).
- [97] CUPFERMAN (S.). – *Élaboration d'une stratégie de protection antimicrobienne sans conservateur chimique*. Thèse, Université René Descartes de Paris (1992).
- [98] RONDEL (C.). – *Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives*. Thèse, Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse (2009).
- [99] HITESHKUMAR (D.). – *Self assembly in aqueous and non-aqueous sugar-oil mixtures*. Thèse, University of Cincinnati (2008).

À lire également dans nos bases

- AUBRY (J.-M.) et SCHORSCH (G.). – *Formulation – Présentation générale*. [J 2 110] Principes de formulation (1999).
- LARPENT (C.). – *Tensioactifs*. [K 342] Constantes physico-chimiques (1995).
- BOGNOLO (G.). – *Tensioactifs non ioniques – Mise en œuvre industrielle*. [J 2 265] Formulation (2004).
- BOGNOLO (G.). – *Tensioactifs non ioniques – Propriétés : tableaux comparatifs*. [J 2 266] Formulation (2004).
- DANAN (C.), NABET (P.), MORETAIN (J.-P.), DARBORD (J.-C.) et BOUTTIER-BECASSE (P.). – *Analyse en microbiologie – Antibactériens*. [P 3 353] Sécurité au laboratoire (2006).
- ROCHÉ (Y.) et NIEL (P.). – *Analyses en microbiologie – Produits non stériles*. [P 3 352] Sécurité au laboratoire (2006).
- SQUINAZI (F.). – *Analyses en microbiologie – Environnement microbien (air, surfaces, eau)*. [P 3 355] Sécurité au laboratoire (2006).
- FAIVELEY (M.). – *L'eau et la conservation des aliments*. [F 1 011] Notions de biochimie alimentaire et alimentation humaine (2003).
- SPINNLER (H.-E.). – *Transformation et conservation des produits agroalimentaires*. [F 3 450] Procédés biochimiques et chimiques en agroalimentaire (2008).
- SQUINAZI (F.). – *Analyses en microbiologie – Environnement microbien (air, surfaces, eau)*. [P 3 355] Sécurité au laboratoire (2006).
- VERNOZY-ROZAND (C.). – *Méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire*. [F 1 130] Concepts, équipements et réglementations des biotechnologies (1999).
- FERNANDEZ (X.), MERCK (F.) et KERDUDO (A.). – *Conservateurs pour les cosmétiques. Antioxydants et anti-UV*. [J 2 285] Formulation à paraître.
- GARNERO (J.). – *Huiles Essentielles*. [K 345] Constantes chimiques (1995).
- MOREL (F.). – *Commande prédictive des machines électriques tournantes*. [D 2 901] Convertisseurs et machines électriques (2009).

CONSERVATEURS POUR COSMÉTIQUES

Sites Internet

COSMOS-standard AISBL : référentiel européen COSMOS de la cosmétique bio
<http://www.cosmos-standard.org>
 (page consultée le 29 février 2012)

Cosmetics & Toiletries : article de David Steinberg, Steinberg & Associates, dédié à l'influence de l'activité de l'eau sur la conservation cosmétique
<http://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/ingredient/preservatives/112901129.html?page=3>
 (page consultée le 24 janvier 2012)

CEA Cellule Expert Additifs-Ingédients : base de donnée contenant plus de 1 200 actifs et additifs, dossier sur les acides organiques
http://www.adrianoi.com/adrianoi/page_cea1.htm
 (page consultée le 25 février 2012)

Eau thermale Avene : dispositif de fermeture DEFI
http://www.eau-thermale-avene.com/fr_FR/gamme?id=6
<http://www.youtube.com/watch?v=EeqfnGrf5Xk>
 (sites consultés le 2 février 2012)

EDUCNET : dossier sur l'équilibre des phases l'équilibre liquide-vapeur de solutions
http://www.educnet.education.fr/rnchimie/gen_chim/triboulet/rff/equilibres.pdf
 (page consultée le 4 mars 2012)

Innovation Fluides Supercritiques :
<http://www.supercriticalfluid.org/ffs/userfiles/Dossier%20thematique%20sur%20les%20fluides%20supercritiques%20dec202010.pdf>
 document sur les fluides supercritiques (page consultée le 12 mars 2012)

Le flacon : site dédié à la composition des produits cosmétiques
<http://leflacon.free.fr/>
 (page consultée le 12 janvier 2012)

Les parabènes au quotidien : site de Nicolas Lévy (professeur agrégé responsable du site ENS-DGESCO CultureSciences-Chimie), Gilles Camus (professeur agrégé responsable du site ENS-DGESCO Vie)
<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/parabenes/parabenes.html>
 (page consultée le 22 janvier 2012)

Société Chimique de France : dossier dédié aux parabènes et à leur substitution dans les produits cosmétiques
<http://www.societechimiquedefrance.fr/produit-du-jour/parabenes.html>
 (page consultée le 22 janvier 2012)

ULYSSE (multimédia de ressource pédagogique de formation) : la cellule, ses organites et leurs fonctions
http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biozell_diffusion/
 (page consultée le 9 mars 2012)

Événements

Beyond Beauty Events – Salons internationaux des fournisseurs et marques de la beauté et du bien-être
http://beyondbeautyevents.com/bbe/fr/bbe_00_Home.asp

Congrès Beauté and Packaging – Le packaging des parfums et cosmétiques
http://www.beautepackaging.com/1/fr_FR/page/217

Congrès International des Plantes Aromatiques et Médicinales – Journées Internationales des Huiles Essentielles et des Extraits – Association pour la promotion des Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales, a lieu tous les ans à Digne-les-Bains (04)
<http://www.appam.online.fr/>

Congrès parfums et cosmétiques – Les enjeux réglementaires des industriels du parfum et de la cosmétique
<http://www.congres-parfums-cosmetiques.com/>

Cosmetic and Sensory – L'analyse sensorielle et la cosmétique
<http://www.cosmeticandsensory.fr/fr/>

Cosmoprof – Salon international des parfums et cosmétiques
<http://www.cosmoprof.com/en/trade-show/chi-siam/>

In-Cosmetics – Salon international des matières premières et technologies pour la cosmétique
<http://www.in-cosmetics.com/>

59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – 28 juillet au 1^{er} août 2012, New York, USA
<http://icnpr2012.org/>

International Symposium on Essential Oils – 5 au 8 septembre 2012, Lisbonne, Portugal
<http://iseo2012.fc.ul.pt/>

Packaging Parfums, Cosmétiques and Design – Salon de l'innovation dans le domaine des packagings
<http://www.pcd-congress.com/fr/>

Salon mondial Spa and Beauté – Salon international des professionnels de l'esthétique et du Spa
<http://www.msbparis.com/fr/accueil.php>

Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales – a lieu tous les ans à Grasse (06)
<http://www.aromatherapie.ville-grasse.fr/>

Normes et standards

EN 550	1994	Validation et contrôle de routine pour la stérilisation par l'oxyde d'éthylène
NF EN ISO 29621	06-11	Cosmétiques – Microbiologie – Lignes directrices pour l'appréciation du risque et l'identification de produits à faible risque microbiologique (indice de classement : T 75-609)
NF EN ISO 21148	09-09	Cosmétiques – Microbiologie – Instructions générales pour les examens microbiologiques (indice de classement : T 75-601)
NF EN ISO 18415	08-11	Cosmétiques – Microbiologie – Détection des micro-organismes spécifiques et non spécifiques (indice de classement : T 75-606)
NF T 75-611	07-07	Cosmétiques – Microbiologie – Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique (indice de classement : T 75-611)
NF EN ISO 21149	09-09	Cosmétiques – Microbiologie – Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles (indice de classement T 75-602)

NF EN ISO 22717	09-09	Cosmétiques – Microbiologie – Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (indice de classement : T 75-603)
NF EN ISO 21150	09-09	Cosmétiques – Microbiologie – Détection d' <i>Escherichia coli</i> (indice de classement : T 75-604)
NF EN ISO 22718	09-09	Cosmétiques – Microbiologie – Détection de <i>Staphylococcus aureus</i> (indice de classement : T 75-605)
NF EN ISO 18416	09-09	Cosmétiques – Microbiologie – Détection de <i>Candida albicans</i> (indice de classement : T 75-607)
NF EN ISO 16212	08-11	Cosmétiques – Microbiologie – Dénombrement des levures et des moisissures (indice de classement : T 75-608)
EP 5.1.3	01-11	Efficacité de la conservation antimicrobienne, 7 th Edition Pharmacopée européenne
USP32 NF27		Antimicrobial Effectiveness Testing Pharmacopée, US Pharmacopeia General Chapter : <51>

Réglementation

Arrêté du 22 décembre 2011 modifiant l'arrêté du 6 février 2001 fixant la liste des substances qui ne peuvent être utilisées dans les produits cosmétiques en dehors des restrictions et conditions fixées par cette liste

Règlement CE 1223 2009 du parlement européen relatif aux produits cosmétiques

Proposition de loi visant à interdire l'utilisation des phtalates, des parabènes et des alkylphénols, 4 mai 2011

Directive 76/768/CEE du Conseil du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des Etats membres relatives aux produits cosmétiques (directive « Cosmétiques »)

Annuaire

Constructeurs – Fournisseurs – Distributeurs (liste non exhaustive)

Fournisseurs de conservateurs

ARCH CHEMICALS (LONZA)
<http://www.archchemicals.com/fed/pc>
(page consultée le 20 mars 2012)

CLARIANT
<http://www.personalcare.clariant>
(page consultée le 4 mars 2012)

DOW CHEMICAL
<http://www.dow.com/products/market/personal-care-and-apparel/>
(page consultée le 23 mars 2012)

LONZA
<http://www.lonza.com/en/products-services/personal-care/search-by-brand/geo-guard.aspx>
(page consultée le 4 mars 2012)

SEPPIC
<http://www.seppic.com/cosmetics/antifungal-preservative-agent-@/2620/view-935-category.html>
(page consultée le 4 mars 2012)

SCHÜLKE & MAYER
<http://www.schuelke.fr/cosmetique>
(page consultée le 23 mars 2012)

TRI-K INDUSTRIES
<http://www.tri-k.com/preservatives.shtml>
(page consultée le 23 mars 2012)

UNIVAR
<http://www.univareurope.com/fr/fr/Cosmetiques/110/>
(page consultée le 30 mars 2012)

Fournisseur d'extraits naturels et huiles essentielles

Active Concepts LLC
<http://www.activeconceptsllc.com>

ALBAN MÜLLER
<http://www.albanmuller.com/>
(page consultée le 3 mars 2012)

ALBERT VIEILLE
<http://www.algues-et-mer.com>
(page consultée le 18 juin 2012)

Algues & Mer
<http://www.algues-et-mer.com/>
(page consultée le 18 juin 2012)

BERNARDI
<http://www.bernardi-oil.com>
(page consultée le 29 mars 2012)

BIO-BOTANICA
<http://www.bio-botanica.com/cosmetic.aspx>
(page consultée le 19 mars 2012)

CAMPO
<http://www.campo-research.com>

COSMETOCHEM
<http://www.cosmetochem.com/index.cfm>
(page consultée le 19 mars 2012)

MANE
<http://www.mane.com/ingredients>
(page consultée le 3 mars 2012)

NATUREX
<http://www.naturex.fr/catalogues/personal-care.html>
(page consultée le 15 novembre 2011)

PAYAN-BERTRAND
<http://www.payanbertrand.com/>
(page consultée le 3 mars 2012)

ROBERTET
http://www.robertet.com/matieres_premieres/presentation.php
(page consultée le 3 mars 2012)

VEGE TECH
<http://www.vegetech.com/p/products.htm>
(page consultée le 21 mars 2012)

Autres fournisseurs

Chemie research and manufacturing : extrait de pépin de pamplemousse
<http://p50inc.com/index.phtml>

COSMETOCHEM : matières premières végétales
<http://www.cosmetochem.com/index.cfm>

Essentially New Zealand : représentant marketing international pour les fabricants néozélandais d'ingrédients ou de produits finis cosmétiques à base de totarol ou autres produits naturels
<http://www.essentiallynz.com/html/our-products.html>
(page consultée le 22 février 2012)

NOVASINA : instruments de mesures de l'activité de l'eau
<http://www.novasina.com/>
(page consultée le 5 mars 2012)

PARISPACK : fabrication et conditionnement pour la cosmétique et le parfum
<http://www.parispack.fr>
(page consultée le 12 décembre 2011)

Organismes – Fédérations – Associations (liste non exhaustive)

ADEME : dossier technique « Tensioactifs et Oléagineux » (2002)
<http://www.ademe.fr/partenaires/agricole/htdocs/actus03.asp>
(page consultée le 3 mars 2012)

CFTA : Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association
<http://www.ctfa.org/>
(page consultée le 3 février 2012)

CNRS : présentation sur les Biotensioactifs
<http://www.cnrs.fr/inc/recherche/programmes/docs/Borredon.pdf>
(page consultée le 3 mars 2012)

COSMEBIO : association professionnelle de la cosmétique naturelle, écologique et biologique
<http://www.cosmebio.org/>
(page consultée le 29 février 2012)

Cosmetics Europe, The personal care association
<http://www.cosmeticeurope.eu>
(site consulté le 28/01/2012)

ECOCERT : organisme de contrôle et de certification au service de l'homme et de l'environnement
<http://www.ecocert.fr/>
(page consultée le 29 février 2012)

FDA, US Food and Drug Administration :
<http://www.fda.gov/Cosmetics/default.htm>
(site consulté le 29 Janvier 2012)

IFRA : The International Fragrance Association
<http://www.ifraorg.org/>
(site consulté le 12 mars 2012)

NATURE & PROGRES : association de consommateurs et professionnels pour l'agriculture biologique
http://www.natureetprogres.org/nature_et_progres/histoire_nature_progres.html
(page consultée le 22 février 2012)

NATRUE : association internationale pour les produits cosmétiques naturels et biologiques
<http://www.natrue.org/>
(page consultée le 29 février 2012)

Laboratoires – Bureaux d'études – Écoles – Centres de recherche (liste non exhaustive)

BDIH : cosmétiques naturels contrôlés
<http://www.kontrollierte-naturkosmetik.de/index.htm>
(page consultée le 29 février 2012)

Cosmetic Research Group : site dédié aux trois marques de produits cosmétiques du groupe, Soskin, Tom Robin et Hélonature
<http://www.cosmetic-research-group.com>
(page consultée le 15 février 2012)

DERMATHERM : laboratoires proposant une ligne de soins stérilisés UHT
<http://www.dermatherm.fr>
(site consulté le 8/01/2012)

Faculté de médecine Pierre et Marie Curie : dossier sur l'anatomie fonctionnelle des bactéries
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.1.2.5.html>
(page consultée le 9 mars 2012)

Université de Bordeaux Ségalen : présentation sur le règne fongique
http://www.ufrsdv.u-bordeaux2.fr/stellMLLicencebio/Licencebiocours/supports_cours/L3-S5-4-Fungi1Noel-L3.pdf
(page consultée le 9 mars 2012)

Université de Nantes : présentation sur l'anatomie fonctionnelle des Bactéries
<http://www.ticem.sante.univ-nantes.fr/ressources/1438.pdf>
(page consultée le 9 mars 2012)

Annexe 5 : Dossier « Techniques de l'Ingénieur » J 2284 (2012)



DOSSIER

TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR

l'expertise technique et scientifique de référence

j2285

Conservateurs pour cosmétiques - Antioxydants et anti-UV

Par :

Xavier FERNANDEZ

Docteur en sciences, HDR, Professeur à l'Université de Nice-Sophia Antipolis, Directeur du Master 2 Professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL), Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Florence MERCK

Master valorisation des ressources végétales (Université de Strasbourg), Doctorante en chimie, Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Audrey KERDUDO

Ingénieur chimiste (ENSC de Rennes), Doctorante en chimie, SOFIA Cosmétiques, Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Ce dossier fait partie de la base documentaire

Élaboration des formulations

dans le thème Pack & laquo; Formulation & raquo;

et dans l'univers Procédés chimie - bio - agro

Document délivré le 13/12/2012

Pour le compte

7200097598 - éditions ti // nc AUTEURS // 217.109.84.129

Pour toute question :

Service Relation Clientèle • Éditions Techniques de l'Ingénieur • 249, rue de Crimée
75019 Paris – France

par mail : infos.clients@teching.com ou au téléphone : 00 33 (0)1 53 35 20 20



Toute reproduction sans autorisation du Centre français d'exploitation du droit de copie est strictement interdite. © Editions T.I.

Conservateurs pour cosmétiques

Antioxydants et anti-UV

par **Xavier FERNANDEZ**

*Docteur en sciences, HDR
Professeur à l'Université de Nice-Sophia Antipolis
Directeur du Master 2 Professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL)
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis*

Florence MERCK

*Master valorisation des ressources végétales (Université de Strasbourg)
Doctorante en chimie
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis*

et **Audrey Kerdudo**

*Ingénieur chimiste (ENSC de Rennes)
Doctorante en chimie
SOFIA Cosmétiques
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis*

1. Conservation antioxydante des produits cosmétiques	J 2 285 - 2
1.1 Définitions, généralités et enjeux	— 2
1.2 Facteurs influençant l'oxydation	— 3
1.3 Sources d'oxydation	— 4
1.4 Conservateurs antioxydants et anti-UV	— 5
2. Tests d'activité antioxydante et anti-UV	— 7
2.1 Tests d'activité antioxydante	— 7
2.2 Tests d'activité anti-UV	— 7
2.3 Tests de contrôle des matières premières grasses	— 9
3. Paramètres influençant la protection antioxydante des cosmétiques	— 11
3.1 Packaging	— 11
3.2 Agents chélatants	— 12
4. Antioxydants de synthèse	— 13
4.1 Structures et modes d'actions	— 13
4.2 BHA et BHT : toxicologie et controverse	— 14
5. Antioxydants naturels	— 15
5.1 Extraits naturels antioxydants : définitions et modes d'obtention	— 15
5.2 Familles d'actifs	— 17
5.3 Autres types d'antioxydants naturels	— 17
5.4 Mode d'action des antioxydants naturels	— 18
5.5 Cas des cosmétiques biologiques	— 18
6. Conclusions et perspectives	— 19
Pour en savoir plus	Doc. J 2 285

A tout majeur de l'économie française, l'industrie cosmétique constitue un marché très actif, et représente un chiffre d'affaires moyen de 16 milliards d'euros par an.

Avec une dépense moyenne de 205,45 euros par an et par habitant (en 2009) pour les produits d'hygiène, parfumerie et beauté, les Français sont les 4^e plus

grands consommateurs de produits cosmétiques au monde, derrière les États-Unis, le Japon et le Brésil.

Au sein même de ce marché lucratif, la cosmétique biologique et naturelle ne cesse de prendre de l'ampleur, répondant ainsi à la demande accrue des consommateurs.

On entend par produit cosmétique « toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect et/ou de corriger les odeurs corporelles et/ou de les protéger ou de les maintenir en bon état ».

Quelle que soit la nature du produit cosmétique, il doit offrir au consommateur un certain plaisir organoleptique et sensoriel mais doit également respecter des conditions de sécurité afin de ne pas entraver la santé de l'utilisateur.

À cette fin, il est indispensable de protéger le produit cosmétique contre les **effets néfastes de l'oxydation** grâce à l'ajout de conservateurs antioxydants et la **maîtrise des paramètres de stockage ou de conditionnement**. Cela permet en effet de garantir au produit une durée de vie suffisante ainsi qu'une utilisation optimale et satisfaisante par le consommateur.

Les antioxydants utilisés en cosmétique peuvent être d'origine synthétique ou naturelle. Alors que la tendance est au rejet des produits d'origine synthétiques et que certains résultats remettent en cause l'innocuité d'antioxydants de synthèse tels que le BHA ou le BHT, les **antioxydants naturels** sont au centre des intérêts et largement étudiés.

Les **critères de choix** pour un ou plusieurs antioxydant(s) sont complexes car une bonne efficacité antioxydante signifie une protection contre l'oxydation due à l'air, mais également contre l'oxydation photo-induite, ainsi qu'envers les facteurs catalytiques que sont la température et la présence de traces métalliques ou de certains éléments photosensibilisants. De plus, l'agent antioxydant ne doit pas altérer l'odeur, l'aspect ou la couleur du produit, ni être toxique ou allergisant.

Ainsi, afin de proposer une formule dont la protection antioxydante est optimisée, il est important de comprendre quels sont les facteurs induisant l'oxydation, quelles matières premières et quels produits cosmétiques sont particulièrement touchés par ces dégradations oxydatives et quels sont les mécanismes de dégradation qui en découlent. La compréhension de ces éléments permet ensuite de mieux définir le rôle que doit tenir l'agent antioxydant dans la formule et de choisir le plus approprié, qu'il soit synthétique ou naturel. D'autres paramètres tels que le packaging ou encore l'ajout de matières premières potentialisant l'effet antioxydant sont des éléments à prendre en compte pour une bonne protection du produit fini.

1. Conservation antioxydante des produits cosmétiques

1.1 Définitions, généralités et enjeux

Différentes définitions peuvent être attribuées au terme « antioxydant ». D'un point de vue chimique, un antioxydant s'oppose au phénomène d'oxydation ou inhibe les réactions provoquées par l'oxygène ou les peroxydes. D'un point de vue biologique, les antioxydants sont des substances synthétiques ou naturelles utilisées pour prévenir ou retarder la détérioration d'un produit.

Selon l'*Institute for Medicine*, il s'agit d'une substance qui diminue de manière significative les effets adverses des espèces réactives comme les ROS (*Reactive Oxygen Species*) ou RNS (*Reactive Nitrogen Species*) sur les fonctions physiologiques normales chez l'humain [1].

Pour la cosmétique, les **antioxydants** sont des **réducteurs** ayant la capacité d'interrompre la réaction de peroxydation et ainsi d'empêcher la formation d'hydroperoxydes et de peroxydes, courante pour les huiles insaturées. Ils sont utilisés dans toutes les formules contenant des corps gras insaturés, mais peuvent également être incorporés à des phases aqueuses contenant des extraits végétaux riches en oxydases, enzymes responsables de la réduction de l'oxygène en eau ou en peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

Liste des acronymes
AAPH : 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure
AFNOR : Association Française de Normalisation
ABTS : acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ARPP : Autorité de Régulation Professionnelle de la Publicité
BDIH : Bundesverband der Industrie- und Handelsunternehmen (Association fédérale des entreprises commerciales et industrielles)
Beurre : excipient lipophile, composé majoritairement d'acides gras saturés et insaturés, solide à température ambiante, qui fond à des températures proches de celle de la peau. On distingue les beurres natifs (généralement extraits de noyaux ou de graines, et dont les principaux constituants sont des triglycérides) des beurres « fabriqués », obtenus par divers procédés physiques ou chimiques, et dont les textures sont proches de celles des beurres natifs.
BHA : butylhydroxyanisole
BHT : butylhydroxytoluène
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CI50 : concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
Cire : excipient lipophile, composé majoritairement d'esters d'alcool et d'acides gras, solide à température ambiante, d'origine naturelle ou synthétique, de températures de fusion plus élevées que les beurres. Tout comme les beurres, on distingue les cires natives des cires « fabriquées » (par hydrogénation).
CMC : Concentration Micellaire Critique
COSMOS : <i>Cosmetic Organic Standard</i> (norme cosmétique biologique)
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique
FRAP : <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (pouvoir antioxydant par réduction ferrique)
HPLC (ou CLHP) : <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (chromatographie liquide haute performance)
Huile : excipient lipophile, liquide à température ambiante, d'origine naturelle ou synthétique
IA : Indice d'Anisidine
IP : Indice de Peroxyde
ISO : International Standardization Organisation (Organisation internationale de normalisation)
ORAC : <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (capacité d'absorption des radicaux oxygénés)
PP : polypropylène
PE : polyester
RNS : <i>Reactive Nitrogen Species</i> (espèces réactives de l'azote)
ROS : <i>Reactive Oxygen Species</i> (espèces réactives de l'oxygène)
SCCP : Scientific Committee on Consumer Products (Comité scientifique des produits de consommation)
TBHQ : butylhydroquinone tertiaire
TEAC : <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (capacité antioxydante en équivalent Trolox)
TotOx : oxydation totale
TRAP : <i>Total Radical trapping Antioxidant Parameter</i> (capacité antioxydante totale)
UV : ultraviolet

Leur concentration massique dans les produits cosmétiques est généralement comprise entre 0,02 et 0,05 % [2].

L'oxydation générant bien souvent un phénomène de **rancissement**, il est donc important de connaître la sensibilité des matières premières et des produits finis cosmétiques à ce phénomène ainsi que les facteurs qui en sont responsables.

Les phénomènes d'oxydation peuvent être déclenchés suivant plusieurs mécanismes dans les produits cosmétiques :

- l'**autooxydation** qui peut être catalysée par la température, les ions métalliques ou les radicaux libres ;
- la **photo-oxydation** initiée par la lumière en présence de photosensibilisants.

1.2 Facteurs influençant l'oxydation

De nombreux facteurs peuvent influencer l'oxydation, notamment la présence d'espèces pro-oxydantes, radicalaires ou non radicalaires :

- les **radicaux libres** capables d'exister de manière indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés.

Exemples : radicaux à centre de carbone R_3C^{\bullet} , d'azote R_2N^{\bullet} , d'oxygène $R-O^{\bullet}$ ou de soufre $R-S^{\bullet}$.

- les **espèces non radicalaires** qui possèdent un fort potentiel oxydant et qui favorisent la formation d'oxydants forts.

Exemples : peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , acide hypochlorique $HOCl$, ozone O_3 , oxygène singulet 1O_2 , peroxytrinitre $ONOO^{\bullet}$, métaux de transition Me^{n+} .

Parmi ces pro-oxydants, on distingue plus particulièrement les **espèces réactives de l'oxygène (ROS)** et les **espèces réactives de l'azote (RNS)**. Les ROS et RNS peuvent être radicalaires ou non radicalaires (tableau 1).

Ces espèces réactives ont des durées de vie relativement variables (demi-vie de l'ordre de la nanoseconde pour le radical hydroxyle à quelques minutes pour le peroxyde d'hydrogène).

Il existe également de nombreuses sources exogènes de radicaux libres :

- les radiations (rayons UV, rayons X, rayons gamma, etc.) ;
- les produits chimiques qui réagissent pour former des peroxydes (exemple de l'oxygène singulet) ;
- les produits chimiques qui provoquent la formation de superoxydes (exemple des quinones) ;
- les produits chimiques qui sont métabolisés en radicaux (exemple des phénols pouvant être présents sous forme de polyphénols dans les extraits végétaux) ;
- les produits chimiques qui génèrent du fer (exemple de la ferri-ritine).

De nombreux composés insaturés présents dans les huiles, beurres et cires naturelles, tels que les acides gras, les triglycérides, des terpènes ou des vitamines, sont susceptibles d'être oxydés ou dégradés, générant des couleurs et odeurs non souhaitées pour un produit cosmétique. En effet, l'oxydation se déroule essentiellement au niveau des doubles liaisons des chaînes aliphatiques de ces composés insaturés. Ainsi, plus le nombre d'insaturations est grand, plus l'espèce est sensible à l'oxydation.

Tableau 1 - Exemples de ROS et RNS radicalaires et non radicalaires			
ROS		RNS	
Radicalaires	Non radicalaires	Radicalaires	Non radicalaires
Anion superoxyde O_2^-	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	Oxyde nitrique NO^*	Peroxynitrite $ONOO^-$
Hydroxyle OH^*	Acide hypochlorique $HOCl^-$	Dioxyde de nitrogène NO_2	Peroxynitrites d'alkyle $ROONO$
Peroxyle RO_2	Ozone O_3		Tetroxyde de dinitrogène N_2O_3
Alkoxyyle RO^*	Oxygène singulet 1O_2		Acide nitreux HNO_2
Hydroperoxyyle HO_2	Peroxynitrite $ONOO^-$		Anion nitronium NO_2^+
			Anion nitroxyyle NO^-
			Cation nitrosyle NO^+
			Chlorure de nitryle NO_2Cl

Exemple : avec une seule double liaison, l'acide oléique ($C_{18:1}$) est relativement stable à l'oxydation. Par contre, l'acide linoléique (3 doubles liaisons, $C_{18:3w-3}$) présente une vitesse d'auto-oxydation 200 fois supérieure à l'acide stéarique (forme saturée C_{18}) et l'acide arachidonique ($C_{20:4w-6}$) environ 400 fois supérieure. L'acide α -éleostéarique est l'acide gras qui s'oxyde le plus rapidement, environ 1 000 fois plus vite que l'acide stéarique.

De manière générale, plus l'acide gras ou l'huile présente de doubles liaisons, plus l'oxydation est rapide. Ce point est vérifié en particulier lorsque les doubles liaisons sont conjuguées [3].

1.3 Sources d'oxydation

1.3.1 Auto-oxydation

L'autooxydation est une des principales sources d'oxydation, c'est pourquoi son mécanisme est très étudié. C'est une réaction autocatalytique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes (figure 1).

Dans un premier temps, une première réaction produit un radical libre par élimination d'un radical hydrogène de l'acide gras (**initiation**). L'initiation peut être favorisée par une élévation de la température ou reproduite par des générateurs chimiques, des traces métalliques, ou des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène. Puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs radicaux libres (**propagation**).

INITIATION	$RH \rightarrow R^* + H^*$ $R^* + O_2 \rightarrow ROO^*$	Formation d'un radical lipidique Formation d'un radical peroxyde
PROPAGATION	$ROO^* + R'H \rightarrow ROOH + R^*$	Formation d'hydroperoxyde
TERMINAISON	$R^* + R^* \rightarrow R'R'$ $ROO^* + ROO^* \rightarrow ROOR + O_2$ $ROO^* + R^* \rightarrow ROOR'$	

Figure 1 - Schéma général du mécanisme d'oxydation

Les radicaux sont des molécules possédant un électron non apparié, ce sont des espèces très réactives et instables.

Lorsqu'un radical réagit sur une molécule, celle-ci forme un nouveau radical ainsi qu'une espèce non radicalaire (**terminaison**) [4] [5] [6] [7].

La sensibilité d'une substance (typiquement un acide gras insaturé) à l'oxydation dépend donc de sa capacité à former des radicaux et à la stabilité de ces radicaux. Comme le montrent les figures 2 et 3, cette réaction génère des **hydroperoxydes** (produits primaires d'oxydation [8]) ainsi que des produits secondaires volatils (aldéhydes, alcools, cétones, hydrocarbures, acides, esters), dont plusieurs sont responsables de mauvaises odeurs (odeurs de rance) et non volatils (oxy-monomères/-dimères, époxydes, éther-oxydes). La température est un facteur très influent concernant la dégradation des hydroperoxydes en produits d'oxydation secondaires [8] [9].

1.3.2 Photo-oxydation

La photo-oxydation est une voie importante de production d'hydroperoxydes en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs (pigments, certains colorants, certaines vitamines...). Sous l'effet des rayons ultraviolets, les molécules photosensibilisantes peuvent réagir avec l'oxygène triplet pour former l'oxygène singulet, forme excitée de l'oxygène. En effet, la lumière apporte une énergie qui catalyse cette réaction [10]. Il a été montré que les longueurs d'onde courtes (300 à 400 nm) ont un effet plus marqué que les longues [11] [12]. L'oxygène singulet formé est électrophile et peut réagir directement avec les doubles liaisons, formant ainsi un hydroperoxyde (figure 4) [5] [8]. Cette réaction n'est pas catalytique mais stoechiométrique (une molécule d'oxygène réagit avec une autre molécule de substrat). Ensuite interviennent les réactions radicalaires en chaîne de l'auto-oxydation. Les hydroperoxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par l'auto-oxydation [4] [6].

Ainsi, le phénomène d'oxydation est intensifié par des apports énergétiques tels que la chaleur ou la lumière [13], la présence de peroxydes et évidemment la présence d'oxygène dans l'air. Des **métaux de transitions** peuvent également catalyser ces réactions. En effet, les métaux de transitions sont des molécules possédant différents états d'oxydation, ils peuvent facilement perdre ou gagner un électron, facilitant les réactions des radicaux libres.

Il est donc nécessaire d'apporter des solutions afin de protéger le produit de l'air, de la chaleur, et de la lumière. Les produits à risque devraient être conservés ou stockés dans des contenants bien fermés et dans le noir, à l'abri des rayons du soleil et dans des endroits à température contrôlée. Mais des agents antioxydants et/ou chélatants peuvent être ajoutés afin d'optimiser cette protection.

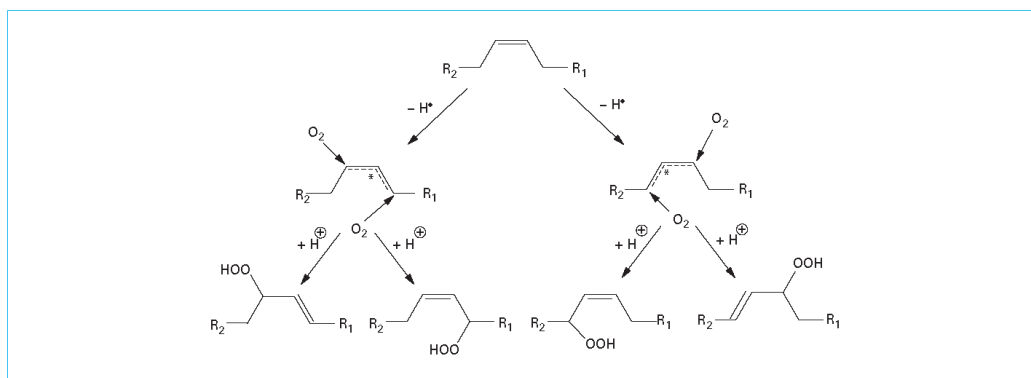


Figure 2 - Formation d'hydroperoxydes par auto-oxydation des acides gras insaturés

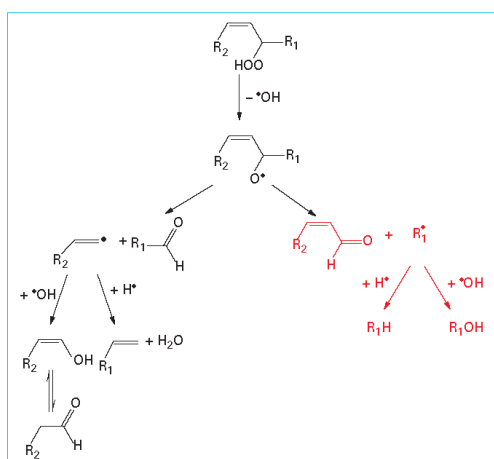


Figure 3 - Décomposition des hydroperoxydes en produits secondaires

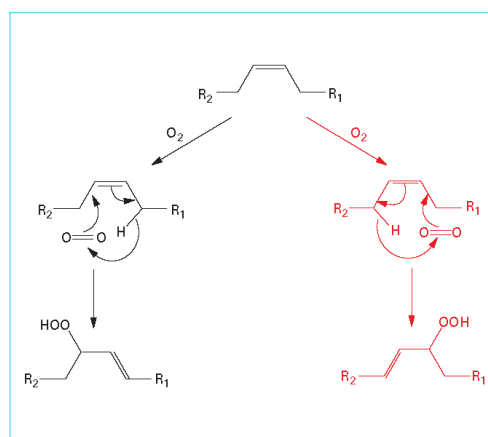


Figure 4 - Formation d'hydroperoxydes par photo-oxydation des acides gras insaturés

1.4 Conservateurs antioxydants et anti-UV

Connaissant les facteurs susceptibles de mener à l'oxydation d'une matière première cosmétique ou d'un produit formulé, il est alors possible d'envisager les solutions pour limiter ce facteur. L'oxydation pouvant être générée selon différents mécanismes, les antioxydants peuvent avoir des modes d'action variés.

1.4.1 Conservateurs antioxydants

Ils peuvent intervenir soit sur l'étape d'initiation en protégeant les acides gras insaturés des initiateurs de l'oxydation (ROS), soit en bloquant l'étape de propagation grâce à leur capacité à réduire les radicaux libres alkyls formés [8].

Les tocophérols, naturellement présents dans les huiles végétales, notamment l'**α-tocophérol**, sont très utilisés en cosmétique et appartiennent à cette classe d'antioxydants, tout comme les antioxydants phénoliques [3].

On peut également utiliser les antioxydants sous forme de **complexe** ou en **association avec un chélateur de métaux**. Un phénomène de synergie peut être observé lorsqu'un des accepteurs de radicaux libres possède une efficacité supérieure à un autre issu du même complexe. Cette synergie permet au complexe antioxydant d'avoir une réactivité supérieure à celle d'un composé utilisé seul. En effet, le composé le plus réactif donne un électron au radical libre de l'acide gras oxydé. Le moins réactif donne à son tour un électron au premier composé, permettant la régénération des espèces les plus actives.

L'acide ascorbique, hydrosoluble, et son dérivé lipophile, le palmitate d'ascorbyle, sont souvent utilisés comme antioxydants synergistes. L'acide citrique ou l'EDTA sont utilisés comme chélateurs de métaux [6]. L'association de l'acide citrique avec du tocophérol ou encore du β -carotène et de l' α -tocophérol sont de bons exemples de complexes antioxydants synergiques ayant montré leur efficacité [6] [12].

L'efficacité des antioxydants dans les systèmes lipidiques dépend de trois paramètres : leur solubilité, leur volatilité et leur stabilité. En effet, les antioxydants doivent être liposolubles afin de pouvoir réagir avec les radicaux libres issus de l'oxydation des huiles. Par ailleurs, ils ne doivent pas être trop volatils au risque d'être perdus lors du processus de fabrication du produit fini. Ils doivent également être stables aux températures mises en œuvre lors de la production. Il est nécessaire que les antioxydants soient ajoutés avant que les réactions d'oxydation n'interviennent car, s'ils préviennent ce phénomène, ils n'ont aucune action sur les produits de l'oxydation.

Le choix des antioxydants dépend également :

- de leur capacité à être antioxygène persistant, c'est-à-dire que leur capacité antioxydante perdure pendant une durée minimale déterminée, par exemple la durée de conservation d'un produit cosmétique ;
- de leur sensibilité au pH ;
- de leur influence sur une éventuelle décoloration du produit ;
- de la production d'odeurs désagréables ou d'arrière-goûts ;
- de leur disponibilité ;
- de leur multifonctionnalité ;
- de leur coût.

La multifonctionnalité est un paramètre primordial car de nombreux antioxydants peuvent apporter d'autres fonctions que la conservation à un produit cosmétique.

Exemple : les vitamines telles que l'acide ascorbique ou les tocophérols sont souvent considérées comme actifs pour l'éclat de la peau ou du teint, et utilisées comme agents antiradicalaires en aidant les cellules de la peau à lutter contre l'oxydation et retarder ainsi leur vieillissement [14] [15].

1.4.2 Photoprotecteurs ou anti-UV

Le plus souvent, les antioxydants jouent également le rôle de photoprotecteurs dans les formules cosmétiques, puisque comme vu précédemment, leurs mécanismes antiradicalaires s'appliquent également à la photo-oxydation.

En effet, selon la **décision 96/335/CE**, des ingrédients appelés absorbants UV ou filtres UV sont ajoutés aux produits cosmétiques dans le but de protéger les formules (et la peau) des effets néfastes des rayons ultraviolets UVA ou UVB. Nous traitons ici des filtres UV à visée protectrice pour les formules, les filtres UV utilisés en tant qu'actifs antisolaires ne sont donc pas mentionnés.

Les substances autorisées sont précisées dans l'annexe VII de la directive cosmétique. Notons que les filtres minéraux exercent une simple action mécanique sur la peau par effet de barrière anti-UV. Ils ne permettent donc pas de filtrer les rayons UV dans la formule cosmétique.

Le tableau 2 donne des exemples de filtres ultraviolets admis dans les produits cosmétiques.

Le choix du ou des antioxydants appropriés dépend de différents facteurs tels l'exposition du produit (air, lumière...) ou le type de formulation (émulsion, anhydre...). De même il faut définir si les antioxydants sont naturels ou synthétiques [3].

Tableau 2 – Exemple de filtres ultraviolets admis dans les produits cosmétiques

Numéro CE	Substance	Concentration massique maximale autorisée (%)	Type de filtre	Conditions d'emploi et avertissement à reprendre obligatoirement sur l'étiquetage
1	PABA (Para-AminoBenzoic Acid)	5	Filtre UVB – Absorbant organique	
3	Homosalate	10	Filtre UVB – Absorbant organique	
4	Benzophénone-3	10	Filtre UVA – Absorbant organique	Contient benzophénone-3 (1)
8	Butyl méthoxydibenzoyl méthane	5	Filtre UVA – Absorbant organique	
10	Octocrylène	10 (en acide)	Filtre UVB – Absorbant organique	
12	Éthylhexyl Méthoxycinnamate	10	Filtre UVB – Absorbant organique	
22	Benzophénone-4 Benzophénone-5	5 (en acide)	Filtre UVA – Absorbant organique	

(1) Mention non exigée si la concentration est égale ou inférieure à 0,5 % et si la substance n'est utilisée que pour protéger le produit

2. Tests d'activité antioxydante et anti-UV

2.1 Tests d'activité antioxydante

La détermination du pouvoir antioxydant d'une substance est une tâche délicate car celui-ci repose sur une multitude de voies d'action, parmi lesquelles :

- l'inhibition des voies enzymatiques pro-oxydantes ;
- la désactivation d'un oxygène singulet ;
- la désactivation enzymatique des ROS (*Reactive Oxygen Species*) ;
- la chélation des métaux de transition ;
- ou encore la stabilisation des ROS.

De nombreuses méthodes physicochimiques permettent d'évaluer l'activité antioxydante d'un produit. Cependant, les antioxydants étant de nature variable, et les mécanismes d'oxydation étant très complexes, il est impossible de comparer les méthodes entre elles et d'établir une standardisation. La combinaison de différents résultats permet d'avoir une indication relativement précise de la capacité antioxydante d'un produit.

Le tableau 3 présente les principales caractéristiques des méthodes de test les plus connues et utilisées. L'évaluation peut se faire :

- soit de manière directe [16] [17] [18] en dosant des produits formés (par exemple, les hydroperoxydes) ;
- soit de manière indirecte en mesurant la capacité d'un antioxydant à piéger des radicaux libres tels que l'ABTS [acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] [19] [20] [21] [22] ou le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (figure 5) [13] [23] [24] [25] [26] [27].

La première catégorie de tests (DPPH, Folin-Ciocalteu) nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation, car elle consiste en la recherche de groupements fonctionnels des radicaux formés. Ainsi, différents dosages réalisés par des techniques plus ou moins directes permettent de déterminer un rapport d'inhibition avant et après mise en contact des composés oxydés avec l'antioxydant dont on souhaite mesurer l'activité. À titre d'illustration, la figure 6 présente le test au DPPH sous forme schématique.

La seconde catégorie de tests (TEAC, ORAC, TRAP, FRAP) vise à établir une relation entre la quantité de radicaux libres piégés et la quantité d'antioxydants présents. Souvent, des témoins d'activité sont utilisés, par exemple le Trolox [19] [22], ou acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique, qui est un dérivé commercial de la vitamine E, ou encore des indicateurs de fluorescence [22] [23] [28] [29].

De nombreuses applications existent pour toutes ces méthodes de détermination de l'activité antioxydante d'un échantillon ; c'est

pourquoi aucune ne se suffit à elle-même. Il est judicieux de prendre en considération les applications que l'on souhaite mettre en œuvre par la suite dans le choix des méthodes de test (par exemple, l'incorporation dans un produit cosmétique en tant qu'actif, ou en tant que conservateur, ou encore la composition de la formule à considérer : présence de corps gras ou non...). La confrontation des résultats obtenus par le biais de différentes méthodes permet d'établir un profil antioxydant pour le composé ou le mélange testé. Il est également à noter que les radicaux libres utilisés dans les tests sont rarement présents dans les systèmes biologiques et qu'ils constituent uniquement un modèle d'évaluation de la capacité antioxydante d'un échantillon. Les résultats ne sont donc pas directement transposables et leur interprétation doit être effectuée avec un certain recul.

D'autres méthodes développées plus récemment permettent d'évaluer l'activité antioxydante en combinant les méthodes utilisées à des outils analytiques tels que la chromatographie liquide, la spectrométrie de masse ou encore la résonance magnétique nucléaire. On parle dans ce cas de **criblage haute résolution** car une technique de séparation telle que l'HPLC est couplée à une méthode de détection d'activité antioxydante en sortie de colonne. Cela permet, pour des mélanges complexes, de ne pas avoir à passer par les étapes de purification et d'isolement, longues et complexes, mais de tester directement les composés à la fin de l'analyse [30].

2.2 Tests d'activité anti-UV

Afin d'évaluer l'efficacité photoprotectrice d'actifs, il faut réaliser des tests d'exposition aux rayons lumineux à l'origine de la dégradation des corps gras. À cet effet, il existe des **enceintes spécifiques** qui permettent de simuler l'exposition à la lumière solaire de manière contrôlée, permettant ainsi de vérifier la photostabilité des produits (ou des packagings). Certaines enceintes peuvent simuler le spectre lumineux complet de la lumière naturelle du soleil (**enceintes à arc au xénon**). Des dispositifs permettent même de choisir une exposition représentative de la lumière du soleil d'été, d'hiver ou à travers une fenêtre. D'autres dispositifs permettent une sélection des rayons lumineux d'exposition (**enceintes à lampe UV fluorescente**), particulièrement les longueurs d'onde courtes (300 à 400 nm, soit les ultraviolets) qui favorisent la photodégradation des produits [31]. En effet, les réactions photochimiques sont causées par les photons de la lumière qui viennent rompre les liaisons chimiques. À chaque type de liaison chimique est associée une longueur d'onde critique générant suffisamment d'énergie pour que la réaction de photodégradation soit possible. Toute longueur d'onde inférieure à cette valeur critique peut également rompre la liaison, alors que les longueurs d'onde supérieures ne le peuvent pas. Ainsi, plus les longueurs d'onde sont courtes, plus elles sont susceptibles de photodégrader de nombreuses molécules. Les tests réalisés sous rayons ultraviolets uniquement accélèrent donc nettement la vitesse de photodégradation des produits [14] [32] [33] [34]. Ainsi,

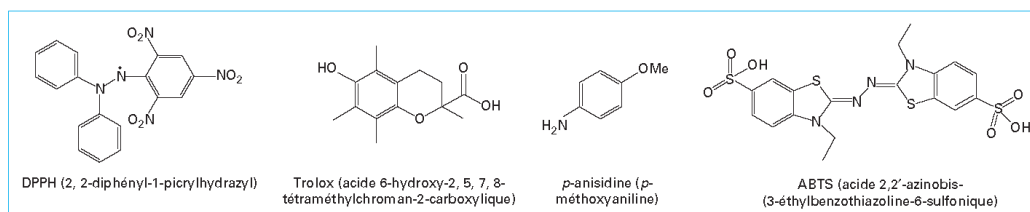


Figure 5 - Formules développées des agents utilisés pour les tests d'activité antioxydante et de contrôle de l'oxydation

Tableau 3 – Principaux tests d'activité antioxydante

Test	Principe	Avantages	Inconvénients	Références
TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)	Mesure colorimétrique du transfert d'électrons d'un antioxydant vers le radical-cation ABTS, exprimée en TEAC (concentration en Trolox donnant la même capacité antioxydante qu'1 mM du composé testé)	Méthode simple à mettre en oeuvre Utile en <i>screening</i> et en routine	Interférences possibles entre les antioxydants et les radicaux libres Radical ABTS non représentatif des biomolécules car absent des systèmes biologiques	[19] [20] [21] [22]
DPPH	Mesure colorimétrique (mesure d'absorbance à 517 nm) de la capacité réductrice d'un antioxydant en présence du radical libre DPPH, exprimée en CE50 (concentration nécessaire pour réduire le DPPH de 50 %)	Test complet, peu coûteux (DPPH commercial) Applicable à des échantillons simples et complexes et à d'autres techniques (révélation CCM par exemple)	Interférences possibles Relativement sélectif (polyphénols essentiellement), relativement long (20 min - 6 h)	[19] [23] [24] [25]
ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	Mesure d'inhibition des radicaux hydroxyles formés par le générateur hydrophile AAPH, grâce à la décroissance de fluorescence de la fluorescéine Expression en TEAC (comparaison avec Trolox effectuée en parallèle)	Méthode standardisée et communément acceptée	Méthode relativement coûteuse (équipement cher), longue et sensible au pH	[22] [23] [28] [29]
TRAP (Total Radical trapping Antioxidant Parameter)	Mesure de l'oxygène consommé lors d'une peroxydation lipidique Décomposition thermique de l'AAPH en présence d'un indicateur de fluorescence Valeur TRAP exprimée par comparaison avec le Trolox.	Méthode simple, reproductible et sensible	Interférences entre antioxydants et indicateurs fluorescents Période de latence	[19] [22]
FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	Mesure de la réduction d'un complexe ferrique en Fe ²⁺ par l'antioxydant (mesure d'absorbance à 594 nm)	Test rapide, peu coûteux, répétable Applicable aux solutions biologiques et aux antioxydants purs	Fiabilité moyenne selon le potentiel redox des composés testés pH bas parfois incompatible	[19] [22] [26] [27] [29]
Folin-Ciocalteu	Mesure des polyphénols totaux et de la capacité réductrice d'un échantillon grâce au réactif de Folin-Ciocalteu Absorbance à 720 nm proportionnelle au taux de composés phénoliques Gamme étalon de référence (acide gallique), résultats exprimés en équivalent d'acide gallique (mg/L)	Méthode simple et sensible, reproductible	Interférences possibles car réactif non spécifique Non applicable aux composés et matrices lipophiles	[16] [19]
Méthode Rancimat	Étude de la stabilité de corps gras et d'huiles Mesure de la résistance à l'oxydation (ou temps d'induction, en heures) par conductimétrie, dans un milieu soumis à une forte température et un bullage d'air intensif La conductimétrie varie avec la présence de composés organiques volatils issus de l'oxydation de l'huile ou du corps gras testé	Facile à mettre en oeuvre, reproductible Suivi en parallèle de plusieurs échantillons Durée d'analyse réduite	Conditions drastiques, peu représentatives des conditions normales de stockage Pas de transposition directe des résultats	[17] [18]

Screening : stratégie de criblage visant à évaluer rapidement une quantité importante d'échantillons.

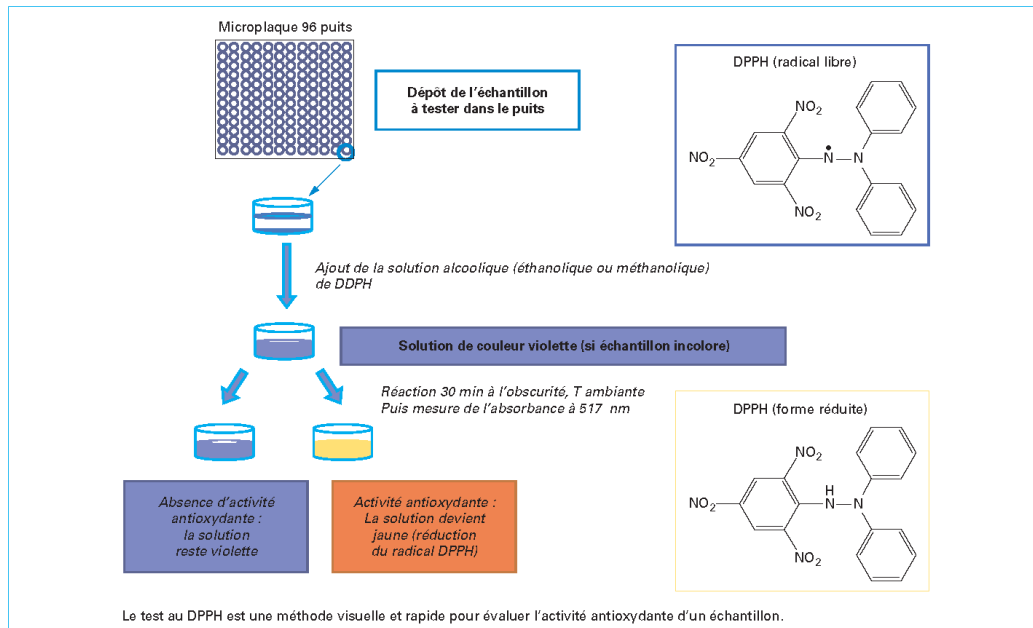


Figure 6 - Représentation schématique du test au DPPH

en quelques jours ou semaines, ces testeurs reproduisent les dommages causés après des mois ou des années d'exposition à la lumière naturelle.

Il est également tout à fait envisageable d'effectuer des tests de photostabilité en exposant directement les produits à la **lumière naturelle**. Ces tests donnent les résultats escomptés, mais dans un délai plus long.

2.3 Tests de contrôle des matières premières grasses

Plusieurs tests de routine pour les laboratoires de contrôle qualité permettent de vérifier l'état des matières premières grasses sensibles à l'oxydation. Les mesures réalisées permettent de vérifier que la qualité de la matière première répond aux conformités du fournisseur, mais également de vérifier la stabilité dans le temps en fonction des conditions de stockage (tableau 4). Ces données permettent de prévoir si un corps gras est plus ou moins sensible aux phénomènes oxydatifs avant et après formulation et d'adapter ainsi le mode de protection (cf. [P 3 325] *Analyse des corps gras*).

Il est à noter que dans le cas de tests d'évaluation du degré d'oxydation ou de rancissement de corps gras formulés, il est nécessaire de les extraire au préalable de la matrice formulée.

En effet, ces paramètres ne peuvent pas être déterminés directement sur une huile formulée, mais uniquement sur l'huile seule. Concernant les émulsions, l'extraction peut par exemple se faire par augmentation de la force ionique ou par centrifugation pour briser l'émulsion ou encore par extraction liquide/liquide des lipides suivie d'une élimination du solvant d'extraction par évaporation. Sont également envisageables des procédés alternatifs tels que les méthodes colorimétriques au thiocyanate ou au xylénol orange, ou encore la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier [8] [35].

2.3.1 Indice d'iode

L'indice d'iode correspond à la quantité de diiode (en gramme) se fixant sur les insaturations de 100 g de corps gras (NF EN ISO 3961). Plus la quantité d'iode complexé est importante, plus la quantité d'acides gras insaturés présents est significative. Ainsi, une diminution de l'indice d'iode dans le temps sur un échantillon donné signifie une diminution du nombre d'insaturations et indique donc que le produit est oxydé.

2.3.2 Indice d'acide

L'indice d'acide correspond à la teneur en acides gras libres contenus dans l'huile. Cette mesure rend compte de l'état de dégradation avancé d'une huile dans la mesure où les acides gras libres sont des produits de dégradation. L'indice d'acide est la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire (en mg) pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1 g de corps gras. Cette mesure peut être réalisée par titrage colorimétrique (les indicateurs colorés

Tableau 4 – Principaux tests de contrôle des matières premières sensibles à l’oxydation

Test	Principe	Avantages	Inconvénients	Références
Indice de peroxyde IP	Méthode iodométrique de mesure des produits primaires (peroxydes) d’oxydation Évaluation du degré d’oxydation des acides gras insaturés et du degré de rancissement	Méthode normalisée (anciennement NF EN ISO 3960, AOCS Cd 8-53), bonne répétabilité, valeurs de référence (Codex Alimentarius, Pharmacopée)	Indicateur de début d’oxydation uniquement	[36] [37]
Détermination des diènes conjugués	Mesure des diènes conjugués (intermédiaires d’oxydation) sur les acides gras ayant au moins deux doubles liaisons Absorption spécifique en UV (232-234 nm pour les diènes et 268 nm pour les triènes)	Méthode normalisée (AOCS Cd 7-58, NF EN ISO 3656), très facile à mettre en œuvre, intérêt en contrôle qualité	Interférences entre lipides natifs et diènes conjugués (bruit de fond), sensibilité limitée, pas de valeurs de référence	[35] [37] [38] [39]
Indice d’iode	Méthode iodométrique Mesure des insaturations des acides gras	Méthode normalisée (NF EN ISO 3961), très facile à mettre en œuvre, intérêt en contrôle qualité	–	
Indice d’anisidine	Mesure du complexe formé entre les aldéhydes et le p-anisidine Absorption spécifique en UV à 350 nm	Méthode normalisée (NF EN ISO 6885), complémentaire de l’indice de peroxyde	Plus spécifique des aldéhydes conjugués	[8] [38]
Indice d’acide	Titration colorimétrique donnant la teneur en acides gras libres	Méthode normalisée (NF EN ISO 660), très facile à mettre en œuvre, intérêt en contrôle qualité	–	

préconisés diffèrent en fonction de la couleur du corps gras à analyser : phénolphtaléine, bleu de méthylène, bleu alcalin 6B ou thymolphtaléine) ou potentiométrique (NF EN ISO 660).

2.3.3 Indice de peroxyde

L’indice de peroxyde (IP) d’un corps gras est défini par la quantité d’oxygène actif (en microgrammes) contenu dans un gramme de produit capable d’oxyder l’iodure de potassium avec libération d’iode (encore exprimé en milliéquivalent par kilogramme). Ce dosage peut être effectué suivant la norme NF EN 3969. Cette valeur donne une indication sur l’état d’oxydation de l’huile et permet d’anticiper une détérioration ultérieure de la qualité organoleptique de l’huile. En effet, comme expliqué au § 1.3.1, la formation des peroxydes ou hydroperoxydes précède la formation de composés volatils et non volatils caractéristiques du rancissement. Ainsi, un indice de peroxyde peu élevé sur une huile ne présentant pas d’odeur rance montre que l’état de dégradation est peu avancé. Par contre, un IP relativement faible sur une huile présentant une odeur rance définit un état de dégradation élevé car signifie que les peroxydes ont commencé à se dégrader en produits secondaires d’oxydation. Ainsi, l’indice de peroxyde peut être complété (pour les corps gras très rances) par la mesure de l’indice d’anisidine (IA, § 2.3.4), ce qui permet de calculer le paramètre TotOx (Oxydation Totale) [36]. Ce dernier paramètre se calcule de la manière suivante :

$$\text{TotOx} = 2\text{IP} + \text{IA}$$

Une valeur de TotOx la plus faible possible est gage de qualité pour un corps gras.

Industriellement, c’est par le raffinage (désodorisation) que sont exclus les composés volatils ou non, responsables des mauvaises saveurs d’une huile. Ainsi, pour un corps gras fraîchement raffiné, l’indice de peroxyde est généralement inférieur à 1 meq/kg d’huile mais il n’est pas rare de trouver des huiles ayant des indices supérieurs à 10 meq/kg et qui ne présentent pas de défauts sensoriels [19]. La valeur seuil de 10 meq/kg est bien souvent la norme des huiles cosmétiques (tableau 5) [37].

L’équivalent (eq) est la mesure de la capacité d’une substance à se combiner à d’autres substances. Il est défini comme la masse en grammes d’une substance capable de réagir avec $6,022 \times 10^{23}$ électrons.

2.3.4 Indice d’anisidine

L’indice d’anisidine (IA) (figure 5) correspond à la mesure de la quantité d’aldéhydes (principalement les aldéhydes α - et β -insaturés) présents dans un corps gras (NF EN ISO 6885). Cette méthode est basée sur la réaction entre le groupement carbonyle de l’aldéhyde et le groupement amine du p-anisidine en milieu acide formant une base de Schiff, de couleur jaune, qui absorbe à 350 nm [8]. L’absorbance mesurée est celle résultant de la réaction d’un gramme de matière grasse en solution dans 100 mL de solution d’iso-octane avec le p-anisidine [38].

Huile	Indice d'acide (mg KOH/g)	Indice de peroxyde (m ^é q O ₂ actif/kg)	Indice d'iode (g I ₂ /100 g)
Huile de jojoba vierge	≤ 2,0	≤ 10,0	75 à 95
Huile de macadamia	≤ 0,5	≤ 5,0	–
Huile de noyau d'abricot raffinée	≤ 1,0	≤ 5,0	95 à 115
Huile d'amande douce	≤ 2,0	≤ 5,0	95 à 105
Huile d'argan vierge désodorisée	≤ 4,0	≤ 10,0	–
Huile d'avocat raffinée	≤ 1,0	≤ 10,0	75 à 102

2.3.5 Absorbance UV – Diènes et triènes conjugués

Au cours de la formation des hydroperoxydes, la réaction d'oxydation génère également des diènes ou triènes conjugués. La particularité de ces composés est qu'ils ont un pic d'absorbance à 232-233 nm pour les diènes et 268 nm pour les triènes. Ces composés peuvent donc être déterminés par mesure de l'absorbance à ces longueurs d'onde (NF EN ISO 3656) [20] [39].

Ainsi, un laboratoire de contrôle qualité des matières premières et produits finis cosmétiques peut aisément mettre en place des méthodologies permettant de suivre l'état d'oxydation des produits sensibles. En plus des méthodes analytiques, un suivi organoleptique est également préconisé. En effet, une élévation de l'état d'oxydation se traduit par une modification de l'odeur et/ou de la couleur, éléments facilement détectables et caractérisables.

3. Paramètres influençant la protection antioxydante des cosmétiques

Lors de l'élaboration d'une formulation cosmétique dont la conservation se veut optimisée, une réflexion préalable est nécessaire afin de déterminer les facteurs d'exposition du produit, de sa fabrication à sa mise sur le marché puis finalement son utilisation. Parmi les éléments déterminants, le choix du packaging est à envisager dès le début car il peut avoir un impact potentialisateur ou limitant sur l'oxydation du produit. De même, en fonction de la composition de la formule, certains agents doivent être ajoutés à cette même fin.

3.1 Packaging

3.1.1 Design du packaging

La mise en contact avec l'oxygène de l'air et l'exposition aux rayons UV étant parmi les principaux facteurs d'oxydation, le choix d'un packaging ou mode de conditionnement tenant compte de

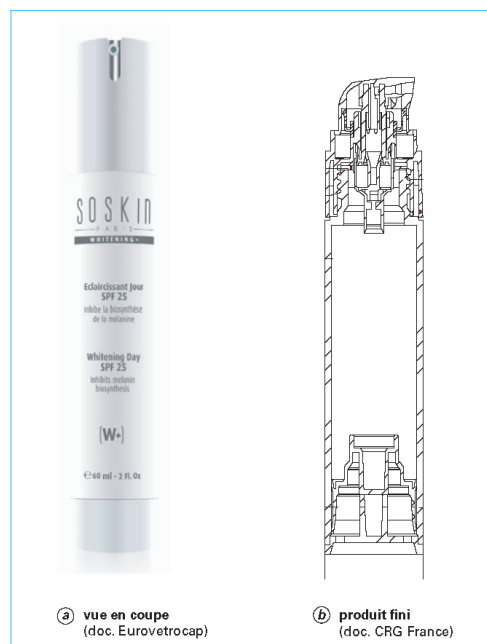


Figure 7 – Exemple de flacon airless

ces considérations est essentiel [40]. En effet, une fois fabriqué et conditionné, le produit fini peut être mis en contact de manière répétée ou permanente avec l'oxygène de l'air lors du prélèvement du produit par le consommateur. De plus, en fonction de la nature du matériau constituant le packaging, le produit peut être plus ou moins exposé à la lumière naturelle et/ou artificielle.

Ainsi, des packagings spécifiques ont été élaborés afin d'optimiser la protection des produits finis.

Les plus répandus sont les **pompes « airless »** (figure 7) conçues selon un procédé bloquant l'entrée d'oxygène et d'eau dans le contenant où se trouve le produit et limitant au maximum les contacts directs entre le consommateur et la formulation lors du prélèvement. Pour cela, ces pompes possèdent une valve de non-retour du produit. Les produits sont ainsi protégés de l'oxydation de l'air. Il faut cependant noter que ces packagings élaborés ont un coût supérieur aux packagings classiques, la répercussion se faisant sur le prix du produit fini [41] [42] [43].

Les laboratoires dermatologiques Avène® ont développé un dispositif de fermeture permettant de conserver une formule stérile absolument intacte durant toute la durée de l'utilisation du produit. Ce dispositif exclusif formule intacte DEFI assure l'absence de rétrocontamination (aucun volume mort et l'absence d'oxydation de la formule, c'est-à-dire aucun passage d'air). Le système se compose de 4 pièces dont une membrane souple qui se soulève lorsque l'on exerce une pression sur le tube et revient en place lorsque l'on relâche la pression. Les pièces sont fabriquées au millimètre près, ce qui assure une parfaite cohésion et étanchéité de l'ensemble. Enfin, le capot s'ajuste parfaitement sur la capsule (pas d'espace libre entre les deux) et sa fermeture est assurée par un

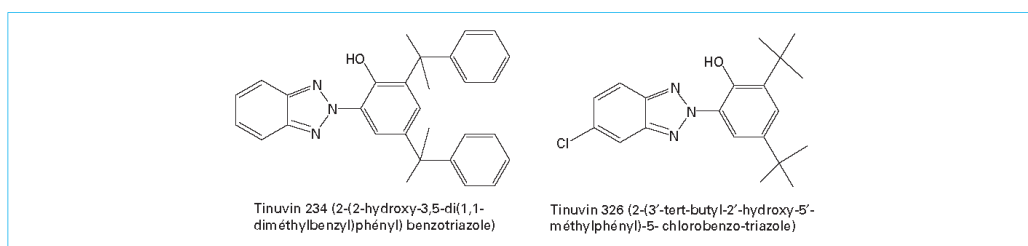


Figure 8 – Formules développées de deux agents anti-UV couramment associés aux matériaux polymériques de conditionnement

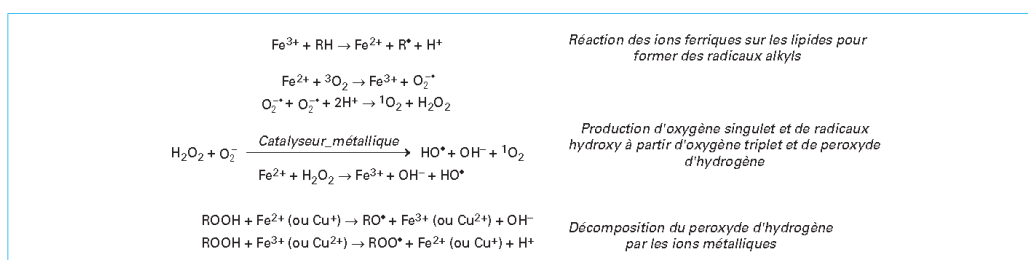


Figure 9 – Schéma réactionnel de l'oxydation par les ions métalliques

clip d'inviolabilité qui n'est retiré qu'au moment de la première utilisation du tube. La fabrication et le conditionnement de ces produits ne sont pas sans contrainte. En effet, le procédé industriel appliqué est dérivé de la fabrication des médicaments injectables et se fait donc en milieu complètement stérile. Ce système de fabrication est nommé ETS (*Extreme Tolerance System*). On comprend donc que cela implique un coût de production et de packaging important, qui se répercute sur le prix du produit fini.

3.1.2 Matériaux

Les matériaux constituant le packaging ont un rôle primordial dans l'optimisation de la conservation antioxydante d'un produit cosmétique. En effet, ce n'est pas parce qu'un contenant est opaque qu'il ne laisse pas passer les rayons UV. De plus, il est également important que la perméabilité du packaging à l'oxygène soit faible. Afin d'optimiser la durée de vie des produits conditionnés, des technologies à base de polymères combinés à des filtres ou absorbants UV, des pigments et des antioxydants sont aujourd'hui largement disponibles. Ces complexes polymériques sont tout aussi bien élaborés à partir de polymères de synthèses classiques (polyéthylène, polypropylène...) que naturels et biodégradables.

Exemple : l'ajout d'absorbants UV tels que le Tinuvin 234 ((2-(2-hydroxy-3,5-di(1,1-diméthylbenzyl)phényl) benzotriazole) ou le Tinuvin 326 (2-(3'-tert-butyl-2'-hydroxy-5'-méthylphényl)-5-chlorobenzotriazole) dans les plastiques d'emballage transparents permet d'augmenter la stabilité oxydative et sensorielle des matières premières grasses (figure 8) [12].

De plus, l'incorporation de pigments permet également de potentialiser la barrière protectrice aux rayons UV. Plus le pigment tend vers le noir, plus la protection est efficace. Il est souvent judicieux de combiner pigments et filtres UV car si les pigments

apportent une protection efficace contre la dégradation du produit conditionné, le packaging lui-même peut subir une détérioration qui se traduit souvent par une décoloration du plastique [44].

Puisqu'il n'existe pas de réglementation spécifique aux plastiques constitutifs des packagings cosmétiques, ce sont bien souvent les spécifications concernant les matériaux destinés à être mis en contact avec les aliments dans le domaine de l'agroalimentaire qui sont prises en compte [42].

Ainsi, il est nécessaire que le fabricant tienne compte de la nature des conservateurs et du packaging lors de l'optimisation de la protection antioxydante du produit fini.

3.2 Agents chélatants

Comme expliqué dans la partie 1.3, les métaux de transitions peuvent catalyser les réactions d'oxydation. En effet, ces ions métalliques (figure 9), tels que le cuivre ou le fer, présents dans les produits cosmétiques, réduisent l'énergie d'activation [6] de l'étape d'initiation de l'oxydation, accélérant donc la réaction. Ils ont ainsi une action pro-oxydante et génératrice de dérivés réactifs de l'oxygène [45] (ROS) tels que des radicaux libres à partir des acides gras et parfums présents dans les formules. Ils peuvent également accélérer la dégradation des hydroperoxydes. Le cuivre accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène 50 fois plus rapidement que les ions ferreux, qui eux-mêmes agissent 100 fois plus vite que les ions ferriques [12]. Or, les agents chélatants ou séquestrants sont des molécules capables de complexer [8] et d'inactiver ces métaux de transitions. Typiquement, ils permettent de maintenir la transparence d'une formule, de protéger les parfums, de stabiliser les agents épaississants, de prévenir le rancissement, de stabiliser les colorants...

Différents agents chélatants sont utilisés en cosmétiques, tels que l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique), le calcium

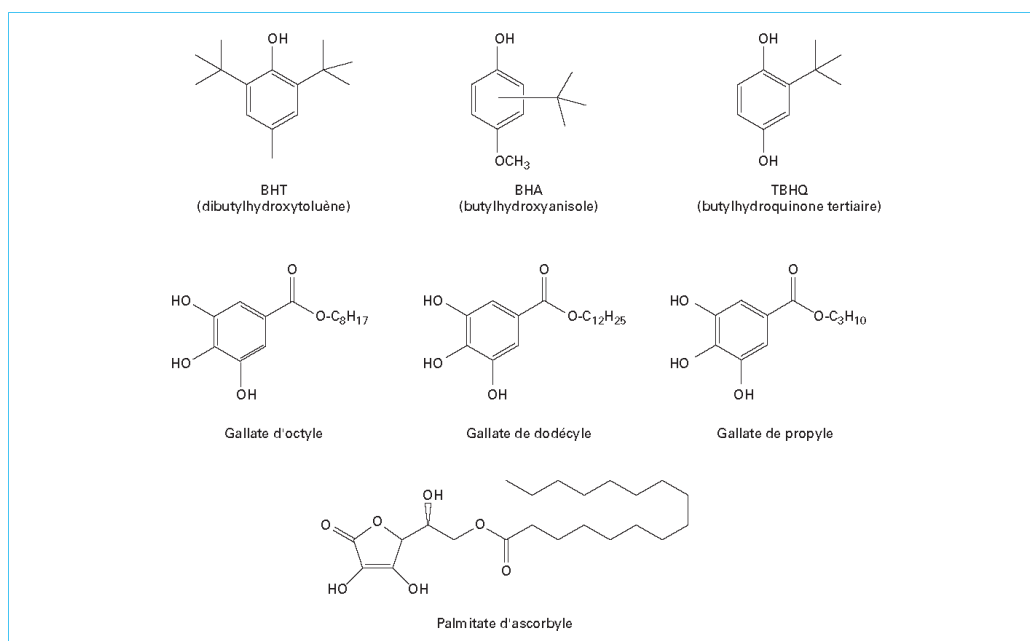


Figure 10 – Formules développées des antioxydants de synthèse couramment utilisés

disodium EDTA, l'acide citrique, l'acide phytique, le sodium gluconate... Les acides phénoliques et flavonoïdes sont également connus pour leur capacité à chélater les métaux de transition [3] [8] [46]. Alors que l'EDTA était auparavant très utilisé en cosmétique, son utilisation dans les produits cosmétiques est en très nette baisse, au profit des chélatants d'origine naturelle tels l'acide phytique ou le sodium gluconate.

4. Antioxydants de synthèse

4.1 Structures et modes d'actions

Pour les antioxydants, il n'existe pas de réglementation spécifique à la cosmétique, donc pas de liste positive comme il en existe pour les agents conservateurs ou les filtres UV (produits solaires) par exemple. Les composés utilisés en tant qu'antioxydants sont généralement ceux autorisés par la législation alimentaire.

Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont (figure 10) :

- le butylhydroxytoluène (BHT, liposoluble) ;
- le butylhydroxyanisole (BHA, liposoluble) ;
- la butylhydroquinone tertiaire (TBHQ, liposoluble) ;
- le gallate de propyle (liposoluble) ;
- le gallate d'octyle (hydrosoluble) ;
- le gallate de dodécyle (liposoluble) [2].

Ces antioxydants sont des composés qui possèdent un **cycle phénolique**. Cette structure spécifique leur confère des propriétés antioxydantes d'intérêt. En effet, l'efficacité d'un antioxydant phénolique dépend de sa capacité à réagir avec les radicaux libres formés. Plusieurs paramètres influencent la vitesse de cette réaction :

- l'énergie de dissociation de la liaison entre l'oxygène et l'hydrogène phénolique O—H [47] ;
- le pH, relatif à la constante de dissociation ;
- le potentiel réducteur ;
- la stabilisation par résonance des radicaux antioxydants.

L'effet électrodonneur des substituants du cycle phénolique, ainsi que l'encombrement stérique impactent la capacité de la molécule à céder un atome d'hydrogène qui réagira avec les radicaux libres formés par l'oxydation. En effet, plus l'énergie de dissociation de la liaison O—H de l'antioxydant phénolique est faible, et plus le transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers un radical peroxyde ou alkyle est thermodynamiquement favorable car la stabilité du radical antioxydant formé s'en trouve augmentée.

Tout composé dont le radical possède un potentiel réducteur plus faible que celui d'un radical issu de l'oxydation peut lui céder un atome d'hydrogène et agir ainsi comme antioxydant. Typiquement, les potentiels réducteurs des radicaux d'acides gras polyinsaturés alkoxyle, peroxyde et alkyle sont respectivement de 1 600, 1 000 et 600 mV, alors que les potentiels réducteurs standard des antioxydants sont inférieurs à 500 mV [12]. De plus, le radical phénolique formé ne catalyse pas la réaction d'oxydation en cours en raison de ce potentiel réducteur plus faible [6]. Les radicaux phénoliques formés présentent également une énergie

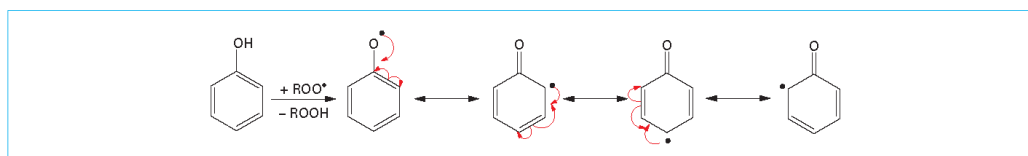


Figure 11 - Stabilisation par résonance des radicaux phénoliques

Tableau 6 - Toxicités démontrées ou supposées du BHA et du BHT pour l'homme et l'animal		
Effets	BHA	BHT
Chez l'homme (suspectés)	<ul style="list-style-type: none"> Augmente le risque de cancer Perturbateur hormonal Neurotoxique Hypertrophie du foie Toxique pour la peau, le foie et les reins Ralentit la croissance cellulaire Augmente les réactions allergiques 	
Chez les animaux (suspectés ou démontrés)	<ul style="list-style-type: none"> Favorise les tumeurs du foie et de l'estomac À forte dose conduit à des lésions du foie et des reins Altération des organes génitaux Diminue l'activité d'enzymes hépatiques Diminue le sommeil Diminue les réflexes Forme des lésions de la thyroïde 	<ul style="list-style-type: none"> Favorise le cancer des poumons Effet hémorragique Altère le taux de cholestérol Altération du système immunitaire Diminue le sommeil Augmente l'agressivité Modification du comportement Endommage l'ADN des organes gastro-intestinaux Action négative sur l'apprentissage Augmente la toxicité de plusieurs composés

plus faible que les radicaux peroxy lipidiques de par la stabilisation par résonance de la forme radicalaire formée (figure 11) [12].

Il existe également d'autres antioxydants de synthèse, dérivés de la vitamine E, qui est un antioxydant naturel (§ 5.3). En effet, la vitamine E est souvent commercialisée sous forme d'acétate de tocophéryle, mais une hydrolyse de la fonction acétate est nécessaire afin d'avoir une activité antioxydante. L'utilisation de cette forme n'est donc pas privilégiée dans les produits cosmétiques.

En revanche, des esters synthétiques de la vitamine E ont été développés en particulier pour la cosmétique, comme par exemple le linoléate de tocophéryle, le nicotinate de tocophéryle et le tocophérol calcium succinate [48]. Un ester synthétique de la vitamine C est également utilisé, à savoir le palmitate d'ascorbyle, liposoluble.

4.2 BHA et BHT : toxicologie et controverse

Le butylhydroxytoluène (BHT) et le butyl hydroxyanisole (BHA) sont les antioxydants de synthèse les plus utilisés. Ils font cependant l'objet depuis plusieurs années de nombreux travaux sur leur toxicité [49].

Tout comme plusieurs composés synthétiques (phtalates, parabènes, bisphénol A, alkyl phénols...), ils sont de plus en plus écartés des formules au profit d'antioxydants naturels comme l'α-tocophérol.

En effet, on leur attribue différents dangers pour la santé et l'environnement. Ainsi, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le BHA parmi les cancérigènes possibles et le BHT parmi les composés dont l'innocuité n'a pas pu être démontrée [50].

La Commission européenne sur la perturbation endocrinienne a listé le BHA comme une substance prioritaire de classification 1. Cette classification est basée sur les preuves de son interférence avec la fonction hormonale. De plus, certaines informations pourraient laisser penser qu'à fortes doses le BHT pourrait simuler l'œstrogène (hormone sexuelle femelle primaire) et empêcher l'expression des hormones sexuelles mâles, ce qui conduirait alors à des effets néfastes sur la reproduction [51] [52].

Il a également été démontré qu'une longue exposition à de fortes doses de BHT est toxique pour le rat et la souris [53] [54]. Cela conduit à des problèmes hépatiques, à la thyroïde, aux reins ainsi qu'au fonctionnement des poumons et à la coagulation du sang. Dans certaines situations, le BHT pourrait favoriser l'apparition de tumeurs [55] [56].

Le tableau 6 présente les toxicités démontrées ou supposées du BHA et du BHT pour l'Homme et l'animal.

En ce qui concerne l'environnement, le BHA est répertorié (Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique nord-est) comme substance chimique potentiellement préoccupante de par sa toxicité sur les organismes aquatiques et son facteur de bioaccumulation [57]. Ce potentiel de bioaccumulation a été classé de moyen à élevé chez les espèces aquatiques par le Programme des Nations unies pour l'environnement.

Les préoccupations sur l'utilisation du BHA et du BHT sont légitimes et importantes. Même s'ils sont actuellement peu réglementés (on peut toutefois noter l'interdiction de l'utilisation du BHA comme ingrédient des parfums), il est à prévoir un durcissement de la réglementation sur ces produits.

Ce document a été délivré pour le compte de 720097598 - éditions t.i./nc AUTEURS //217.109.94.129

5. Antioxydants naturels

5.1 Extraits naturels antioxydants : définitions et modes d'obtention

Les industriels sont confrontés à un enjeu majeur de la santé publique, à savoir l'utilisation de produits de synthèse dans les produits cosmétiques. Les différents problèmes de santé publique causés par des molécules de synthèse et le manque de données sur les toxicités à long terme conduisent à une diminution de leur utilisation. Dans cette optique, des antioxydants naturels sont incorporés dans les formules afin de proposer des produits plus sûrs, ou tout du moins pour rassurer les consommateurs.

Ces antioxydants naturels se trouvent sous forme d'extraits (composition chimique complexe) ou de composés purs.

Plusieurs types d'extraits peuvent être utilisés pour leurs propriétés antioxydantes, on distingue principalement :

- les huiles essentielles ;
- les extraits obtenus à l'aide de solvants organiques ou de fluides supercritiques ;
- certaines huiles végétales.

5.1.1 Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont clairement définies par l'AFNOR. Il s'agit d'extraits obtenus :

- soit à partir de matières premières végétales par distillation à l'eau (hydrodistillation) ou à la vapeur d'eau ;
- soit à partir des fruits de *Citrus* par des procédés mécaniques, l'huile essentielle étant ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ;
- soit par pyrogénéation de certaines écorces ou bois comme le cade (distillation sèche).

Toutes ces techniques ont en commun de ne jamais utiliser de solvants ou produits chimiques.

Les techniques les plus couramment employées sont l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur. Elles sont utilisées sur les végétaux frais ou séchés (racines, bois, graines, feuilles, fleurs...) ou sur des gommés-résines. Pour l'**hydrodistillation**, la matière première est placée dans l'eau portée à ébullition. La vapeur entraîne les composés volatils qui se condensent ensuite dans un serpentin refroidi. Pour l'**entraînement à la vapeur**, on introduit la vapeur d'eau directement au sein de la matière première. Dans les deux cas, le distillat décanse en deux phases. Dans la plupart des cas l'huile essentielle, moins dense que l'eau, surnage. Ces techniques ont pendant longtemps utilisé des équipements traditionnels (alambics à feu nu). Même si l'utilisation de ces dispositifs perdure dans certains pays, les équipements et procédés ont beaucoup progressé (distillation sous vide ou en surpression, turbodistillation, distillation en continu...).

À l'exception des essences obtenues par expression (*Citrus*), les huiles essentielles sont des mélanges de composés volatils, très souvent odorants et dans certains cas allergènes. Cependant, largement connues pour leurs propriétés antioxydantes, elles remplacent souvent les antioxydants de synthèse.

Si les huiles essentielles ou les composés odorants sont souvent utilisés pour leurs propriétés parfumantes en plus de leur efficacité antioxydante, leur utilisation peut toutefois présenter quelques contre-indications dans les produits cosmétiques.

En effet, aux concentrations utilisées, généralement supérieures au pourcent, les huiles essentielles présentent souvent une odeur caractéristique. Si certaines possèdent des notes agréables,

d'autres au contraire peuvent présenter des notes alimentaires (thym, romarin...), peu compatibles avec une application cosmétique. De plus, aux concentrations utilisées, les huiles essentielles peuvent être sources de réactions cutanées, voire d'allergies de contact. De nombreuses substances classées comme allergènes (17 sur 26) par le Comité scientifique des produits de consommation (SCCP) sont fréquemment rencontrées dans les huiles essentielles et aux concentrations utilisées, plusieurs d'entre elles doivent être étiquetées.

Exemple : le linalol présent dans l'huile essentielle de lavande et le cinnamaldéhyde de la cannelle sont des allergènes naturels. Le 7^e amendement de la Directive cosmétique rend leur étiquetage obligatoire s'ils sont présents à plus de 0,001 % en masse dans les produits à rincer et à plus de 0,01 % en masse dans les produits sans rinçage. Notamment pour 0,05 % en masse d'huile essentielle de cannelle de Chine introduite dans un produit fini, le cinnamaldéhyde doit être déclaré quel que soit le type de formule et la coumarine doit être déclarée pour les produits non rincés mais pas pour les produits rincés. Cette huile essentielle contient d'autres allergènes tels que le citral, l'eugénol, le linalol mais en quantités inférieures.

Notons également que dans certains cas, l'emploi des huiles essentielles est limité, notamment chez les personnes dont la peau est sensible, chez les femmes enceintes et les enfants.

5.1.2 Extraits naturels obtenus par solvants

Outre les huiles essentielles, des extraits naturels peuvent être obtenus au moyen de solvants (eau et solvants organiques). Le végétal, généralement haché ou broyé, est mélangé avec un solvant qui a la capacité de solubiliser les métabolites d'intérêt. Une fois les débris végétaux éliminés, le solvant est évaporé (généralement par distillation sous pression réduite) pour conduire à l'extrait qui se présente sous la forme d'une pâte plus ou moins visqueuse ou d'un solide.

Plusieurs solvants peuvent être utilisés. Ils sont le plus souvent organiques (hexane, éther de pétrole, acétate d'éthyle, éthanol, acétone...). L'éthanol et l'acétone peuvent être utilisés en mélange avec l'eau.

Depuis peu, on assiste au développement de l'extraction à l'aide de fluides supercritiques, et plus particulièrement au dioxyde de carbone. En effet, dans des conditions de température et de pression bien précises, ces fluides à l'état supercritique possèdent des propriétés particulièrement intéressantes pour l'extraction.

L'extrait le plus connu pour son activité antioxydante est sans aucun doute celui de **romarin** (*Rosmarinus officinalis* L.), grâce à sa richesse en acides carnosique et rosmarinique.

Le tableau 7 présente quelques exemples d'huiles essentielles et extraits naturels utilisés pour leur activité antioxydante [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67].

5.1.3 Huiles végétales

Enfin, il existe un dernier type d'extraits naturels pouvant être utilisés à des fins antioxydantes dans les produits cosmétiques, à savoir les huiles végétales.

Tableau 7 – Exemples d’huiles essentielles (HE) et d’extraits naturels (EN) utilisés pour leur activité antioxydante

Nom de la plante	Actifs ou familles d’actifs	Références
HE thym <i>Thymus vulgaris</i>	Terpinen-4-ol, γ -terpinène, hydrate de <i>cis</i> -sabinène, linalol, p-cymène	[58] [59] [60]
HE sauge (feuille) <i>Salvia officinalis</i>	α -thuyone, viridiflorol, camphre, 1,8-cinéole, manool, β -caryophyllène, α -humulène, β -thuyone	[58] [60] [61]
HE genévrier (baie) <i>Juniperus communis</i>	α -pinène	[62]
HE girofle (feuille) <i>Eugenia caryophyllata</i> ou <i>Syzygium aromaticum</i>	Eugénol, acétate d’eugényle, β -caryophyllène, 2-heptanone	[58] [60] [63]
HE orange douce (feuille) <i>Citrus sinensis</i>	Limonène	[59]
HE menthe (feuille) <i>Mentha x piperita</i>	Menthol, menthone, acétate de (\pm)-menthyle, 1,8-cinéole, limonène, β -pinène and β -caryophyllène	[59] [60]
HE cannelle (feuille) <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	β -caryophyllène	[63]
HE orange amère <i>Citrus aurantium</i>	Limonène	[63]
HE lavande vraie (fleur) <i>Lavandula angustifolia</i>	Linalol, acétate de linalyle	[59]
EN romarin <i>Rosmarinus officinalis</i>	Acide carnosique, acide rosmarinique	[64]
EN thé vert (feuille) <i>Camellia sinensis</i>	Polyphénols (catéchines)	[65]
EN grenade <i>Punica granatum</i>	Tanins, ellagitanins, acides phénoliques	[66]
EN pépins de pamplemousse <i>Citrus x paradisi</i>	Polyphénols (flavonoïdes)	[67]

Concernant les huiles essentielles HE, les composés cités sont les composés majoritaires.

Les huiles végétales sont obtenues au moyen d’un procédé mécanique traditionnel de pression, appliqué à des graines ou fruits issus de plantes oléagineuses.

La pression dite « à froid » est en réalité mise en œuvre à température ambiante. L’huile issue de cette première pression à froid est qualifiée de vierge, et peut subir comme uniques traitements la centrifugation ou la filtration.

Un procédé de chauffage peut être appliqué aux graines en amont de la pression. Dans ce cas, les huiles doivent être raffinées afin d’être nettoyées de toutes impuretés et qu’elles puissent être commercialisées. Ce procédé de raffinage est souvent utilisé au niveau industriel pour des questions de rendement.

Les huiles végétales sont naturellement plus ou moins riches en antioxydants, ces composés les protégeant contre l’oxydation. Le degré d’insaturation d’une huile permet de définir sa capacité antioxydante. En effet, par définition, plus elle est insaturée, plus elle est riche en antioxydants.

Les huiles végétales les plus connues et communément utilisées pour leur potentiel antioxydant en cosmétique sont celles de graines de soja, de tournesol et de germe de blé.

5.1.4 Discussion

À travers cette large diversité de procédés et la richesse de notre biodiversité, les extraits naturels demeurent une source de matières premières quasiment inépuisable.

Nombreux sont les extraits présentant des propriétés antioxydantes. Ils présentent néanmoins plusieurs limites quant à leur utilisation en tant que tels. Il s’agit principalement :

- de la teneur en actif(s) faible, ce qui nécessite d’utiliser des quantités d’extrait(s) importantes et augmente donc les coûts ;
- de la couleur et/ou l’odeur de l’extrait qui peuvent être impropres à l’utilisation comme matière première cosmétique ;
- de l’aspect de l’extrait (une pâte est difficile à formuler) ;
- ou encore de la solubilité de l’extrait.

Il existe plusieurs solutions pour limiter ces inconvénients. Les extraits naturels sont des mélanges de composés organiques dont une partie seulement peut présenter de l’intérêt pour le formulateur. Il faut donc l’isoler, ou du moins l’enrichir, pour optimiser l’extrait.

Ainsi, dans le cas des huiles essentielles, il est possible par des procédés physiques classiques, basés sur le principe de la distillation, d’enrichir l’extrait en actif(s) : ce sont des techniques dites de rectification.

Il en est de même pour les extraits obtenus à l'aide de solvants organiques qui en plus sont très souvent trop colorés et peuvent poser des problèmes d'esthétique. Leur fractionnement par **distillation moléculaire** permet tout à la fois d'éliminer les substances responsables de la coloration, de concentrer les molécules actives, voire d'isoler à l'état pur des actifs, par une technique sous vide poussé assez proche de celle de la distillation fractionnée.

Pour formuler avec des extraits solides, ce qui est bien plus pratique, il est courant d'utiliser un support solide comme la maltodextrine ou la silice. Cela permet également bien souvent d'augmenter la solubilité de l'extrait.

5.2 Familles d'actifs

Bien souvent, les actifs responsables de l'activité antioxydante d'un extrait végétal sont ceux de la fraction volatile, et on les retrouve généralement dans l'huile essentielle de la plante. Les groupements fonctionnels de type phénoliques, cétoniques ou aldéhydiques sont principalement responsables de ces activités. Ainsi, on compte les mono-, les sesquiterpènes et les composés phénoliques parmi les principales familles conférant leur activité aux antioxydants naturels.

Exemple : l'acide rosmarinique est l'un des composés les plus connus pour son activité antioxydante dans les extraits végétaux, car il est présent dans des herbes aromatiques de la famille des Lamiaceae telles que le romarin, la mélisse, l'origan, la sauge, le thym ou encore la menthe. Il s'agit d'un ester d'acide caféique et d'acide lactique 3,4-dihydroxyphényle [68].

5.3 Autres types d'antioxydants naturels

Au-delà de l'utilisation d'extraits naturels à l'état brut, les actifs antioxydants peuvent également être utilisés sous forme pure. Ils peuvent être isolés directement ou dérivés des matières premières végétales par des procédés physico-chimiques (distillation, bio-conversion...). L'utilisation de molécules pures présente de nombreux avantages.

En effet, il est beaucoup plus facile de formuler un composé connu et dont les propriétés physico-chimiques sont bien définies qu'un extrait complexe et mal connu.

Néanmoins, ce procédé est très onéreux, et il peut également être très laborieux compte tenu de la complexité chimique des produits naturels.

De nombreux antioxydants naturels sont utilisés dans les produits cosmétiques en raison de leur activité notable. Le plus courant est l' **α -tocophérol**, **liposoluble**, un tocophérol de la famille des vitamines liposolubles, également appelé vitamine E. C'est le tocophérol ayant l'activité vitaminique la plus importante en raison de son occurrence naturelle et de sa biodisponibilité. Il est issu de nombreuses matières premières, notamment le germe de blé, le soja et le tournesol. Sont également couramment utilisés l'acide sorbique (hydrosoluble), l'acide L-ascorbique (hydrosoluble), ou encore le γ -oryzanol, issu de l'huile de son de riz (figure 12) [69]. Des mélanges de tocophérols (isomères α , β , γ et δ) sont également commercialisés en tant qu'antioxydants naturels. Notons également que lorsque les composés sont bien connus, leur toxicité l'est également, ce qui permet de rassurer le consommateur quant à l'innocuité des produits qu'il utilise.

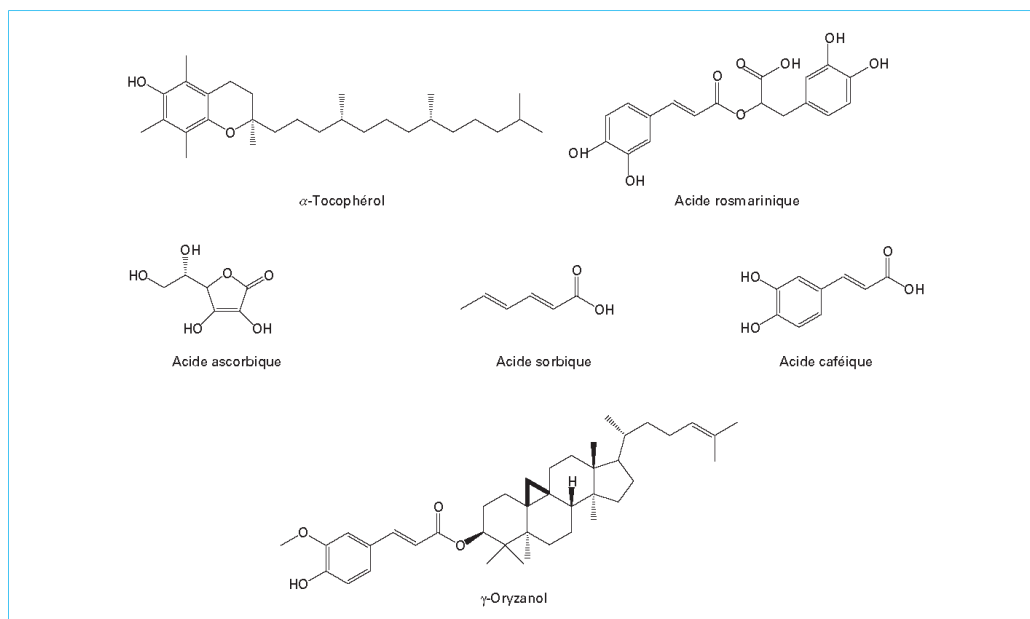


Figure 12 – Formules développées de quelques antioxydants naturels

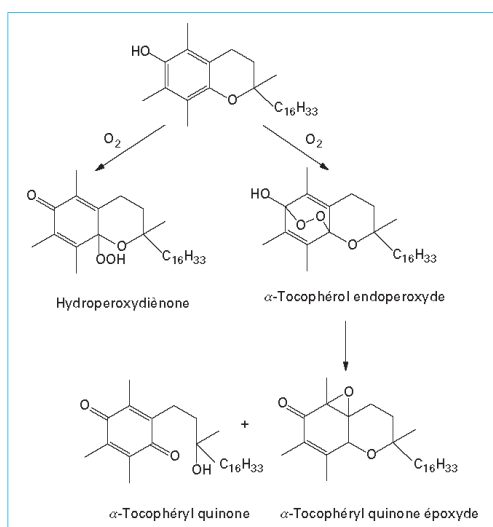


Figure 13 – Action oxydante du tocophérol avec l'oxygène singulet

Exemple : la toxicité de la vitamine E a été largement étudiée [70]. Celle-ci peut être formulée à des concentrations beaucoup plus importantes que le BHA et le BHT sans effets délétères, en raison de sa toxicité beaucoup plus faible.

5.4 Mode d'action des antioxydants naturels

Le mécanisme d'action des huiles essentielles et extraits naturels utilisés à titre d'antioxydants peut être observé et déterminé directement par les tests d'activité antioxydante précédemment décrits (§ 2.1).

Notons que le choix des matières premières peut s'avérer problématique. En effet, certaines huiles contiennent des antioxydants naturels, mais cela peut présenter un inconvénient majeur.

Exemple : l'oxydation de l'α-tocophérol (vitamine E) mène à l'ouverture d'un des cycles de la molécule. Ce processus conduit à la formation de l'α-tocoquinone, molécule de couleur rouge. Une huile riche en tocophérol peut donc être efficace contre le rancissement, mais son oxydation provoque l'apparition d'une couleur rouge, peu souhaitée dans un produit cosmétique [71].

Concernant la **vitamine E** en particulier, on lui décerne souvent le titre de « protecteur » car elle possède une capacité remarquable à neutraliser les radicaux libres, notamment les peroxydes lipidiques. Elle peut également mener son action antioxydante par réaction avec l'oxygène singulet (figure 13) [6].

Par ailleurs, la **vitamine C** est souvent ajoutée en complément à la vitamine E dans les produits cosmétiques car elle permet de régénérer la vitamine E après que celle-ci ait réduit la réaction de peroxydation lipidique (figure 14).

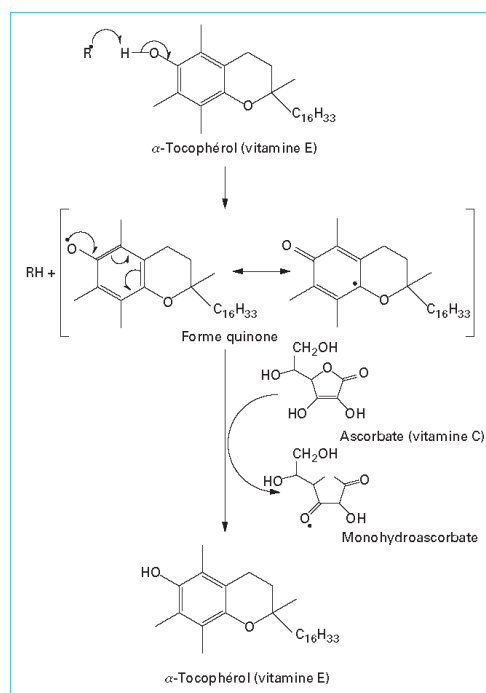


Figure 14 – Action antioxydante du tocophérol avec les radicaux libres, en synergie avec la vitamine C

5.5 Cas des cosmétiques biologiques

Dans le but de s'adapter à la demande du marché et des consommateurs, la cosmétique naturelle et biologique connaît une croissance fulgurante dans la jungle des produits cosmétiques, alors que les produits de synthèse sont souvent rejetés.

Ainsi, de plus en plus, des antioxydants naturels sont incorporés dans les produits cosmétiques certifiés biologiques. Comme vu précédemment, ceux-ci peuvent être isolés directement à partir des matières premières naturelles ou dérivés de celles-ci.

Concernant les termes « naturel » et « biologique », un produit naturel est simplement constitué de matières premières naturelles mais n'est pas forcément « biologique », alors qu'un produit « biologique » est en partie naturel puisqu'il est constitué d'un certain pourcentage de matières premières naturelles.

Un cosmétique peut être défini comme « biologique » lorsqu'il répond à un certain nombre de critères relatifs à sa production, sa fabrication et sa conservation.

De nombreux labels existent en France, tels qu'ECOCERT, le plus connu, ou encore COSMOS, et en Europe (BDIH en Allemagne par exemple).

Ce document a été délivré pour le compte de 7200097598 - éditions t.i./nc AUTEURS //217.109.94.129

Ces labels définissent un cahier des charges, en réponse auquel un produit cosmétique est certifié biologique ou non.

En revanche, il faut bien prendre conscience que la composition en ingrédients certifiés biologiques n'est jamais égale à 100 %, et que les différents labels avec leurs revendications toujours inventives sont essentiellement sources de confusion pour le consommateur, qui s'y perd souvent à choisir un produit cosmétique biologique [72] [73].

Pour plus d'informations sur la cosmétique biologique, se référer au dossier [J 2 284].

6. Conclusions et perspectives

De leur conception à leur utilisation par le consommateur en passant par leur stockage ou mise en rayon sur leur lieu de vente, les produits cosmétiques sont inévitablement soumis à l'oxydation lorsqu'ils se trouvent au contact d'un ou plusieurs facteurs d'oxydation tels que les rayons ultraviolets, l'oxygène, une température élevée ou encore la présence de catalyseurs métalliques.

Le **choix de matières premières** dont l'état d'oxydation est bien établi et rigoureusement respecté permet d'engager un travail de formulation limitant l'oxydation induite et catalysée par des produits d'oxydation qui seraient déjà présents.

Par ailleurs, le **choix d'un packaging** adapté, déterminé en fonction de l'utilisation future du produit ainsi que de sa potentielle exposition permet de limiter considérablement les risques de

dégradation, notamment ceux générés par les contacts répétés avec l'oxygène de l'air et l'exposition à la lumière.

L'incorporation d'**agents antioxydants adéquats** reste enfin la solution préconisée pour assurer au produit une protection efficace et durable. Puisqu'il n'existe **pas de réglementation spécifique** à la nature des agents antioxydants pour la cosmétique, l'industriel possède une certaine liberté quant aux choix effectués dans ce domaine.

Alors que les mécanismes d'oxydation sont multiples, les mécanismes antioxydants le sont également et les associations d'agents antioxydants sont bien souvent judicieuses. L'ajout de chélateurs de métaux, synthétiques ou naturels, est bien souvent nécessaire pour assurer une protection totale du produit considéré.

L'utilisation de certains antioxydants de synthèse étant controversée et de plus en plus rejetée par les consommateurs, le **naturel** est de plus en plus plébiscité et il s'agit bien souvent d'une solution de choix pour les industriels.

En effet, les végétaux sont une source intarissable d'antioxydants et l'industriel cosmétique se voit offrir de nombreuses possibilités de valorisation de ces composés naturels.

Alors que les extraits végétaux peuvent assurer une couverture antioxydante complète grâce à leur complexité, les molécules purifiées doivent généralement être associées pour une efficacité totale et durable.

Ainsi, l'avancée de la recherche dans la compréhension des mécanismes d'oxydation et des modes d'action antioxydants, combinée à une meilleure connaissance du règne végétal, permet de proposer de multiples solutions pour une protection et une durée de vie optimale des produits cosmétiques tout en respectant d'une part des cahiers des charges de plus en plus stricts, et d'autre part en répondant aux attentes toujours plus strictes des consommateurs.

Conservateurs pour cosmétiques

Antioxydants et anti-UV

par **Xavier FERNANDEZ**

Docteur en sciences, HDR
Professeur à l'Université de Nice-Sophia Antipolis
Directeur du Master 2 Professionnel chimie formulation, analyse et qualité (FOQUAL)
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Florence MERCK

Master valorisation des ressources végétales (Université de Strasbourg)
Doctorante en chimie
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

et **Audrey KERDUDO**

Ingénieur chimiste (ENSC de Rennes)
Doctorante en chimie
SOFIA Cosmétiques
Institut de chimie de Nice UMR CNRS 7272, Université de Nice-Sophia Antipolis

Sources bibliographiques

- [1] HUANG (D.), OU (B.) et PRIOR (R.L.). – *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, p. 1841-1856 (2005).
- [2] MARTINI (M.-C.). – *Matières premières utilisées dans la formulation cosmétique des topiques cutanés*. Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie, MARTINI (M.-C.) Ed., Lavoisier, p. 305-332 (2003).
- [3] GARRISON (M.) et DAYAN (N.). – *Formulating cosmetics with natural oils, fats, butters, and waxes*. Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products, DAYAN (N.) et KROMIDAS (L.) Ed., Wiley, p. 215-238 (2011).
- [4] FRANKEL (E.N.). – *Lipid oxidation: mechanism, products, and biological significance*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 61(12), p. 1908-1917 (1984).
- [5] FRANKEL (E.N.). – *Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality*. Food Chemistry, 57(1), p. 51-55 (1996).
- [6] CHOE (E.) et MIN (D.B.). – *Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8, p. 345-358 (2009).
- [7] CHAIYASIT (W.), ELIAS (R.J.), McCLEMENTS (D.J.) et DECKER (E.A.). – *Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47, p. 299-317 (2007).
- [8] LAGUERRE (M.), LECOMTE (J.) et VILLENEUVE (P.). – *Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges*. Progress in Lipid Research, 46, p. 244-282 (2007).
- [9] WANG (S.), HWANG (H.), YOON (S.) et CHOE (E.). – *Temperature dependence of autooxidation of perilla oil and tocopherol degradation*. Journal of Food Science, 75, p. C498-C505 (2010).
- [10] VELASCO (J.) et DOBARGANES (C.). – *Oxidative stability of virgin olive oil*. European Journal of Lipid Science and Technology, 104, p. 661-676 (2002).
- [11] KIL (N.) et CHOE (E.). – *Effect of monoacylglycerols on the oil oxidation of acidic water/perilla oil emulsion under light in the presence of chlorophyll*. Food Science Biotechnology, 21(1), p. 183-189 (2012).
- [12] CHOE (E.) et MIN (D.R.). – *Mechanisms and factors for edible oil oxidation*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5, p. 169-186 (2006).
- [13] MOURE (A.), CRUZ (J.M.), FRANCO (D.), DOMÍNGUEZ (J.M.), SINEIRO (J.), DOMÍNGUEZ (H.), NÚÑEZ (M.J.) et PARAJÓ (J.C.). – *Natural antioxidants from residual sources*. Food Chemistry, 72, p. 145-171 (2001).
- [14] BRANEN (A.L.) et DAVIDSON (P.). – *Use of antioxidants in self-preserving cosmetic and drug formulations*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs, Principles and Practice, KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.) Ed., DEKKER (M.), p. 159-179 (1996).
- [15] SINGLETON (V.L.), ORTHOFER (R.) et LAMUELA-RAVENTOS (R.M.). – *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*. Methods of Enzymology, Ed., Academic Press, 299, p. 152-178 (1999).
- [16] PULIDO (R.), BRAVO (L.) et SAURA-CALIXTO (F.). – *Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay*. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 48, p. 3396-3402 (2000).
- [17] MENDEZA (E.), SANHUEZAB (J.), SPEISKYB (H.) et VALENZUELAB (A.). – *Validation of the rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils*. JAOCS, 73, p. 1033-1037 (1996).
- [18] MANCEBO-CAMPOS (V.), DESAMPARADOS SALVADOR (M.) et FREGAPANE (G.). – *Comparative study of virgin olive oil behavior under rancimat accelerated oxidation conditions and long-term room temperature storage*. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 55, p. 8231-8236 (2007).
- [19] MAGALHAES (L.M.), SEGUNDO (M.A.), REIS (S.) et LIMA (J.L.F.C.). – *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. Analytica Chimica Acta, 613, p. 1-19 (2008).
- [20] ARTS (J.M.T.J.), DALLINGA (J.S.), VOSS (H.P.), HAENEN (G.R.M.M.) et BAST (A.). – *A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay*. Food Chemistry, 80, p. 409-414 (2003).
- [21] ARTS (J.M.T.J.), DALLINGA (J.S.), VOSS (H.P.), HAENEN (G.R.M.M.) et BAST (A.). – *A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures*. Food Chemistry, 88, p. 567-570 (2004).
- [22] ARTS (J.M.T.J.), DALLINGA (J.S.), VOSS (H.P.), HAENEN (G.R.M.M.) et BAST (A.). – *A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures*. Food Chemistry, 88, p. 567-570 (2004).
- [23] ZULUETA (A.), ESTEVE (M.J.) et FRIGOLA (A.). – *ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products*. Food Chemistry, 114, p. 310-316 (2009).

CONSERVATEURS POUR COSMÉTIQUES

- [24] BRAND-WILLIAMS (W.), CUVÉLIER (M.E.) et BERSET (C.). – *Use of a free radical method to determinate antioxidant activity*. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 28, p. 25-30 (1995).
- [25] GOUPY (P.), DUFOUR (C.), LOONIS (M.) et DANGLES (O.). – *Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 15, p. 615-622 (2003).
- [26] BENZIE (I.F.F.) et STRAIN (J.J.). – *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of « antioxidant power » : the FRAP assay*. Analytical Biochemistry, 239, p. 70-76 (1996).
- [27] GARDNER (P.T.), WHITE (T.A.C.), Mc PHAIL (D.B.) et DUTHIE (G.G.). – *The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices*. Food Chemistry, 68, p. 471-474 (2000).
- [28] OU (B.), HAMPSCHE-WOODILL (M.) et PRIOR (R.L.). – *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescence probe*. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 49, p. 4619-4626 (2001).
- [29] PRIOR (R.L.), HOANG (H.), GU (L.), WU (X.), BACCIOCCA (M.), HOWARD (L.), HAMPSCHE-WOODILL (M.), HUANG (D.), OU (B.) et JACOB (R.). – *Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity [ORACFL] of plasma and other biological and food samples*. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 51, p. 3273-3279 (2003).
- [30] NIEDERLANDER (H.A.G.), VAN BEEK (T.A.), BARTASIUTE (A.) et KOLEVA (I.I.). – *Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1210, p. 121-134 (2008).
- [31] FEDOR (G.R.) et BRENNAN (P.J.). – *Comparison between natural weathering and fluorescent UV exposures : UVA-340 lamp test results. Durability testing of non-metallic materials*. HERLING (R.J.) Ed., American Society for Testing and Material, p. 91-105 (1996).
- [32] BRENNAN (P.) et FEDOR (C.). – *Sunlight, UV and accelerated weathering*. Society of Plastics Engineers Automotive RETEC (1987).
- [33] BRENNAN (P.J.). – *Improved UV light source enhances correlation in accelerated weathering*. Plastics Compounding, mars-avr. 1987.
- [34] SCALZO (M.), SANTUCCI (E.), CERRETO (F.) et CARAFA (M.). – *Model lipophilic formulations of retinyl palmitate : influence of conservative agents on light-induced degradation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 34, p. 921-931 (2004).
- [35] LAGUERRE (M.), LOPEZ-GIRALDO (L.J.), PINA (M.) et VILLENEUVE (P.). – *Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante*. Oléagineux Corps gras Lipides, 14(5), p. 278-292 (2007).
- [36] NAGHSHINEH (M.), ARIFFIN (A.A.), GHAZALI (H.M.), MIRHOSSEINI (H.) et MOHAMMAD (A.S.). – *Effect of saturated/unsaturated fatty acid ratio on physicochemical properties of palm olein-olive oil blend*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 87, p. 255-262 (2010).
- [37] JUDDÉ (A.). – *Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ?* Oléagineux, Corps gras, Lipides, 11, p. 414-418 (2004).
- [38] VAN EYS (J.E.), OFFNER (A.) et BACH (A.). – *Analyses chimiques. Analyse de la qualité des produits de soja utilisés en alimentation animale*. The American Soybean Association Europe, chap. 8, p. 30-80.
- [39] SHAHIDI (F.) et ZHONG (Y.). – *Lipid oxidation : measurement methods*. Bailey's Industrial Oil and Fats Products, SHAHIDI (F.) Ed., John Wiley & Sons, 6th ed., p. 357-385 (2005).
- [40] KUCUK (M.) et CANER (C.). – *Effect of packaging materials and storage conditions on sunflower oil quality*. Journal of Food Lipids, 12(3), p. 222-231 (2005).
- [41] VARVARESOU (A.), PAPAGEORGIOU (S.), TSIRIVAS (E.), PROTAPAPA (E.), KINTZIOU (H.), KEFALA (V.) et DEMETZOS (C.). – *Self-preserving cosmetics*. International Journal of Cosmetic Science, 31, p. 163-175 (2009).
- [42] VARVARESOU (A.) et PAPAGEORGIOU (S.). – *The development of self-preserving gels*. Household and Personal Care TODAY, 4, p. 20-23 (2010).
- [43] BRANNAN (D.K.). – *The role of packaging in product preservation*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs, Principles and Practice. KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.) Ed., DEKKER (M.), p. 227-242 (1996).
- [44] COLTRO (L.) et BORGHETTI (J.). – *Plastic packages for personal care products – Evaluation of light barrier properties*. Polimeros, Ciência e Tecnologia, 17(1), p. 56-61 (2007).
- [45] STOHS (S.J.) et BACCHI (D.). – *Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions*. Free Radical Biology et Medicine, 18(2), p. 321-336 (1995).
- [46] KABARA (J.J.). – *Chelating agents as preservative potentiators*. Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs, Principles and Practice. KABARA (J.J.) et ORTH (D.S.) Ed., DEKKER (M.), p. 209-226 (1996).
- [47] CAO (W.), CHEN (W.), SUN (S.), GUO (P.), SONG (J.) et TIAN (C.). – *Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method*. Journal of Molecular Structure, THEOCHEM, 817, p. 1-4 (2007).
- [48] VOGEL (F.G.M.), SPERLING (K.) et PUGLIESE (P.T.). – *Vitamin E – nicotinate : a new active agent in cosmetics*. Parfümerie und Kosmetik, 68(9), p. 540-544 (1987).
- [49] WILLIAMS (G.M.), IATROPOULOS (M.J.) et WHYSNER (J.). – *Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additive*. Food and Chemical Toxicology, 37, p. 1027-1038 (1999).
- [50] LANIGAN (R.S.) et YAMARIK (T.A.). – *Final report on the safety assessment of BHT*. International Journal of Toxicology, 21 (Suppl. 2), p. 19-24 (2002).
- [51] GOSSELIN (R.E.), SMITH (R.P.) et HODGE (H.C.). – *Clinical toxicology of commercial products*. Ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 5^e édition, p. II-405-406, III-344-348 (1984).
- [52] IVERSON (F.). – *Phenolic antioxidants : health protection branch studies on butylated hydroxyanisole*. Cancer Letters, 93, p. 49-54 (1995).
- [53] FAINE (L.A.), RODRIGUES (H.G.), GALHARDI (C.M.), EBAID (G.M.X.), DINIZ (Y.S.), FERNANDES (A.A.H.) et NOVELLI (E.L.B.). – *Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress : effect on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats*. Experimental and Toxicologic Pathology, 57, p. 221-226 (2006).
- [54] KANG (H.G.), JEONG (S.H.), CHO (J.H.), KIM (D.G.), PARK (J.M.) et CHO (M.H.). – *Evaluation of estrogenic and androgenic activity of butylated hydroxyanisole in immature female and castrated rats*. Toxicology, 213, p. 147-156 (2005).
- [55] GRESSANI (K.M.), LEONE-KABLER (S.), O'SULLIVAN (M.G.), CASE (L.D.), MALKINSON (A.M.) et MILLER (M.S.). – *Strain-dependent lung tumor formation in mice transplacentally exposed to 3-methylcholanthrene and post-natally exposed to butylated hydroxytoluene*. Carcinogenesis, 20, p. 2159-2165 (1999).
- [56] JEONG (S.H.), KIM (B.Y.), KANG (H.G.), KU (H.O.) et CHO (J.H.). – *Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats*. Toxicology, 71, p. 183-192 (2005).
- [57] JOS (A.), REPETTO (G.), RIOS (J.C.), PESCO (A.), SALGUERO (M.), HAZEN (M.J.), MOLERO (M.L.), FERNANDEZ-FREIRE (P.), PEREZ-MARTIN (J.M.), LEBRADOR (V.) et CARMAN (A.). – *Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using battery with six model systems and eighteen endpoints*. Aquatic Toxicology, 71, p. 183-192 (2005).
- [58] VIUDA-MARTOS (M.), RUIZ NAVAJAS (Y.), SANCHEZ ZAPATA (E.), FERNANDEZ-LOPEZ (J.) et PEREZ-ALVAREZ (J.A.). – *Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet*. Flavour and Fragrance Journal, 25(1), p. 13-19 (2010).
- [59] MIGUEL (M.G.). – *Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils : a short review*. Molecules, 15, p. 9252-9287 (2010).
- [60] ADORJAN (B.) et BUCHBAUER (G.). – *Biological properties of essential oils : an updated review*. Flavour and Fragrance Journal, 25, p. 407-426 (2010).
- [61] BOZIN (B.), MIMICA-DUKIC (N.), SAMOJLIK (I.) et JOVIN (E.). – *Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) essential oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, p. 7879-7885 (2007).
- [62] WEI (A.) et SHIBAMOTO (T.). – *Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, p. 1737-1742 (2007).
- [63] WEI (A.) et SHIBAMOTO (T.). – *Antioxidant/lipoxigenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, p. 7218-7225 (2010).
- [64] ERKAN (N.), AYRANCI (G.) et AYRANCI (E.). – *Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol*. Food Chemistry, 110(1), p. 76-82 (2008).
- [65] CHU (K.O.), CHAN (K.P.), WANG (C.C.), CHU (C.Y.), LI (W.Y.), CHOY (K.W.), ROGERS (M.S.) et PANG (C.P.). – *Green tea catechins and their oxidative protection in the rat eye*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, p. 1523-1534 (2010).
- [66] REDDY (M.K.), GUPTA (S.K.), JACOB (M.R.), KHAN (S.I.) et FERREIRA (D.). – *Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from Punica granatum L.* Planta Medica, 73(5), p. 461-467 (2007).
- [67] GOULAS (V.) et MANGANARIS (G.A.). – *Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of citrus fruits grown in cyprus*. Food Chemistry, 131, p. 39-47 (2012).

- [68] DWECK (A.C.). – *Natural actives*. Formulating natural cosmetics. DWECK (A.C.) Ed., Allured Books, p. 365-400 (2011).
- [69] LUPO (M.P.). – *Antioxidants and vitamins in cosmetics*. Clinics in Dermatology, 19, p. 467-473 (2001).
- [70] KAHL (R.) et KAPPUS (H.). – *Toxikologie der synthetischen antioxidativen BHA und BHT im Vergleich mit dem natürlichen Antioxidans Vitamin E*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 196, p. 329-338 (1993).
- [71] CHAVERON (H.). – *Molécules toxiques*. Dans « Introduction à la toxicologie nutritionnelle » Ed. TEC & DOC, Lavoisier, Paris, p. 98 (1999).
- [72] CHANG (Y.H.). – *Consumer and formulator of natural cosmetics : understanding and integrating each others needs*. Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products, DAYAN (N.) et KROMIDAS (L.) Ed., Wiley, p. 15-26 (2011).
- [73] ROSHOLT (A.P.). – *Regulatory perspective of natural and organic cosmetic products*. Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic products, DAYAN (N.) et KROMIDAS (L.) Ed., Wiley, p. 51-65 (2011).
- [74] CHENEVOY (C.). – *Face à la polémique des parabènes, la cosmétique BIO est-elle la bonne alternative ?* Thèse, Université Joseph Fourier, Faculté de pharmacie de Grenoble (2011).
- [75] EYMARD (S.). – *Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chin-chard (Trachurus trachurus) : choix des procédés*. Thèse, Université de Nantes, Ifremer (2003).
- [76] RONDEL (C.). – *Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives*. Thèse, Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse (2009).
- [77] HITESHKUMR (D.). – *Self assembly in aqueous and non-aqueous sugar-oil mixtures*. Thèse, University of Cincinnati (2008).
- [78] BÉREAU (D.). – *Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens*. Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (2001).
- [79] SAINT CRICQ RIVIÈRE (P.). – *Matériaux hybrides fonctionnels photoactifs : Stratégie d'élaboration, caractérisation et activité*. Thèse, Université de Pau et des Pays de l'Adour (2009).

À lire également dans nos bases

- AUBRY (J.-M.) et SCHORSCH (G.). – *Formulation – Présentation générale*. [J 2 110] Principes de formulation (1999).
- FERNANDEZ (X.), MERCK (F.) et KERDUDO (A.). – *Conservateurs pour les cosmétiques – Généralités et conservateurs antimicrobiens*. [J 2 284] Principes de formulation (2012).
- GARNERO (J.). – *Huiles Essentielles*. [K 345] Constantes chimiques (1996).
- OLLÉ (M.). – *Analyse des corps gras*. [P 3 325] Techniques d'analyse (2002).
- CARETTE (L.). – *Stabilisants*. [A 3 232] Plastiques et composites (1992).
- LORIENT (D.). – *Modifications biochimiques des constituants alimentaires*. [F 3 400] Bioprocédés (1998).

Sites Internet

- CIR : Cosmetic Ingredient Review
<http://www.cir-safety.org/>
 (page consultée le 14 février 2012)
- COSMOS-standard AISBL : référentiel européen COSMOS de la cosmétique biologique
<http://www.cosmos-standard.org/>
 (page consultée le 29 février 2012)
- Cosmetic Research Group : site dédié aux trois marques de produits cosmétiques du groupe, Soskin, Tom Robin et Hélonature
<http://www.cosmetic-research-group.com>
 (page consultée le 15 février 2012)
- CEAL Cellule Expert Additifs-Ingrédients : base de donnée contenant plus de 1 200 actifs et additifs, dossier sur les acides organiques
http://www.adrianor.com/adrianor/page_ceal1.htm
 (page consultée le 25 février 2012)
- EAU THERMALE AVENE : dispositif de fermeture DEFI
http://www.eau-thermale-avene.com/fr_FR/gamme?tid=6
<http://www.youtube.com/watch?v=EeqefnGrf5Xk>
 (sites consultés le 2 février 2012)
- LE FLACON : site dédié à la composition des produits cosmétiques
<http://leflacon.free.fr/>
 (page consultée le 22 janvier 2012)
- PARISPACK : fabrication et conditionnement pour la cosmétique et le parfum
<http://www.parispack.fr>
 (page consultée le 12 décembre 2011)
- The American Soybean Association Europe : document portant sur l'analyse des corps gras lipidiques
<http://www.asaim-europe.org/backup/pdf/ASA%20Manual%20French.pdf>

Événements – Congrès

- Beyond Beauty Events – Salons internationaux des fournisseurs et marques de la beauté et du bien-être
http://beyondbeautyevents.com/bbe/fr/bbe_00_Home.asp
- Congrès Beauté & Packaging – Le packaging des parfums et cosmétiques
http://www.beautepackaging.com/1/fr_FR/page/217
- Congrès International des Plantes Aromatiques et Médicinales – Journées Internationales des Huiles Essentielles et des Extraits – Association pour la promotion des Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales, a lieu tous les ans à Digne-les-Bains (04)
<http://www.appam.online.fr/>
- Congrès parfums et cosmétiques – Les enjeux réglementaires des industries du parfum et de la cosmétique
<http://www.congres-parfums-cosmetiques.com/>
- Cosmetic & Sensory – L'analyse sensorielle et la cosmétique
<http://www.cosmeticandsensory.fr/fr/>
- Cosmoprof – Salon international des parfums et cosmétiques
<http://www.cosmoprof.com/en/trade-show/chi-siam/>
- In-Cosmetics – Salon international des matières premières et technologies pour la cosmétique
<http://www.in-cosmetics.com/>
- 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – 28 juillet au 1^{er} août 2012, New York, USA
<http://icnpr2012.org/>
- International Symposium on Essential Oils – 5 au 8 septembre 2012, Lisbonne, Portugal
<http://iseo2012.fc.ul.pt/>
- Packaging Parfums, Cosmétiques & Design – Salon de l'innovation dans le domaine des packagings
<http://www.pcd-congress.com/fr/>
- Salon mondial Spa & Beauté – Salon international des professionnels de l'esthétique et du Spa
<http://www.msbsparis.com/fr/accueil.php>
- Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales – a lieu tous les ans à Grasse (06)
<http://www.aromatherapie.ville-grasse.fr/>

Normes et standards

- NFEN ISO 660 Corps gras d'origine animale et végétale – Détermination de l'indice d'acide et de l'acidité
- NFEN ISO 3656 Corps gras d'origine animale et végétale – Détermination de l'absorbance dans l'ultraviolet, exprimée sous la forme d'extinction spécifique en lumière ultraviolette

CONSERVATEURS POUR COSMÉTIQUES

NF EN ISO 3961	Corps gras d'origine animale et végétale – Détermination de l'indice d'iode	NF EN ISO 6885	Corps gras d'origine animale et végétale – Détermination de l'indice d'anisidine
NF EN ISO 3960	Corps gras d'origine animale et végétale – Détermination de l'indice de peroxyde – Détermination avec point d'arrêt iodométrique	EN ISO 6886	Corps gras d'origine animale et végétale – Détermination de la stabilité à l'oxydation (Test d'oxydation accéléré)

Réglementation

Décision 96/335/CE de la Commission du 3 mai 1996 portant établissement d'un inventaire et d'une nomenclature commune des ingrédients employés dans les produits cosmétiques (texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). Journal officiel n° L 132 du 01/06/1996 p. 0001-0634

Directive cosmétique du conseil 76/768/CEE du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des Etats membres relatives aux produits cosmétiques

Annuaire

Constructeurs – Fournisseurs – Distributeurs (liste non exhaustive)

Fournisseurs de conservateurs

- ARCH CHEMICALS (LONZA)**
<http://www.archchemicals.com/fed/pc>
(page consultée le 20 mars 2012)
- CLARIANT**
<http://www.personalcare.clariant>
(page consultée le 4 mars 2012)
- DOW CHEMICAL**
<http://www.dow.com/products/market/personal-care-and-apparel/>
(page consultée le 23 mars 2012)
- LONZA**
<http://www.lonza/en/products-services/personal-care/search-by-brand/geogard.aspx>
(page consultée le 4 mars 2012)
- SEPPIC**
<http://www.seppic.com/cosmetics/antifungal-preservative-agent-@/2620/view-935-category.html>
(page consultée le 4 mars 2012)
- SCHÜLKE & MAYER**
<http://www.schuelke.fr/cosmetique>
(page consultée le 23 mars 2012)
- TRI-K INDUSTRIES**
<http://www.tri-k.com/preservatives.shtml>
(page consultée le 23 mars 2012)
- UNIVAR**
<http://www.univareurope.com/fr/fr/Cosmetiques/110/>
(page consultée le 30 mars 2012)
- Fournisseur d'extraits naturels et huiles essentielles**
- ALBAN MÜLLER**
<http://www.albanmuller.com/>
(page consultée le 3 mars 2012)
- ALBERT VIEILLE**
<http://www.albertvieille.com/fr/pge/produits/>
(page consultée le 3 mars 2012)
- BERNARDI**
<http://www.bernardi-oil.com>
(page consultée le 29 mars 2012)
- BIO-BOTANICA**
<http://www.bio-botanica.com/cosmetic.aspx>
(page consultée le 19 mars 2012)
- COSMETOCHEM**
<http://www.cosmetochem.com/index.cfm>
(page consultée le 19 mars 2012)
- MANE**
<http://www.mane.com/ingredients>
(page consultée le 3 mars 2012)
- NATUREX**
<http://www.naturex.fr/catalogues/personal-care.html>
(page consultée le 15 novembre 2011)
- PAYAN-BERTRAND**
<http://www.payanbertrand.com/>
(page consultée le 3 mars 2012)
- ROBERTET**
http://www.robertet.com/matieres_premieres/presentation.php
(page consultée le 3 mars 2012)

VEGE TECH
<http://www.vegetech.com/products.htm>
(page consultée le 21 mars 2012)

Autres

- Chemie research & manufacturing** : fabricant d'extrait de pépin de pamplemousse
<http://p50inc.com/index.phtml>
- COSMETOCHEM** : fournisseur de matières premières végétales
<http://www.cosmetochem.com/index.cfm>
- POLYONE** : Industrie des matériaux polymériques – propose des matériaux pour la conception de packaging optimisé, contenant par exemple des filtres UV et des antioxydants
<http://www.polyone.com/>
- Q-LAB** : Enceintes de vieillissement accéléré au Xénon ou aux UV
<http://www.q-lab.com/fr-fr>
(page consultée le 9 juin 2012)
- Organismes – Fédérations – Associations**
(liste non exhaustive)
- BDIH** : cosmétiques naturels contrôlés
<http://www.kontrollierte-naturkosmetik.de/index.htm>
(page consultée le 29 février 2012)
- CFTA** : Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association
<http://www.cfta.org/>
(page consultée le 3 février 2012)
- COSMEBIO** : association professionnelle de la cosmétique naturelle, écologique et biologique
<http://www.cosmebio.org/>
(page consultée le 29 février 2012)
- Cosmetics Europe, The personal care association** :
<http://www.cosmeticseurope.eu>
(site consulté le 28 janvier 2012)
- ECOCERT** : organisme de contrôle et de certification au service de l'homme et de l'environnement
<http://www.ecocert.fr/>
(page consultée le 29 février 2012)
- FDA, US Food and Drug Administration**
<http://www.fda.gov/Cosmetics/default.htm>
(site consulté le 29 janvier 2012)
- IFRA** : The International Fragrance Association
<http://www.ifraorg.org/>
(site consulté le 12 mars 2012)
- NATURE & PROGRES** : association de consommateurs et professionnels pour l'agriculture biologique
http://www.natureetprogres.org/nature_et_progres/histoire_nature_progres.html
(page consultée le 22 février 2012)
- NATRUE** : association internationale pour les produits cosmétiques naturels et biologiques
<http://www.natrue.org/>
(page consultée le 29 février 2012)
- Laboratoires – Bureaux d'études – Écoles – Centres de recherche**
(liste non exhaustive)
- DERMATHERM** : laboratoires proposant une ligne de soins stérilisés UHT
<http://www.dermatherm.fr>
(site consulté le 8 janvier 2012)

