



**HAL**  
open science

# Évaluation des paramètres nécessaires à la détermination de la Date de Durabilité Minimale (DDM) et de la Période après Ouverture (PAO) des émulsions cosmétiques.

Ségolène De Vaugelade Du Breuillac

► **To cite this version:**

Ségolène De Vaugelade Du Breuillac. Évaluation des paramètres nécessaires à la détermination de la Date de Durabilité Minimale (DDM) et de la Période après Ouverture (PAO) des émulsions cosmétiques.. Chimie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLX022 . tel-04778860

**HAL Id: tel-04778860**

**<https://theses.hal.science/tel-04778860v1>**

Submitted on 12 Nov 2024

**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.

# Évaluation des paramètres nécessaires à la détermination de la Date de Durabilité Minimale (DDM) et de la Période Après Ouverture (PAO) des émulsions cosmétiques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'École Polytechnique

École doctorale n°571 : sciences chimiques : molécules, matériaux,  
instrumentation et biosystèmes (2MIB)  
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 2 mai 2018, par

**Ségoène de VAUGELADE du BREUILLAC**

Composition du Jury :

Corinne Gosmini Directrice de Recherche – CNRS	Président
Valérie Pichon Professeur des Universités, ESPCI Paris	Rapporteur
Jean-Michel WARNET Professeur Émérite des Universités, Université Paris V	Rapporteur
Corinne Gosmini Directrice de Recherche – CNRS	Examineur
Said Kinani Ingénieur de Recherche, Électricité de France	Examineur
Stéphane Bouchonnet Ingénieur de Recherche, École polytechnique	Directeur de thèse
Stéphane PIRNAY Expert toxicologue, Expertox	Co-encadrant



## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury, Madame le Professeur Valérie PICHON et Monsieur le Professeur Jean-Michel WARNET pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de mon travail, ainsi que les Docteurs Corinne GOSMINI et Said KINANI pour avoir accepté de participer à ma soutenance orale.

Je tiens à remercier le Docteur Stéphane BOUCHONNET, directeur de cette thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour sa rigueur et pour avoir su me conseiller avec une grande pédagogie. Je te remercie pour ta disponibilité pendant ces trois ans, en dépit de responsabilités importantes et d'un emploi du temps chargé. J'ai pu apprécier ta grande ténacité et ton optimisme, deux grandes qualités que tu as su me transmettre et qui me seront précieuses tout au long de mon parcours professionnel. Je t'en suis très reconnaissante.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Docteur Stéphane PIRNAY, Co-encadrant de cette thèse, expert toxicologue, fondateur et directeur des cabinet et laboratoire EXPERTO, qui m'a accueillie au sein de ses équipes et m'a donné l'opportunité de travailler sur ce sujet aux problématiques actuelles et complexes. Vous avez pressenti mes capacités à effectuer une thèse et je suis très reconnaissante de l'intérêt que vous avez porté à mon avenir.

Vous avez su me faire partager votre esprit d'entreprendre. Vous m'avez fait l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités.

J'adresse toute ma profonde gratitude au Docteur Corinne GOSMINI, Directrice du Laboratoire de Chimie Moléculaire de l'École polytechnique et à tous ses collaborateurs, pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein de cette institution et pour les conseils stimulants que j'ai eu la chance de recevoir de leur part.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à tous les panélistes pour leur contribution, sans laquelle une partie de ce travail n'aurait pu aboutir.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Edith NICOL, Ingénieure d'études, pour sa bonne humeur partagée lors des journées de travail et pour son appui lors des analyses.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Docteur Sophie BOURCIER, Ingénieure de recherche au sein du Laboratoire de Chimie Moléculaire, pour son écoute et ses précieux conseils et Christophe GENTY, Assistant ingénieur, pour sa disponibilité et ses encouragements permanents.

Leur assistance matérielle et morale m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier le Laboratoire BioPreserv et son Directeur Monsieur Thierry LACOUR, qui ont accepté de collaborer pour les travaux de validation microbiologique.

Mes remerciements vont également à Madame Floriane ARNAUD, Ingénieure qualité et réglementation au sein du Laboratoire Onyline, pour m'avoir conseillée au mieux dans le choix de la matrice de référence et pour avoir toujours su respecter les délais de fabrication.

Je voudrais exprimer toute mon amitié à Patricia PETIT, Claire THOMAS et Aurélie LARGITTE, pour leur support, leur gentillesse, leur humour, leur bonne humeur et pour le climat sympathique dans lequel elles m'ont permis de travailler au sein du Laboratoire Expertox.

J'adresse une dédicace spéciale à tous les étudiants que j'ai rencontrés au cours de la préparation de cette thèse, plus particulièrement Svetlana, Houda, Ashwani, Matias, Caroline, Aziz, Adrien, Jodie... Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun ont été très enrichissantes et m'ont beaucoup apporté.

Un grand merci à Magalie AIME, Ingénieure de l'Ecole de Biologie Industrielle, que j'ai eu le plaisir d'encadrer pendant son stage, pour sa contribution à ces travaux.

Je remercie également toutes les équipes enseignantes de l'Ecole de Biologie Industrielle de Cergy pour m'avoir transmis le sens de la rigueur scientifique et du travail en équipe et avoir aiguisé mon envie d'apprendre ainsi que Monsieur Stan IDELSEN, Directeur et cofondateur de World Natural Care à Bruxelles, et son équipe, pour avoir guidé mes premiers pas dans la formulation en cosmétique et pour m'avoir fait partager sa passion pour l'innovation.

Une mention particulière à Guillaume pour son soutien pendant mes périodes de doute et pour ses multiples encouragements. J'ai compris les idées dans ses couplets et grâce à lui « *mes projets deviennent concrets, je fais ce qui me plaît pour que tous mes souhaits deviennent des faits* ».

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille, en particulier à ma mère qui m'a fait comprendre que la vie n'était pas faite que de problèmes à résoudre et à mes frères Géraud et Flavien pour leur soutien indéfectible et leur enthousiasme à l'égard de mes travaux. Merci pour avoir toujours cru en moi et avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Une pensée pour terminer ces remerciements, pour mon père, qui n'a pas vu l'aboutissement de mon travail, mais je sais que tu aurais été très fier de ta fille.



## **Avant-Propos**

---

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE) entre la société EXPERTOX (Paris, France) et le Laboratoire de Chimie Moléculaire du Département de Chimie de l'École polytechnique (Palaiseau, France). Il a été dirigé par le Dr Stéphane BOUCHONNET et co-encadré par le Dr Stéphane PIRNAY.





## **Publications**

---

Ce travail de thèse a donné lieu à plusieurs publications et à différentes communications orales et écrites. Celles-ci sont répertoriées ci-après.

### Publications internationales

S. De Vaugelade, M. Aime, N. Farcette, E. Maurel, T. Lacour, C. Thomas, S. Bouchonnet, S. Pirnay. Comparison of the compact dry TC method with the standard method ISO 21149:2006 for determining aerobic colony counts in cosmetic emulsion. *International Journal of Cosmetic Science* **2016**, 39, 17-24.

S. De Vaugelade, E. Nicol, S. Vujovic, S. Bourcier, S. Pirnay, S. Bouchonnet. UV-vis degradation of  $\alpha$ -tocopherol in a model system and in a cosmetic emulsion - Structural elucidation of photoproducts and toxicological consequences. *Journal of Chromatography A* **2017**, 1517, 126-133.

S. De Vaugelade, E. Nicol, S. Vujovic, S. Bourcier, S. Pirnay, S. Bouchonnet. UV-visible phototransformation of dehydroacetic acid - Structural characterization of photoproducts and global ecotoxicity. Soumis à *Rapid Communications in Mass Spectrometry* le 02/01/18.

### Autres publications

S. De Vaugelade, S. Monsonogo, C. Thomas, S. Bouchonnet, S. Pirnay. Etude rétrospective de rapports de stabilité/compatibilité de produits cosmétiques. *Industries cosmétiques* **2016**, 12, 40-43.

S. De Vaugelade, S. Monsonogo, C. Thomas, S. Bouchonnet, S. Pirnay. Etude rétrospective de méthodes d'évaluation de la Période Après Ouverture (PAO) de produits cosmétiques. *Industries cosmétiques* **2017**, 13, 36-40.

### Communications orales

S. De Vaugelade. Product packaging compatibility testing: the evolution of the content – containing interaction in cosmetics. *Skin Summer School*, Pavia, Italy, Juin 2016.

S. Pirnay, S. De Vaugelade. Cosmetic Preservatives – A toxicological issue. *In-Cosmetics*, Paris, Avril 2016.

S. De Vaugelade, E. Nicol, S. Bourcier, S. Vujovic, S. Bouchonnet, S. Pirnay. Study of the photodegradation of alpha-tocopherol - Structural elucidation and potential toxicity of the UV-Visible photoproducts. *International Symposium on Green Chemistry*, La Rochelle, Mai 2017.

#### Communications par affiche

S. De Vaugelade, C. Thomas, S. Bouchonnet, S. Pirnay. Stability of cosmetic formulations containing antioxidants and preservatives, based on physicals, chemicals and microbiologicals parameters. *Colloque international sur les ingrédients cosmétiques et les biotechnologies*, Saint-Malo, Juin - Juillet 2016.

S. De Vaugelade, S. Bouchonnet, S. Pirnay. The combined effects of storage temperature and packaging type on the sensory properties on a cosmetic emulsion – statistical approach. *Congrès Cosmetic Measurement & Testing*, Cergy, Juin 2017.

S. De Vaugelade, E. Nicol, S. Vujovic, S. Bourcier, S. Pirnay, S. Bouchonnet. Consequences of sunlight-induced aging on a personal care emulsion containing  $\alpha$ -tocopherol as antioxidant. *Congrès SMMAP*, Marne-la-Vallée, Octobre 2017.

#### Travaux associés

S. Lafosse, S. De Vaugelade, H. Berthele, S. Pirnay. The impact of the new European Cosmetic Regulation on the preservative system. *International Journal of Cosmetic Science* **2015**, 66, 271-274.

N. Berger-Picard, S. De Vaugelade, A. Largitte, S. Pirnay. Retrospective Study of the Allergens Analysis in Cosmetic Products Following the NFEN16274 Standard and the EU 2017/1410 Regulation. *MOJ Toxicol* **2017**, 3(6): 00073.

C. Taillandier, S. De Vaugelade, C. Thomas, S. Pirnay. Validation of a LC-UV method for the determination and quantification of four acid preservatives allowed in organic products. *Congrès Cosmetic Measurement & Testing*, Cergy, Juin 2015.

S. De Vaugelade, C. Thomas, S. Pirnay. Validation of a GC-MS method for the determination and quantification of seven phthalates in cosmetics products. *Congrès de la SFT*, Paris, Novembre 2015.

## Abréviations

---

$\alpha$ -Toco	Alpha-tocophérol
AB	Alcool benzylique
ACN	Acétonitrile
ACP	Analyse en Composantes Principales
AGC	<i>Automatic Gain Control</i> , contrôle de gain automatique
AMD	<i>Automated Method Development</i> , méthode de développement automatique
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , analyse de la variance
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ANVISA	Agence Nationale brésilienne de Vigilance Sanitaire
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> , ionisation chimique à pression atmosphérique
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i> , collection américaine de cultures-types
$a_w$	<i>Water activity</i> , activité de l'eau
BHA	Butyl Hydroxyanisol
BHT	Butyl Hydroxytoluène
BMA	Bactéries Mésophiles Aérobie
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i> , Service de renseignements sur les produits chimiques
CDOM	<i>Colored Dissolved Organic Matter</i> , matière organique dissoute chromophorique
CE	Commission Européenne
CEE	Communauté Economique Européenne
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> , unité formant colonie
CI	<i>Chemical ionization</i> , ionisation chimique
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i> , dissociation induite par collisions
COLIPA	<i>European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association</i> , association européenne des produits cosmétiques, de toilette et de la parfumerie
COSMED	Association des petites et moyennes entreprises françaises de la filière cosmétique
corr-ACP	Analyse en Composantes Principales à partir d'une matrice de corrélation
cov-ACP	Analyse en Composantes Principales à partir d'une matrice de covariance
CSSC	Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs
CT	<i>Challenge Test</i> , test de croissance

DCM	Dichlorométhane
DDL	Degré De Liberté
DDM	Date de Durabilité Minimale
DGAT	Dénombrement des Germes Aérobieux Totaux
DHA	<i>Dehydroacetic acid</i> , acide déhydroacétique
DIP	Dossier Information Produit
DLU	Date Limite d'Utilisation
DLUO	Date Limite d'Utilisation Optimale
EC	<i>Effective Concentration</i> , concentration effective
EHR	Equilibre Humide Relatif
EI	<i>Electron Ionization</i> , ionisation électronique
EP	<i>European Pharmacopoeia</i> , pharmacopée européenne
ESI	<i>Electrospray ionization</i> , ionisation par électrospray
FA	<i>Formic Acid</i> , acide formique
FT-ICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i> , résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier
GC	<i>Gas Chromatography</i> , chromatographie en phase gazeuse
H/E	Huile dans Eau
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , chromatographie en phase liquide à haute performance
HR	Humidité Relative
ICC	Interaction Contenant-Contenu
ICH	Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i> , Nomenclature internationale des ingrédients cosmétiques
ISO	<i>International Standards Organization</i> , organisation internationale de normalisation
ISO/AWI	ISO/ <i>Approved Work Item</i> , ISO/objet de travail approuvé
ISO/TC	ISO/ <i>Technical Committees</i> , ISO/comités techniques
LC	<i>Liquid Chromatography</i> , chromatographie en phase liquide
LCM	Laboratoire de Chimie Moléculaire
LD	<i>Letal Dose</i> , dose létale
LQ	Limite de Quantification
MS	<i>Mass Spectrometry</i> , spectrométrie de masse

MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> , spectrométrie de masse en tandem
MS <sup>n</sup>	<i>Multi-stage Mass Spectrometry</i> , spectrométrie de masse multi-étapes
NIH	<i>National Institutes of Health</i> , instituts américains de la santé
O/W	<i>Oil in Water</i> , huile dans eau
PAO	Période Après Ouverture
PAOth	Période Après Ouverture Théorique
PE	Polyéthylène
PP	Photoproduit
QSAR	<i>Quantitative Structure Activity Relationship</i> , relation quantitative de structure à activité
QSP	Quantité Suffisante Pour
RPM	Rotations Par Minutes
RSDr	<i>Relative Standard Deviation of repeatability</i> , écart type relatif de répétabilité
RT	Risque Théorique
SOP	<i>Standard Operating Procedures</i> , procédures opérationnelles standard
TA	Température Ambiante
TAMC	<i>Total Aerobic Microbial Count</i> , dénombrement des micro-organismes aérobies totaux
TC	<i>Total Count</i> , dénombrement total
T.E.S.T.	<i>Toxicity Estimation Software Tool</i>
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i> , gélose trypticase de soja
TTC	2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride
UHR-MS	<i>Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry</i> , spectrométrie de masse à ultra-haute résolution



# Table des matières

---

INTRODUCTION GENERALE	25
<b>CHAPITRE I - Contexte de l'étude</b>	<b>32</b>
I.1 Concepts de date de durabilité minimale et de période après ouverture	34
I.1.1 Définition de la date de durabilité minimale	34
I.1.2 Evaluation de la date de durabilité minimale par les metteurs sur le marché	36
I.1.3 Définition de la période après ouverture	46
I.1.4 Evaluation de la période après ouverture par les metteurs sur le marché	46
I.2 Conservation et conservateurs	59
I.2.1 Contamination microbienne	59
I.2.2 Agents conservateurs	60
I.2.3 Agents antioxydants	61
I.2.4 Molécules retenues pour cette étude	61
I.3 Réactions photochimiques	63
I.3.1 La phototransformation directe	63
I.3.2 La phototransformation indirecte	65
<b>CHAPITRE II - Matériels et méthodes</b>	<b>66</b>
II.1 Etude de stabilité	68
II.1.1 Matrice de référence	68
II.1.2 Conditionnement	71
II.1.3 Conditions d'essais	72
II.1.3.1 Stabilité en conditions réelles	72
II.1.3.2 Stabilité en conditions de vieillissement accéléré	72
II.1.3.3 Stabilité en conditions extrêmes – cycles chaud/froid	73
II.1.3.4 Stabilité à la lumière	73
II.2 Paramètres évalués	75
II.2.1 Suivi organoleptique par analyse sensorielle	75
II.2.1.1 Traitement statistique des données sensorielles	77
II.2.1.1.1 Analyse unidimensionnelle	77
II.2.1.1.2 Analyse multidimensionnelle	77
II.2.2 Paramètres physiques	80
II.2.2.1 Observation au microscope	80
II.2.2.2 Test de stabilité à la centrifugeuse	81
II.2.2.3 Suivi de la masse de l'échantillon dans le conditionnement	82
II.2.3 Paramètres chimiques	82
II.2.4 Paramètres microbiologiques	83
II.2.4.1 Activité de l'eau	84
II.2.4.2 Dénombrement de germes totaux	85
II.2.4.3 Challenge test	86
II.3 Etudes de photodégradation	86
II.3.1 Préparation des échantillons	86
II.3.1.1 Préparation des solutions pour la caractérisation des photoproduits	86
II.3.1.2 Extraction des échantillons pour les analyses ciblées	87
II.3.2 Photoréacteur utilisé dans le cadre de cette étude	87
II.4 Estimations toxicologiques	89
II.4.1 Tests d'estimation de toxicité <i>in silico</i>	89
II.4.2 Tests d'estimation de toxicité <i>in vitro</i>	90
II.5 Développements analytiques en couplages GC-MS et LC-MS	91
II.5.1 Appareillage utilisé en couplage GC-MS	92
II.5.2 Appareillage utilisé en couplage LC-MS	93



<b>CHAPITRE III - Suivi des propriétés organoleptiques d'une émulsion cosmétique huile/eau</b>	<b>95</b>
III.1 Approche statistique	97
III.1.1 Analyse unidimensionnelle	97
III.1.1.1 Description graphique des données	97
III.1.1.2 Etablissement du modèle statistique	99
III.1.2 Analyse multidimensionnelle	101
III.2 Influence de l'emballage	104
III.3 Influence de la température	106
III.4 Conclusion	109
<b>CHAPITRE IV - Suivi des paramètres physico-chimiques</b>	<b>111</b>
IV.1 pH	113
IV.1.1 Résultats du suivi en conditions réelles de vieillissement	113
IV.1.2 Résultats du suivi en conditions accélérées de vieillissement	115
IV.1.3 Stratégie de corrélation entre les données du suivi en conditions normales et les données issues du vieillissement accéléré	116
IV.2 Séparation de phases avec et sans centrifugation	121
IV.3 Observation microscopique	121
IV.3.1 Résultats du suivi du déphasage en conditions réelles de vieillissement	121
IV.3.2 Résultats du suivi en conditions accélérées de vieillissement	123
IV.3.3 Essais de corrélation entre les données du suivi en conditions normales et les données issues du vieillissement accéléré	124
IV.4 Perte de poids (produit + emballage)	127
IV.4.1 Résultats du suivi du poids de l'échantillon en conditions réelles de vieillissement	127
IV.4.2 Résultats du suivi en conditions accélérées de vieillissement	128
IV.5 Conclusion	129
IV.6 Etude de suivi des molécules d'intérêt : alcool benzylique, acide déhydroacétique et alpha-tocophérol	131
IV.6.1 Méthode analytique	131
IV.6.1.1 Séparation chromatographique	131
IV.6.1.2 Détection par spectrométrie de masse	133
IV.6.1.3 Validation de la méthode	137
IV.6.2 Résultats des dosages de l'acide déhydroacétique, de l'alcool benzylique et de l'alpha-tocophérol dans les différentes conditions de stockage	140
IV.6.2.1 Conditions réelles	140
IV.6.2.2 Conditions accélérées	142
IV.6.3 Conclusion	144
<b>CHAPITRE V - Suivi des paramètres microbiologiques</b>	<b>147</b>
V.1 Mesure de l'activité de l'eau	149
V.2 Dénombrement des germes totaux	151
V.2.1 Méthode de dénombrement des bactéries aérobies totales	151
V.2.1.1 Présentation générale des travaux publiés	151
V.2.1.2 Synthèse des travaux publiés	172
V.2.2 Résultats des dénombrements de bactéries aérobies totales et de germes totaux	173
V.2.3 Résultats des « <i>challenge tests</i> »	175
V.2.4 Conclusion du suivi des paramètres microbiologiques	176

<b>CHAPITRE VI - Dégradation sous irradiation UV-visible de l'<math>\alpha</math>-tocophérol dans un système modèle et dans une émulsion cosmétique - Elucidation structurale des photoproduits et conséquences toxicologiques</b>	<b>179</b>
<b>Présentation générale des travaux publiés</b>	<b>181</b>
VI.1 INTRODUCTION	185
VI.2 EXPERIMENTAL	186
VI.2.1 Chemicals and reagents	186
VI.2.2 Sample preparation	187
VI.2.3 Sample extraction	187
VI.2.4 Photolysis experiments	188
VI.2.5 GC-MS operating conditions	188
VI.2.6 LC-MS operating conditions	189
VI.2.7 In silico toxicity estimation	189
VI.2.8 In vitro bioassays	190
VI.3 RESULTS AND DISCUSSION	191
VI.3.1 Photoproducts characterization	191
VI.3.2 Real sample analysis	206
VI.3.3 Toxicity predication	206
VI.3.3.1 In silico toxicity estimation	206
VI.3.3.2 In vitro bioassays	210
VI.4 CONCLUSION	211
<b>Synthèse des principaux résultats de cette étude</b>	<b>213</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>215</b>
<b>CHAPITRE VII - Phototransformation dans l'ultraviolet-visible de l'acide déhydroacétique - Elucidation structurale et estimation de l'écotoxicité globale des photoproduits</b>	<b>219</b>
<b>Présentation générale des travaux publiés</b>	<b>221</b>
VII.1 INTRODUCTION	225
VII.2 EXPERIMENTAL	227
VII.2.1 Chemicals and reagents	227
VII.2.2 Sample preparation	227
VII.2.3 Sample extraction	228
VII.2.4 Photolysis experiments	228
VII.2.5 GC-MS operating conditions	228
VII.2.6 LC-MS operating conditions	229
VII.2.7 In silico toxicity estimations	230
VII.2.8 Ecotoxicological assays	230
VII.3 RESULTS AND DISCUSSION	231
VII.3.1 Relative amounts of photoproducts and kinetic data	231
VII.3.2 Photoproducts characterization	232
VII.3.3 Real sample analysis	239
VII.3.4 Toxicity prediction	240
VII.3.4.1 In silico toxicity estimation	240
VII.3.4.2 In vitro bioassays	242
VII.4 CONCLUSION	244
<b>Synthèse des principaux résultats de cette étude</b>	<b>245</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>246</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>249</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>256</b>

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### Chapitre I

Figure I-1 : Symbole de la période après ouverture .....	46
Tableau I-1 : Structures et propriétés physico-chimiques des conservateurs et de l'antioxydant retenus pour cette étude.....	62

#### Article - Etude rétrospective de rapports de stabilité/compatibilité de produits cosmétiques

Figure 1 : Différentes formes galéniques étudiées .....	38
Figure 2 : Températures utilisées au cours des tests .....	42
Figure 3 : Distribution du nombre de mesures au cours des tests en fonction du temps .....	44
Tableau 1 : Critères mesurés au cours des tests .....	40

#### Article - Etude rétrospective des méthodes d'évaluation de la Période Après Ouverture (PAO)

Figure 1 : Méthodes utilisées pour l'établissement de 50 rapports d'estimation de la PAO ...	51
Tableau 1 : Critères et sous-critères évalués par 19 méthodes d'évaluation de PAO.....	52
Tableau 2 : Différence de cotation (sous-critère : type d'emballage).....	56
Tableau 3 : Différence de cotation (sous-critère : catégorie de personnes) .....	56

### Chapitre II

Figure II-1 : Répartition des formes galéniques utilisées sur la base de 311 rapports d'expertises réalisés entre janvier et juillet 2014 (%) .....	68
Figure II-2 : Estimation de l'incertitude des points de données dans le tracé d'un plan ACP	79
Figure II-3 : Emulsion de référence observée au microscope optique : (a) avant application de la fonction <i>Find Maxima</i> ; (b) après application de la fonction <i>Find Maxima</i> ; (c) zoom sur les micelles ; (d) représentation graphique d'une micelle .....	81
Figure II-4 : Transferts de matières intérieur/extérieur et emballage/produit possibles .....	82
Figure II-5 : Enceinte de vieillissement accéléré Q-SUN .....	88
Figure II-6 : Spectres d'émission de la lumière du soleil et de lampes à arc de xénon équipées de filtres.....	88
Tableau II-1 : Formule qualitative et quantitative du produit de référence .....	70
Tableau II-2 : Fréquence des mesures .....	74
Tableau II-3 : Définitions des descripteurs et références utilisées pour la formation du panel	76
Tableau II-4 : Valeurs d'activité de l'eau et de pH nécessaires pour le développement de certains micro-organismes.....	85

### **Chapitre III**

Figure III-1 : Graphiques des moyennes + écart type pour les descripteurs couleur (a), déphasage (b), épaisseur (c), odeur acide (d) et odeur rance (e) .....	98
Figure III-2 : Représentation de l'évaluation de chaque panéliste pour chaque échantillon (temps réel, emballage en verre) .....	101
Figure III-3 : (A) Cercle des corrélations (B) Représentation des panels virtuels construits par ré-échantillonnage avec des ellipses de confiance contenant 95% des évaluations sensorielles (temps réel, emballage en verre) .....	102
Figure III-4 : (A) Cercle des corrélations (B) Représentation des panels virtuels construits par ré-échantillonnage avec des ellipses de confiance contenant 95% des évaluations sensorielles (temps réel, emballage en polyéthylène).....	105
Figure III-5 : Représentation des panels virtuels construits par ré-échantillonnage avec des ellipses de confiance contenant 95% des évaluations sensorielles (condition réelle et condition accélérée 55 °C, emballage en verre) .....	108
Tableau III-1 : Test de normalité (Shapiro-Wilk) .....	99
Tableau III-2 : Statistiques khi-carré de Friedman, degrés de liberté (ddl) et « <i>p-values</i> » correspondants.....	100
Tableau III-3 : Résultats des tests T2 de Hotelling (emballage en verre) .....	103
Tableau III-4 : Résultats des tests T2 de Hotelling (emballage en polyéthylène).....	106
Tableau III-5 : Facteurs significatifs selon la température de stockage et le type d'emballage .....	107

### **Chapitre IV**

Figure IV-1 : pH de l'émulsion de référence après stockage dans un emballage en verre et dans un emballage en polyéthylène (PE) .....	114
Figure IV-2 : Courbes de régression du pH en fonction du temps : (a) conditions réelles, température ambiante (TA) ; (b) 50 °C ; (c) 55 °C ; (d) 60 °C .....	117
Figure IV-3 : Représentation du delta temps entre les données théoriques à température ambiante et en condition accélérée à 60 °C.....	118
Figure IV-4 : Fonctions $\Delta = f(\text{pH})$ , pour les conditions accélérées 50 °C (a), 55 °C (b) et 60 °C (c) .....	119
Figure IV-5 : Estimation du delta temps par interpolation.....	120
Figure IV-6 : Evolution des gouttelettes d'huile par microscopie optique lors du vieillissement en conditions réelles aux temps T0 (a), T0 + 7 mois (b) et T0 + 12 mois (c).....	122

Figure IV-7 : Nombre de gouttelettes d'huile dans l'émulsion de référence après stockage dans un emballage en verre et dans un emballage en polyéthylène.....	122
Figure IV-8 : Fonctions $\Delta = f(\text{nombre de gouttelettes d'huile dans une surface observée de } 0,05 \text{ mm}^2 \text{ de l'émulsion}),$ pour les conditions accélérées 50 °C (a) et 55 °C (b).....	125
Figure IV-9 : Perte de poids relative de l'émulsion de référence (émulsion + emballage) après stockage dans un emballage en verre et dans un emballage en polyéthylène. ....	128
Figure IV-10 : Spectres de masse de AB (A), DHA (B) et $\alpha$ -Toco (C) ; obtenus en ionisation électronique (haut) et en ionisation chimique (bas) .....	135
Figure IV-11 : Spectres MS/MS de l'acide déhydroacétique obtenus en ionisation chimique à différentes valeurs de tension de collision .....	136
Figure IV-12 : Concentrations en AB (a), DHA (b) et $\alpha$ -Toco (c) en $\mu\text{g/mL}$ , après stockage en conditions réelles et normalement prévisibles de l'émulsion de référence .....	141
Figure IV-13 : Concentrations en AB (a), DHA (b) et $\alpha$ -Toco (c) en $\mu\text{g/mL}$ , après stockage en conditions accélérées de l'émulsion de référence .....	143
Tableau IV-1 : Gamme de pH acceptable, selon la zone d'application, pour une population adulte .....	113
Tableau IV-2 : Evolution du pH de l'émulsion de référence dans des conditions accélérées de vieillissement.....	115
Tableau IV-3 : Suivi du nombre de gouttelettes d'huile dans une surface observée de 0,05 mm <sup>2</sup> de l'émulsion de référence en conditions accélérées de vieillissement .....	123
Tableau IV-4 : Simulation de l'utilisation de la corrélation entre la condition accélérée 50 °C et les conditions réelles .....	126
Tableau IV-5 : Simulation de l'utilisation de la corrélation entre la condition accélérée 55 °C et les conditions réelles .....	126
Tableau IV-6 : Pourcentage de perte de poids (émulsion + emballage) en conditions accélérées de vieillissement .....	129
Tableau IV-7 : Températures d'ébullition des trois analytes .....	132
Tableau IV-8 : Paramètres de la méthode de dosage de AB, DHA et $\alpha$ -Toco.....	132
Tableau IV-9 : Paramètres de validation de la méthode de dosage par GC-MS de AB, DHA et $\alpha$ -Toco dans une émulsion H/E .....	138
Tableau IV-10: Fidélité même jour et justesse pour la détermination de AB, DHA et $\alpha$ -Toco dans une émulsion H/E.....	139
Tableau IV-11 : Fidélité sur 3 jours et justesse pour la détermination de AB, DHA et $\alpha$ -Toco dans une émulsion H/E.....	139

## Chapitre V

Figure V-1 : Activité de l'eau de l'émulsion de référence après stockage à température ambiante (TA) dans un emballage en verre et dans un emballage en polyéthylène (PE). ....	149
Figure V-2 : Observation de colonies de BMA sur kits « <i>Compact Dry TC</i> » (échantillon stocké 10 mois, emballage en verre) .....	174
Tableau V-1 : Activité de l'eau de l'émulsion de référence dans des conditions accélérées de stockage .....	150
Tableau V-2 : Résultats des dénombrements de BAT et de germes totaux .....	173
Tableau V-3 : Limites fixées par la norme ISO 17516 .....	174
Tableau V-4 : Résultats du « <i>challenge test</i> » réalisé sur l'émulsion de référence à T <sub>0</sub> .....	175
Tableau V-5 : Résultats des « <i>challenges tests</i> » réalisés sur les échantillons soumis aux différentes conditions de stockage .....	176

### Article - Comparison of the compact dry TC method with the standard method ISO 21149:2006 for determining aerobic colony counts in cosmetic emulsion

Figure 1 : Correlation between Compact Dry TC and ISO 21149 results for aerobic bacteria in emulsion .....	162
Figure 2 : Correlation between the limits of repeatability of both Compact Dry TC and ISO 21149 methods .....	166
Figure 3 : Boxplot of the repeatability test results after 12 repetitions of the Kit Compact Dry enumeration. From left to right: a: 10 CFU mL <sup>-1</sup> , b: 50 CFU mL <sup>-1</sup> , c: 100 CFU mL <sup>-1</sup> , d: 250 CFU mL <sup>-1</sup> .....	167
Figure 4 : Correlation between analyst 1 and analyst 2 for Compact Dry TC method .....	168
Figure 5 : Correlation between batch 1 and batch 2 for Compact Dry TC method .....	168
Table 1 : O/W formula .....	157
Table 2: Bacterial strain references .....	159
Table 3: Inoculum concentration.....	159
Table 4 : Results of ISO 21149 method comparison (emulsion) .....	163
Table 5 : Accuracy results .....	164
Table 6 : Shapiro-Wilk test results .....	165
Table 7 : Results of the repeatability study .....	165
Table 8 : Intermediate precision study (analyst) .....	167
Table 9 : Intermediate precision study (batch).....	168

## Chapitre VI

### Article - UV-visible degradation of $\alpha$ -tocopherol in a model system and in a cosmetic emulsion - Structural elucidation of photoproducts and toxicological consequences

Figure 1 : Chemical structures of $\alpha$ -tocopherol and $\alpha$ -tocopherol-d <sub>9</sub> .....	187
Figure 2 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of photoproducts PP1-1 to PP1-6, PP2, PP3-1 to PP3-3, PP6-1, PP6-2, PP7, PP8 and PP9. ....	198
Figure 3 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of photoproducts PP4-1 to PP4-10.....	202
Figure 4 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of photoproducts PP5-1 and PP5-2.....	203
Figure 5 : Response-dose curves for the reference and irradiated solutions of $\alpha$ -tocopherol solutions with the <i>Vibrio fischeri</i> bioluminescence inhibition test .....	210
Table 1 : Analytical results related to the LC-MS and GC-MS detection of Tocopherol photoproducts.....	196
Table 2 : <i>In silico</i> toxicity predictions provided by the software T.E.S.T. for the photoproducts of tocopherol .....	209
SD 1 - LC-MS chromatogram of an alpha-tocopherol solution irradiated for 60 minutes in acetonitrile (ESI+ mode, extracted ionic currents).....	192
SD 2 - GC-MS chromatogram of an alpha-tocopherol solution irradiated for 60 minutes in acetonitrile (CI mode, full scan detection) and CID mass spectrum of PP7H <sup>+</sup> .....	193
SD 3 - Kinetic data.....	194
SD 4 - Mechanisms suggested for the formation of PP1, PP2, PP3, PP6, PP8 and PP9 photoproducts after O <sub>2</sub> cycloaddition (1,2- and 1,4-) onto $\alpha$ -tocopherol.....	199
SD 5 - CID mass spectra of PP1H <sup>+</sup> (above) and PP4H <sup>+</sup> (below) in ESI+ - MS/MS .....	200
SD 6 - Collision induced dissociation pathways of protonated photoproducts PP8 and PP9	205
SD 7 - EC50 determined on <i>Vibrio fischeri</i> after 3 times of incubation (5 min, 15 min and 30 min) .....	211

## Chapitre VII

### Article - UV-visible phototransformation of dehydroacetic acid - Structural characterization of photoproducts and global ecotoxicity

Figure 1 : Chemical structure of DHA .....	227
Figure 2 : Relative amounts estimated by LC-MS (plain curves, left scale) and GC-MS (dashed curve, right scale) of DHA, PP1, PP2 and DIMER-1 plotted as a function of the irradiation time .....	232
Figure 3 : LC-MS chromatograms of the dehydroacetic acid solution in acetonitrile, not irradiated (Fig.1a) and irradiated for 4 hours (Fig.1b) (ESI+ mode, extracted ionic currents) .....	234
Figure 4 : GC-MS chromatogram of the dehydroacetic acid solution irradiated for 4 hours in acetonitrile (CI mode, full scan detection) .....	234
Figure 5 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of PP1 .....	236
Figure 6 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of PP2 .....	238
Figure 7 : Response-dose curves for the reference and irradiated solutions of DHA solutions with the <i>Vibrio fischeri</i> bioluminescence inhibition test.....	243
Table 1 : Analytical results related to the LC-MS and GC-MS detection of DHA photoproducts .....	233
Table 2 : <i>In silico</i> toxicity predictions provided by the software T.E.S.T. for the photoproducts of DHA .....	242
Table 3 : EC <sub>50</sub> (ppm) determined for the <i>Vibrio fischeri</i> bacteria after 3 incubation times (5 min, 15 min and 30 min) .....	243
SD 1 - Collision induced dissociation pathways of protonated photoproducts PP1 .....	236
SD 2 - Collision induced dissociation pathways of protonated DIMER-1 .....	237
SD 3 - Collision induced dissociation pathways of protonated photoproduct PP2.....	239
SD 4 - LC-MS chromatograms of the cosmetic emulsion, not irradiated and irradiated for 4 hours (ESI+ mode, extracted ionic currents).....	240





---

# Introduction générale

---



L'utilisation de produits cosmétiques et de soins personnels remonte à des milliers d'années. Les Egyptiens utilisaient des huiles parfumées et des onguents pour nettoyer, protéger et parfumer leur peau. Le maquillage du contour des yeux et des sourcils était une pratique courante dans l'Egypte ancienne, notamment grâce au khôl, encore utilisé aujourd'hui. Les Grecs enduisaient leurs lèvres avec une pâte à base d'huile d'olive enrichie en oxyde de fer ou en ocre. Toujours dans l'antiquité, les Chinois coloraient leurs ongles pour indiquer une classe sociale. Au cours du premier millénaire de notre ère, le henné est devenu populaire comme colorant capillaire ; il était également utilisé pour la peinture des mains et des pieds dans certaines parties de l'Afrique du Nord, de la péninsule Arabique et de l'Asie du Sud<sup>[59,46,58]</sup>.

Aujourd'hui, les 500 millions de consommateurs européens utilisent les cosmétiques pour protéger leur santé, améliorer leur bien-être et stimuler leur estime de soi. Selon les chiffres publiés en 2016 par la Fédération européenne des industriels de la filière cosmétique (*Cosmetics Europe*), le marché européen des cosmétiques et produits de toilette, estimé à 77 milliards d'euros, demeure le plus large marché cosmétique du monde avec une progression de 2,1% en 2014 et de 3,1% en 2015<sup>[16]</sup>.

Les produits cosmétiques ont longtemps été considérés comme anodins et sans risque. Il faut attendre l'affaire du talc *Morhange* en 1972 pour que la qualité des produits cosmétiques et produits de soin soit remise en question : un conservateur antimicrobien, l'hexachlorophène, en surdose dans les produits finis provoque la mort de 36 nourrissons<sup>[56]</sup>. Le ministère de la santé prend alors conscience de la nécessité d'une réglementation cosmétique et soumet un projet de loi modifiant le livre V du Code de la santé publique. Ce projet met l'accent sur les conditions de fabrication, d'importation et de mise sur le marché des produits cosmétiques et des produits d'hygiène corporelle. La directive 76/768/CEE est proposée par la France au conseil de la Communauté Economique Européenne (CEE) le 6 octobre 1972<sup>[15]</sup>. Les produits de beauté sont redéfinis par l'article L658-1 du Code de la Santé publique mentionnant les produits d'hygiène comme « *toutes substances ou préparations autres que les médicaments, destinées à être mises en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain ou avec les dents et les muqueuses, en vue de les nettoyer, de les protéger, de les maintenir en bon état, d'en modifier l'aspect, de les parfumer ou d'en corriger l'odeur* ».

La directive européenne 75/768/CEE ayant subi des modifications successives, elle perd progressivement de sa lisibilité et cède définitivement la place à un texte européen, le Règlement N° 1223/2009, entré en vigueur le 11 juillet 2013<sup>[60]</sup>.

Il a pour avantage certain d'éviter les transpositions de l'ancienne directive à chaque pays état membre de l'Union européenne. Il introduit des exigences supérieures dans certains domaines du dossier d'information sur le produit (DIP) ; certains points réglementaires sont renforcés, notamment :

- l'évaluation de matières premières (pureté et qualité),
- l'évaluation de la stabilité et de la compatibilité du produit fini,
- l'évaluation de l'Interaction Contenant-Contenu (ICC),
- le rapport sur la sécurité (*safety assessment*).

Il s'agit ainsi d'uniformiser la cosmétovigilance au sein de la Communauté européenne. Par ailleurs, des règles d'étiquetage sont établies pour assurer une meilleure transparence vis-à-vis de l'information transmise aux consommateurs dans le but d'optimiser leur sécurité. Sauf exceptions (unidose, *airless*, échantillons...), tout étiquetage de produit doit obligatoirement mentionner :

- les coordonnées de la personne responsable,
- les précautions particulières d'emploi,
- les nanomatériaux présents,
- certains allergènes,
- la date jusqu'à laquelle le produit cosmétique remplit sa fonction initiale et reste sans danger pour la santé.

Sur ce dernier point, deux types d'indications sont possibles : la date de durabilité minimale (DDM) ou la période après ouverture (PAO) lorsque la DDM excède 30 mois. La question se pose alors de savoir comment déterminer ces deux périodes.

Le produit cosmétique en tant que mélange ou le principe actif d'un cosmétique peuvent être facilement modifiés dans leurs compositions sous l'influence de facteurs environnementaux et/ou intrinsèques, variables au cours du temps. Leur instabilité et leur dégradation potentielle sont d'un grand intérêt dans l'industrie cosmétique car elles peuvent conduire à une perte partielle ou complète de leur efficacité, ou bien même à une transformation possible en une substance dangereuse, risquant de compromettre la sécurité du consommateur.

Avec le temps et l'exposition aux rayons UV, la plupart des produits cosmétiques peuvent subir une dégradation par l'intermédiaire de réactions physico-chimiques telles que

l'hydrolyse, l'oxydation, l'isomérisation, la décomposition photochimique et la polymérisation. Ces réactions peuvent conduire à une diminution des concentrations en principes actifs et à la formation de sous-produits indésirables<sup>[81-3]</sup>. Ces observations ont permis de considérer la stabilité des ingrédients et des produits comme un sujet important dans le domaine de l'industrie cosmétique.

Comme le mentionne la norme ISO/TR 13097:2013 - *Guidelines for the characterization of dispersion stability* <sup>[35]</sup>, il n'existe ni méthode, ni technique universelle pour quantifier le paramètre de stabilité, en raison de la complexité des phénomènes physico-chimiques. Les phénomènes d'instabilité dépendent des interactions spécifiques du produit, c'est pourquoi il est judicieux de les appréhender par type de galénique.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'étudier une formulation cosmétique de type émulsion huile dans eau (H/E) d'une composition proche d'un produit réel, estimant qu'environ 90% des cosmétiques se présentent sous la forme d'émulsion (crèmes, laits, gommages, masques, fonds de teint, dentifrices...). Un travail de rétrospection nous a permis de sélectionner les ingrédients et de déterminer la composition adéquate permettant d'obtenir l'émulsion la plus représentative du marché actuel.

Les objectifs de ce travail étaient :

- d'une part étudier les conséquences du vieillissement sur les propriétés organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques conférées aux crèmes, pour mettre en évidence les corrélations existantes entre les conditions accélérées et le vieillissement en temps réel ;
- d'autre part étudier l'influence du rayonnement UV sur les principes actifs (conservateur(s) et antioxydant(s)) jouant un rôle dans la stabilité du produit.

Le premier objectif de ce travail de thèse avait pour but d'aider les metteurs sur le marché à cadrer leurs études de stabilité afin d'établir la durée de vie de leur produit et harmoniser leurs méthodes en proposant des outils de modélisation résultant d'une démarche expérimentale.

Le deuxième objectif se positionnait en relation directe avec la sécurité du consommateur. L'exposition à la lumière naturelle et/ou artificielle conduit à des réactions de photodégradation qui peuvent compromettre les propriétés physiques des actifs et conduire à la formation de photoproduits indésirables qui s'accumulent sur la peau. Les études de

stabilité photochimique s'intègrent également dans une problématique environnementale, les produits de soins personnels ayant été répertoriés en tant que catégorie émergente des contaminants aquatiques en raison de leur utilisation étendue et de leur entrée éventuelle dans les eaux usées. Des études ont montré que les traitements des eaux usées n'éliminent que partiellement certains produits cosmétiques qui sont ainsi susceptibles de s'infiltrer dans les milieux aquatiques<sup>[66]</sup>. Ce deuxième objectif s'inscrivait parfaitement dans un des axes majeurs de recherche du LCM : l'étude des mécanismes de dégradation de polluants au sein de matrices complexes. Pour chacune des molécules, des expériences de modélisation ont été réalisées en laboratoire pour caractériser l'effet du rayonnement UV sur les actifs cosmétiques. La démarche a ensuite consisté à identifier les produits de dégradation formés, à évaluer leur toxicité, et à attester de leur présence ou non en matrices cosmétiques.

Ce manuscrit se divise en 7 chapitres.

Le premier est consacré au contexte de l'étude. Dans une première partie, les concepts de la date de durabilité minimale et de période après ouverture sont abordés. Les résultats de deux études rétrospectives menées lors de cette thèse rappellent les contraintes réglementaires pour l'évaluation de ces deux types de dates ainsi que les types d'évaluation réalisés par les metteurs sur le marché. Le rôle des conservateurs et antioxydants dans la stabilité des produits cosmétiques est décrit avant la présentation des ingrédients sélectionnés pour cette étude. Finalement, les grands principes de la photolyse sont rappelés et des études de photodégradation directe d'actifs cosmétiques sont présentées.

Le deuxième chapitre décrit les différentes techniques expérimentales utilisées dans le cadre de ce travail. La première partie est consacrée à la mise en place de l'étude du suivi de la stabilité de l'émulsion de référence. Les techniques d'évaluation des différents paramètres sont présentées. La deuxième partie est consacrée aux études de photodégradation des molécules retenues pour cette étude : l'alpha-tocophérol et l'acide déhydroacétique. La dernière partie est dédiée à la présentation des couplages GC-MS et LC-MS utilisés pour le suivi des actifs d'intérêt lors des études de vieillissement et pour l'élucidation structurale des produits de photodégradation.

Les trois chapitres suivants sont consacrés aux résultats portant sur le suivi des paramètres organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques en conditions réelles et en conditions accélérées de vieillissement. Une extrapolation mathématique visant à corréliser les résultats du

vieillissement en temps réel à ceux obtenus en conditions accélérées est proposée pour certains de ces paramètres, afin de répondre à la problématique industrielle liée à l'évaluation accélérée de la durée de vie du produit.

La stratégie mise en place et les résultats obtenus concernant la photodégradation des deux actifs retenus pour cette étude sont rapportés sous forme d'articles dans les chapitres VI et VII.

Enfin, la conclusion dresse un bilan général des résultats obtenus et des perspectives de recherche suggérées par ces travaux de thèse.



---

## **CHAPITRE I - Contexte de l'étude**

---



## I.1 Concepts de date de durabilité minimale et de période après ouverture

### I.1.1 Définition de la date de durabilité minimale

La date de durabilité minimale (DDM) également appelée date limite d'utilisation (DLU) est définie par le Règlement (CE) 1223/2009 comme suit : « *date jusqu'à laquelle le produit cosmétique, conservé dans des conditions appropriées, continue à remplir sa fonction initiale et reste notamment conforme à l'article 3* ». L'article 3 dispose qu'un produit cosmétique mis sur le marché doit être « *sûr pour la santé humaine lorsqu'il est utilisé dans des conditions d'utilisation normales ou raisonnablement prévisibles* »<sup>[60]</sup>.

Tout produit cosmétique ayant une durée de vie inférieure à 30 mois doit présenter une date de durabilité minimale. Elle peut être affichée à l'aide du symbole "Sablier" suivi de la date au format JJ/MM/AAAA ou MM/AA et éventuellement complétée par l'indication des conditions qui doivent être remplies pour assurer la durabilité indiquée.

La détermination de la DDM prend en considération la formule (qualitative et quantitative) du produit, la qualité des matières premières, les processus de formulation, de production et de conditionnement. La date de durabilité minimale est déterminée en suivant le vieillissement du produit en temps réel, soit jusqu'à 30 mois, dans les conditions normales ou raisonnablement prévisibles d'utilisation. La fréquence des mesures est plus élevée lors de la première année (tous les 3 mois), puis diminue lors des années suivantes (tous les 6 mois).

Dans le cas particulier du paramètre température, la loi d'Arrhenius permet d'extrapoler les résultats obtenus en conditions accélérées et de les traduire en date de durabilité minimale (sous-entendu en temps réel).

$$k = A \cdot e^{-\frac{Ea}{RT}}$$

**k** : coefficient de vitesse

**A** : facteur proportionnel à la fréquence des chocs entre molécules pour une réaction donnée

**Ea** : énergie d'activation de la réaction

**R** : constante des gaz parfaits

**T** : température

*Loi d'Arrhenius*

Cette loi décrit la variation de la vitesse d'une réaction chimique en fonction de la température. Cependant, l'équation ainsi posée implique qu'une incertitude sur la valeur de  $E_a$  se traduit par une incertitude supérieure sur celle de  $k$ . Or, pour les applications en cosmétique il est généralement très difficile de connaître précisément les valeurs de  $E_a$  et de  $A$ . Par ailleurs, les réactions de dégradation des produits sont multiples et complexes : oxydation des corps gras, phénomènes de crémage/floculation/coalescence des émulsions, dégradation des principes actifs, des pigments, des agents conservateurs, etc.

Aucune réglementation ou support scientifique universellement reconnu n'a établi de protocole précis et répétable pour les études de stabilité accélérées. Les protocoles sont propres à chaque laboratoire, à chaque pays, et doivent s'adapter à la grande variété de matrices cosmétiques disponibles sur le marché.

Des lignes directrices indicatives ont été publiées par la Fédération européenne des industriels de la filière cosmétique (*Cosmetics Europe*), le Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs (CSSC), l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), l'Agence nationale brésilienne de vigilance sanitaire (ANVISA) ou encore la Commission Européenne (CE).

Dans l'industrie pharmaceutique en revanche, des protocoles et des critères d'acceptation ont été définis par l'ICH (conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain) concernant les études de stabilité des principes actifs et des produits finis. Ces lignes directrices réfèrent notamment le protocole de l'étude et les paramètres qui doivent être testés, définissent la notion de « changement significatif » ainsi que les critères d'acceptation pour les différents paramètres (ICH Q1A et Q6A)<sup>[26,25]</sup>. Elles sont précises, adaptables à tous les types de galénique, et tolèrent le recours à des méthodes de test alternatives. Un tel document de référence manque dans le domaine de l'industrie cosmétique. Le principe des études pharmaceutiques est applicable aux produits cosmétiques, à condition que des adaptations soient réalisées, notamment à cause de la différence entre la période de mise sur le marché des produits pharmaceutiques (10 ans) et celles des produits cosmétiques (quelques mois à 1 an).

Dans ce contexte, les industriels et metteurs sur le marché de produits cosmétiques développent leurs propres protocoles d'étude de stabilité, en se focalisant souvent sur le critère économique au détriment de la protection des consommateurs. Pour assurer la sécurité optimale des utilisateurs, le groupe de travail ISO/TC 217-Cosmétiques envisage de publier la norme ISO/AWI TR 18811 – Cosmétiques – Lignes directrices concernant l'évaluation de la stabilité de produits cosmétiques, norme initialement prévue pour avril 2016<sup>[34]</sup>.

En pratique, la détermination de la DDM impose des études longues et relativement coûteuses ; elle est une contrainte majeure pour les industriels et metteurs sur le marché lors du lancement d'un nouveau produit cosmétique. La stratégie consiste donc à augmenter les paramètres « température », « humidité » et « luminosité », voire « agitation » afin de réduire le facteur « temps ». On parle alors d'une étude de vieillissement en conditions accélérées ou dégradation forcée. La dégradation forcée a pour avantage de détecter précocement d'éventuelles déstabilisations, de différentes natures. Cependant, la corrélation avec la cinétique de dégradation du produit en temps réel est empirique et souvent sujette à controverse.

### **I.1.2 Evaluation de la date de durabilité minimale par les metteurs sur le marché**

Au cours de ce travail de thèse, l'évaluation de la date de durabilité minimale a fait l'objet d'une étude rétrospective de rapports de stabilité/compatibilité de produits cosmétiques. Cette étude a permis d'avoir une vue d'ensemble des pratiques utilisées par les metteurs sur le marché et de faire ressortir les différences de méthodologies. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Industries Cosmétiques*. La publication associée est présentée ci-après.

# **Etude rétrospective de rapports de stabilité/compatibilité de produits cosmétiques**

S. De Vaugelade<sup>1,2</sup>, S. Monsonogo<sup>1</sup>, C. Thomas<sup>1</sup>, S. Bouchonnet<sup>2</sup> et S. Pirnay<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> EXPERTOX Laboratory, 75011 PARIS, France

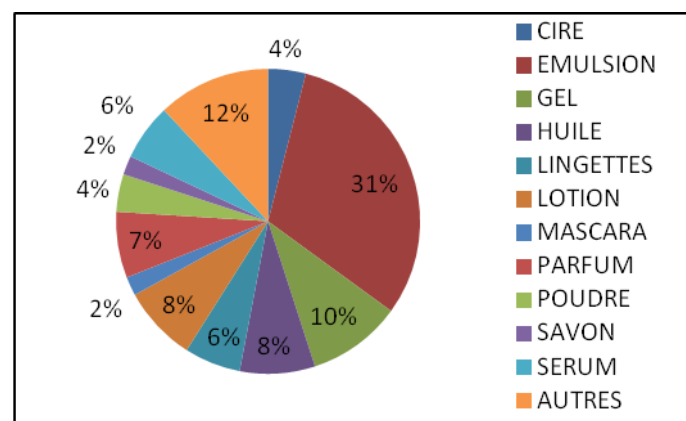
<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Moléculaire, École polytechnique, UMR-9168, 91128 Palaiseau Cedex, France

*Industries Cosmétiques* **2016**, 12, 40-43

## Introduction

Cette étude rétrospective, basée sur 100 rapports de stabilité et de compatibilité, a été réalisée afin d'analyser les différences de méthodologies, de critères évalués, et de conditions de test utilisées pour évaluer la Date de Durabilité Minimale (DDM) de produits cosmétiques.

Les rapports de tests ont été rédigés par 73 laboratoires et édités entre le 1<sup>er</sup> janvier 2014 et le 31 mai 2016. L'analyse des données a mis en évidence le fait que 32 tests ont été menés par le fabricant lui-même et 68 par un laboratoire sous-traitant. Il apparaît également qu'ils ont été réalisés sur des produits cosmétiques de 23 formes galéniques différentes (émulsion, gel, huile, lotion, parfum, lingettes...). Sans surprise, les émulsions se sont révélées être la forme la plus représentative. (Figure 1). En effet, la maîtrise de la formulation et des procédés de fabrication des émulsions ouvrent un vaste champ d'applications. De nombreux produits très différents sont accessibles par la science des émulsions, d'où leur grande popularité.



**Figure 1 : Différentes formes galéniques étudiées**

Cette étude a été menée selon deux axes. Le premier considère la totalité des critères mesurés (pH, viscosité, densité...) alors que le second est plus spécifiquement consacré aux facteurs environnementaux étudiés dans le cadre des tests réalisés (température, lumière, humidité...). Les variabilités observées sont analysées dans chacun des cas.

Il est à préciser que cette étude rétrospective ne prend pas en considération l'évaluation microbiologique, une étude spécifique à ce critère ayant été précédemment publiée par l'équipe EXPERTO en 2014<sup>[1]</sup>.

## Résultats de l'étude

### *Stabilité et compatibilité - définitions et confusions observées*

La stabilité est liée à la formule du cosmétique, elle peut être définie par la capacité à résister au cours du temps à une évolution intrinsèque vers un état d'équilibre thermodynamiquement favorisé. Un test de stabilité met en évidence des échanges physiques et chimiques pouvant avoir lieu dans le produit, faisant abstraction des interactions entre le produit et l'emballage. Le contenant utilisé est inerte. Ce test est souvent réalisé juste après l'étape de développement de la formule, en amont du choix des conditions de conditionnement. Il peut être important de connaître dans un premier temps la stabilité de la formule seule, surtout si cette dernière est destinée à être commercialisée dans différents contenants<sup>[2]</sup>.

La compatibilité est l'observation de toute évolution spécifique à l'ensemble produit et emballage. Elle est plus proche des conditions normales d'utilisation et de vente, et répond davantage à l'évaluation en conditions normales ou raisonnablement prévisibles de stockage. Ce test de compatibilité est souvent complété par un test d'Interaction Contenant-Contenu (ICC) : Dosage des molécules migrantes de l'emballage dans le produit et/ou dans des simulants<sup>[3] [4]</sup>.

Les premiers résultats de l'étude ont montré que les données communiquées par les laboratoires sont soit réparties dans deux rapports de tests indépendants, un de stabilité et un de compatibilité, soit regroupés dans un seul et même rapport généralement nommé « tests de stabilité et de compatibilité ». Cette première observation a montré que les termes utilisés pour la dénomination des rapports ne sont pas toujours en adéquation avec les analyses réalisées. En effet sur les 42 rapports dénommés « test de stabilité » 5 prennent en compte des critères de compatibilité. Sur les 54 rapports dénommés « test de stabilité et de compatibilité » seuls 38 prennent en compte les critères de compatibilité. Et enfin, sur les 3 rapports dénommés « test de compatibilité », 1 seul peut être considéré comme test de compatibilité. Seulement 1 rapport n'a pas de dénomination.

Une première confusion peut alors être faite dès la lecture du nom du rapport et donc modifier l'interprétation des résultats de ce dernier.



## *Critères mesurés*

Douze critères ont été mis en évidence permettant de contrôler l'intégrité des produits cosmétiques.

Leurs évaluations lors des tests, toutes formes galéniques confondues, sont présentées dans le Tableau 1. Certains critères ne sont pas applicables à toutes formes de produit, ils sont dépendants du type de galénique; c'est pourquoi nous privilégions ici les critères majoritairement évalués pour la forme émulsion qui est de loin la plus représentée (Tableau 1). En pratique les laboratoires de tests ont tendance à se baser sur le protocole établi pour le type émulsion, puis à l'adapter aux différentes formes en ajoutant ou supprimant des critères de mesure.

**Tableau 1 : Critères mesurés au cours des tests**

Critères	Effectifs sur 100 produits (en%)	Effectifs sur 31 émulsions (en %)
Paramètres organoleptiques	98	97
pH	73	87
Viscosité	27	45
Densité	25	32
Résistance à la centrifugation	12	16
Indice de réfraction	3	0
Indice d'acidité	2	0
Présence de suspension	1	0
Taille des particules	1	1
Fonctionnalité (en lien avec les revendications et l'efficacité)	1	0
Contrôle visuel de l'emballage*	33	35
Poids*	12	13

*\* Critères liés à la compatibilité uniquement.*

Parmi les 31 rapports d'émulsion étudiés, nous remarquons la nette prédominance du critère "paramètres organoleptiques", retrouvé dans 97% des tests, et du critère "pH", mesuré dans 87% des cas. Ainsi, les industries cosmétiques s'appuient majoritairement sur l'aspect, la couleur, l'odeur et le pH du produit pour attester de sa stabilité. Néanmoins, le contrôle de ces critères ne peut s'affranchir d'une part de subjectivité, qui prend effet dès lors que l'opérateur, seul, appose son approbation quant à la préservation des paramètres organoleptiques du produit. De plus, il apparaît que 5 tests s'appuient uniquement sur les paramètres organoleptiques et le pH, faisant ainsi abstraction des autres critères. Ces derniers sont pourtant nombreux et variés. Ces 5 tests de stabilité présentent de prime abord un point discutable quant à la pertinence de leur validation : Peut-on estimer que le test de stabilité

apporte suffisamment de preuves sur la stabilité et l'intégrité du produit, si celui-ci porte essentiellement sur l'évaluation de critères subjectifs et la valeur du pH ? N'y a-t-il pas une possibilité que le produit soit devenu instable avant que cela soit visible à l'œil nu ? Pour ces tests de stabilité basés sur l'observation de critères macroscopiques et d'une seule mesure physico-chimique, il est possible que certaines informations relatives à l'intégrité du cosmétique échappent à l'opérateur en charge de l'évaluation.

Une étude menée en 2005 par H. Masmoudi et coll. a voulu prévoir, sur des durées inférieures aux temps d'analyse habituellement utilisés, si un produit (émulsion) pouvait devenir instable avant qu'une séparation de phases soit observée à l'œil nu<sup>[5]</sup>. Pour cela, des tests par spectrophotométrie et conductimétrie ont été conduits en plus des tests classiques (pH, aspect, viscosité...). Les résultats montrent que la conductimétrie est la méthode la plus précise pour évaluer la stabilité et qu'une dégradation a bien lieu avant que l'intégrité du produit ne semble visiblement compromise. Par ailleurs, les auteurs ont fait remarquer que les variations de viscosité étaient cohérentes avec les variations observées par conductimétrie, bien plus que celles des autres critères tels que les paramètres organoleptiques ou le pH. Pourtant sur les 33 rapports de tests de stabilité d'émulsion, seulement 14 ont évalué la viscosité de leur produit, les autres privilégiant les paramètres organoleptiques et le pH.

### ***Les conditions de test***

#### **Type de conditionnement choisi pour la réalisation des tests**

Notre étude a montré que :

- 28 tests ont été réalisés dans l'emballage de vente ou un équivalent
- 16 tests ont été réalisés à la fois dans l'emballage de vente et dans le verre
- 11 tests ont été réalisés dans le verre ou autre matériau considéré comme inerte
- 16 tests ont été réalisés dans du plastique dont la composition n'est pas précisée
- l'aluminium, et différents plastiques (polyéthylène, polyéthylène moyenne densité, polyéthylène téréphtalate) sont autant de conditionnements également retenus pour conduire les tests (13 dénombrés).

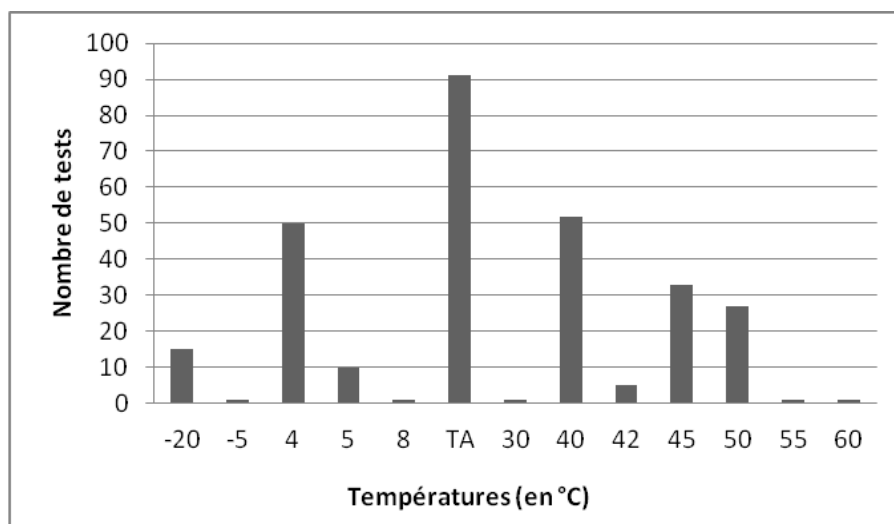
L'information concernant le type de matériau utilisé pour conduire les expérimentations, est présente dans 84% des rapports de tests.

Là encore, la différenciation des termes stabilité et compatibilité doit normalement prendre tout son sens, or comme nous l'avons vu précédemment, les laboratoires ne font pas toujours une différenciation précise des tests dans l'intitulé de leur rapport. Cette confusion se retrouve dans le type de conditionnement utilisé. Certains testent le produit dans son emballage de vente sans prendre des mesures liées à la compatibilité (perte de poids, aspect visuel de l'emballage, perméabilité...), d'autres au contraire prennent en compte l'ensemble des matériaux pouvant être en contact avec le produit en leur attribuant à chaque fois des mesures de compatibilité.

### Facteurs environnementaux

L'influence de trois facteurs environnementaux : température, humidité et exposition aux rayons UV a pu être observée au cours de cette étude rétrospective.

Le facteur température a été décrit dans 100% des cas. Treize températures ont été testées au cours des expérimentations, sur une gamme allant de -20 °C à 60 °C (Figure 2). Quarante-seize contrôles ont été réalisés à température ambiante, 52 après stockage à 40 °C, 33 après stockage à 45 °C, 27 après stockage à 50 °C, 10 après stockage à 5 °C et 50 après stockage à 4 °C. Seize expérimentations ont été également réalisées après stockage à une température négative ( $\leq -5$  °C).



TA : Température ambiante

**Figure 2 : Températures utilisées au cours des tests**

Néanmoins, même si les températures froides ont un impact sur l'intégrité des produits, elles ne font pas partie des conditions justifiées de vieillissement accéléré et le fait qu'elles soient prises en considération lors de certains tests de stabilité et compatibilité est la preuve d'une certaine rigueur.

Par ailleurs, le choix des températures testées n'est pas justifié dans les rapports de tests alors que celui-ci devrait être fonction du type de produit, ainsi qu'il est indiqué à l'Annexe I du Règlement Cosmétique du Conseil Européen de 2009<sup>[6]</sup>. Par exemple, la température de 42 °C, deux degrés d'écart par rapport à la référence du COLIPA (Fédération européenne des industries cosmétiques, devenue en 2012 *Cosmetics Europe*)<sup>[7]</sup>, n'a pas de justification scientifique ; ceci est valable pour toutes les gammes de températures pour lesquelles des variations d'un ou deux degrés sont remarquées.

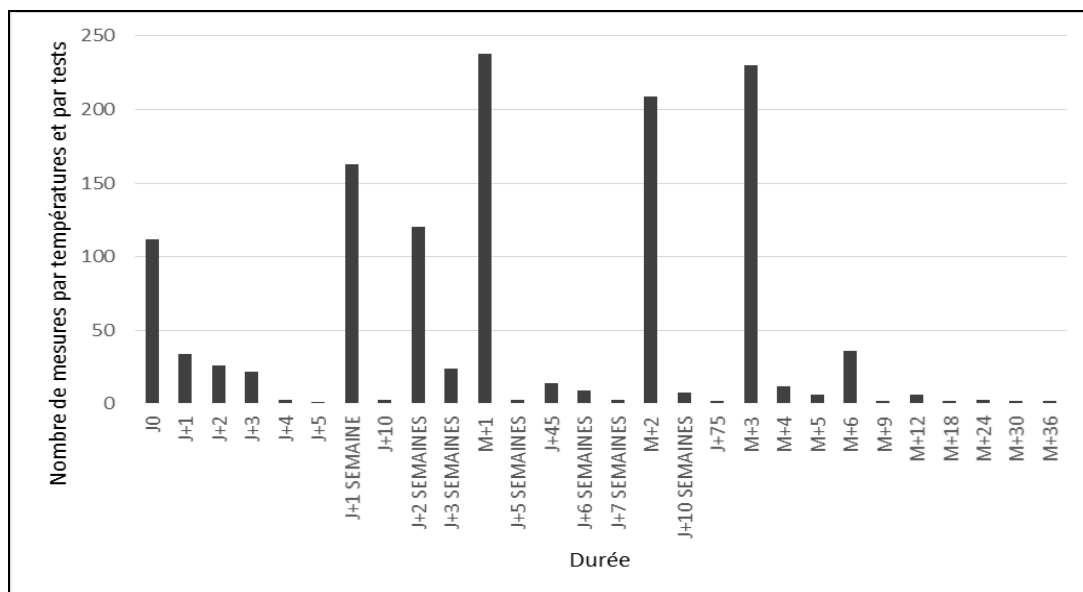
Concernant les deux autres paramètres, seuls 8 tests prennent en compte l'exposition aux rayons UV, et 31 tests prennent en compte le facteur humidité.

Les indications sur les conditions d'exposition à la lumière ne sont pas toujours précisées. Ceci n'est pas pertinent pour les températures élevées car l'on peut imaginer que les tests réalisés en étuve sont à l'obscurité. Pour les tests menés à température ambiante, en revanche, les conditions d'exposition à la lumière devraient être précisément décrites le cas échéant.

### **Durée des tests et espacement des mesures**

Là encore, la variabilité des tests est notable dans le choix des temps de mesure : le temps le plus court représenté est J+1 tandis que le plus long peut atteindre J+36 mois. Au total 27 temps de mesures différents ont été dénombrés.

La Figure 3 illustre l'espacement des mesures au cours des tests en fonction du temps. Les temps de mesure les plus représentés sont les suivants : J+1 semaine, J+2 semaines, J+1 mois, J+2 mois et J+3 mois. Il est à noter qu'une faible proportion de mesures est menée au-delà de 3 mois.



**Figure 3 : Distribution du nombre de mesures au cours des tests en fonction du temps**

Enfin, il est observé que la fréquence des mesures est plus élevée les premières semaines : mesures tous les jours lors de la première semaine. L'intervalle de temps en début de test est souvent réduit afin d'éviter de manquer une modification qui aurait une cinétique rapide, l'intervalle de temps au-delà de 2 semaines est ensuite allongé à 1 mois.

## Conclusion

Les résultats de cette étude rétrospective entre janvier 2014 et mai 2016 ont premièrement mis en évidence les confusions et divergences de protocoles destinés à évaluer la stabilité et/ou la compatibilité d'un produit cosmétique. Si l'interprétation des résultats des tests doit permettre de conclure quant à la stabilité intrinsèque d'une formule ou à celle d'un produit fini dans les conditions normales ou raisonnablement prévisibles de stockage, seule une lecture approfondie et critique du rapport permettra de se prononcer sur l'innocuité du produit pour le consommateur.

Cette étude a également montré la prédominance de certaines mesures dans les tests (notamment les paramètres organoleptiques et le pH) aux dépens de critères plus pertinents, un manque de précision et de justification quant aux choix des critères environnementaux sélectionnés et enfin une variabilité dans les temps de mesures et la durée des tests.

Enfin, il ne faut pas oublier que ces tests sont réalisés dans le but d'établir la date de durabilité minimale du produit (DDM) ou sa période d'utilisation après ouverture (PAO). Une étude

rétrospective sur les méthodes de calcul d'estimation de la PAO, qui comme l'évaluation des stabilités reste à l'appréciation de la personne responsable, est en cours de réalisation par EXPERTO. Elle permettra d'évaluer le choix des critères, l'influence des sous-critères sur le calcul final de la PAO et les méthodes de calcul final pratiquées.

## Références

- [1] S. Pirnay, J. Longis, S. Lafosse. Etude microbiologique de différentes galéniques. *Expression Cosmétique* **2011** 194, 26-29.
- [2] T. Mitsui. *New Cosmetic Science*. Elsevier Science. **1997**, 191-198.
- [3] B. Briasco, P. Capra, A. Cecilia Cozzi, B. Mannucc, P. Perugini. Packaging Evaluation Approach to Improve Cosmetic Product Safety. *Cosmetics* **2016**, 3 (3), 1-12.
- [4] C. Mehta Kunal, D. Akhilesh, B. Shyam Kumar. Recent Trends in Pharmaceutical Packaging: A Review. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences* **2012**, 1, 1282–1292.
- [5] H. Masmoudi, Y. Le Dréau, P. Piccerelle, J. Kister. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, 289, 117-131.
- [6] Parlement Européen. Règlement cosmétique (CE) N°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques. *Journal officiel de l'Union européenne*. **2009**. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32009R1223> (accédé 08-16)
- [7] European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). *Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Product*. **2004**. <http://www.packagingconsultancy.com/pdf/cosmeticscolipa-testing-guidelines.pdf> (accédé 08-16)

### **I.1.3 Définition de la période après ouverture**

Les produits cosmétiques de durée de vie supérieure à 30 mois doivent présenter une période dite période après ouverture (PAO), définie par l'ANSM comme la « *durée pendant laquelle le produit est sûr après son ouverture et peut être utilisé sans dommages pour le consommateur* ». C'est la durée, en mois, pendant laquelle le produit restera en bon état après que le consommateur ait utilisé le produit pour la première fois.

Le symbole d'un pot de crème ouvert est utilisé et le temps en mois est indiqué à l'intérieur ou à côté du symbole (Figure I-1).



**Figure I-1 : Symbole de la période après ouverture**

### **I.1.4 Evaluation de la période après ouverture par les metteurs sur le marché**

Au cours de ce travail de thèse, l'évaluation de la période après ouverture a fait l'objet d'une étude rétrospective basée sur 50 rapports d'évaluation. Cette étude nous a permis d'analyser les différences de critères, de notations et de calculs utilisés par les metteurs sur le marché pour l'estimation de la PAO. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Industries Cosmétiques*. La publication associée est présentée ci-après.

# **Etude rétrospective des méthodes d'évaluation de la Période Après Ouverture (PAO)**

S. De Vaugelade<sup>1,2</sup>, S. Monsonogo<sup>1</sup>, C. Thomas<sup>1</sup>, S. Bouchonnet<sup>2</sup> et S. Pirnay<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> EXPERTOX Laboratory, 75011 PARIS, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Moléculaire, École polytechnique, UMR-9168, 91128 Palaiseau Cedex, France

*Industries Cosmétiques* **2017**, 13, 36-40



## Introduction

Depuis le 11 juillet 2013, l'application du Règlement (CE) 1223/2009 vise à simplifier les procédures administratives relatives à la mise sur le marché des produits cosmétiques et à renforcer le cadre réglementaire et les contrôles pour les produits sur le marché, afin d'assurer un niveau de protection élevé des consommateurs.<sup>[1]</sup>

Parmi les nouvelles exigences en vigueur, des règles strictes d'étiquetage ont été établies. Elles imposent de mentionner, entre autres, les coordonnées de la personne responsable, les précautions particulières d'emploi, la présence ou non de nanomatériaux, de certains allergènes et surtout la date de durabilité minimale ou la période après ouverture (PAO). En effet, il est du devoir du metteur sur le marché de déterminer précisément la date jusqu'à laquelle le produit cosmétique continue de remplir sa fonction initiale et reste sans danger pour la santé, et d'en informer clairement l'utilisateur.

La date de durabilité minimale (également appelée date limite d'utilisation ou DLU) est définie par le règlement comme suit : « *date jusqu'à laquelle le produit cosmétique, conservé dans des conditions appropriées, continue à remplir sa fonction initiale et reste sûr pour la santé humaine lorsqu'il est utilisé dans des conditions d'utilisation normales ou raisonnablement prévisibles* ». Elle figure sur l'emballage au format JJ/MM/AAAA ou MM/AA et est éventuellement complétée par l'indication des conditions qui doivent être remplies pour assurer la durabilité indiquée.

Lorsque la date de durabilité minimale est supérieure à 30 mois, il n'est pas obligatoire qu'elle figure sur l'emballage ; elle peut alors être remplacée par la PAO, définie par l'ANSM comme la « *durée pendant laquelle le produit est sûr après son ouverture et peut être utilisé sans dommages pour le consommateur* ». Elle figure sur l'emballage sous forme d'un symbole représentant un pot de crème ouvert annoté de la mention : xM ou xA.

Le concept de PAO repose principalement sur la stabilité microbiologique des produits cosmétiques, étant donné qu'il s'agit du point le plus critique pour la sécurité du consommateur. A ce sujet, un renforcement des exigences concernant les limites microbiologiques acceptables pour un produit cosmétique est paru en janvier 2015, à travers la norme NF EN ISO 17516 Cosmétiques – Microbiologie – Limites microbiologiques.<sup>[2]</sup>

Le concept de PAO n'est cependant pas pertinent dans les cas suivants :

- Produits à usage unique  
*Exemple : unidoses*
- Produits dont l'emballage ne s'ouvre pas  
*Exemple : aérosols*
- Produits dont la formulation est hostile au développement de tous micro-organismes  
*Exemple : activité de l'eau ( $a_w < 0,6$ ), pH extrême, présence d'alcool*

En 2006, l'ANSM a publié des « Recommandations relatives à l'estimation de la période après ouverture (PAO) ».<sup>[3]</sup> L'autorité rappelle que « *le risque microbiologique est le point majeur à prendre en compte pour l'évaluation de la PAO* » et précise que la valeur de PAO théorique (PAO<sub>th</sub>) doit être validée par des essais expérimentaux menés en amont et en aval de cette valeur.

Un prérequis indispensable à l'estimation de la PAO est l'analyse et la gestion du risque microbiologique pour tout metteur sur le marché de produits cosmétiques. Afin de garantir la qualité microbiologique de ses produits, le fabricant doit réaliser des dénombrements des germes aérobies totaux (DGAT) sur les matières premières, sur le matériel et locaux de fabrication, et sur le produit fini. Il doit également vérifier l'efficacité du système conservateur par un « *challenge test (CT)* ».

La PAO<sub>th</sub> est ensuite estimée en considérant 5 critères « *pertinents, mais non exhaustifs* » significatifs pour le risque microbiologique :

- la formulation : adaptation du système conservateur à la sensibilité intrinsèque de la formule,
- l'interface produit/environnement lié à l'utilisation, au type de conditionnement et au mode de distribution du produit (pot, tube, flacon, pompe, etc.),
- la durée prévisible d'utilisation : adéquation du rapport volume/dose/fréquence,
- la zone d'application,
- la population cible.

Chaque critère est coté de 1 à 4 (4 représentant le niveau de risque le plus élevé). La multiplication des 5 facteurs entre eux permet de calculer le risque théorique (RT), auquel correspond une PAO<sub>th</sub> : ≤ 6 mois, ≤ 18 mois, ou non applicable, qui s'accompagne alors de la révision du produit dans son ensemble.

## **Matériel et méthode**

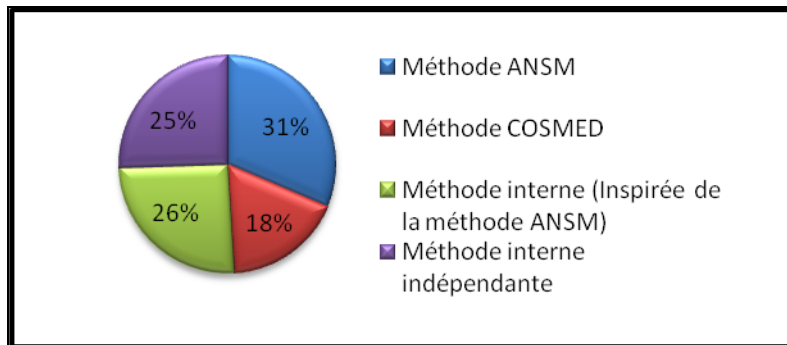
Cette étude rétrospective, basée sur 50 rapports d'estimation de la période après ouverture, a été réalisée afin d'analyser les différences de méthodologies, de critères évalués, et de niveaux de risque utilisés pour évaluer la Période Après Ouverture (PAO) de produits cosmétiques. Les rapports d'évaluation ont été rédigés entre le 1<sup>er</sup> janvier 2014 et le 31 mai 2016, et proviennent d'Europe, de Chine, d'Amérique du Nord et du Moyen Orient.

Cette étude a été menée selon trois axes. Le premier considère les catégories de critères évalués (formulation, population cible...), le second est plus spécifiquement consacré aux facteurs de risques appliqués aux critères. Enfin, le troisième présente les méthodes de calcul final d'estimation de la PAO. Les variabilités observées sont analysées dans chacun des cas.

Il est à préciser que cette étude rétrospective ne prend pas en considération l'évaluation de la DLU, cette dernière a été préalablement évaluée et est supérieure à 30 mois dans l'ensemble des rapports de cette étude. Une étude spécifique aux tests de stabilité et compatibilité permettant d'évaluer la DLU a été précédemment réalisée par l'équipe EXPERTO<sup>[4]</sup>.

### ***Méthodes d'estimations***

Les premiers résultats de l'étude ont mis en évidence le fait que 40 évaluations ont été menées par le fabricant lui-même et 10 par un laboratoire ou cabinet sous-traitant. Dix-neuf méthodes d'estimations ont ainsi été identifiées, elles sont propres à un laboratoire spécifique ou suivent les recommandations d'une autorité compétente ou d'une fédération d'industriels (Figure 1). La méthode COSMED propose 5 thèmes d'analyse du risque : Microbiologie, composition, emballage, fonction/mode d'emploi, et risques particuliers. Le calcul retenu pour cette méthode soustrait la durabilité (D) à la somme des risques (R). Il est important de noter qu'un laboratoire sur quatre utilise une méthode interne qui lui est propre.



**Figure 1 : Méthodes utilisées pour l'établissement de 50 rapports d'estimation de la PAO**

### *Critères évalués*

L'analyse des données a montré l'utilisation de 15 critères pour évaluer la PAO des produits cosmétiques. Le nombre de critères utilisés par méthode varie entre 3 et 8. 11 méthodes sur 19 évaluent les 5 critères définis par l'ANSM (voir ci-dessus). Les autres méthodes suppriment, modifient ou ajoutent des critères. Certains critères sont alors spécifiques à une méthode et n'entrent pas dans ceux définis par les autorités compétentes ou les fédérations :

- risques particuliers,
- analytique,
- expérience avec des formulations ou produits similaires,
- habitudes et pratiques des consommateurs,
- mode d'emploi (rinçage),
- composition-*process*,
- données de stabilité,
- étapes critiques de fabrication et conditionnement,
- procédé de fabrication,
- fabrication selon les bonnes pratiques de fabrication applicables aux produits cosmétiques.

Afin de préciser l'évaluation des critères et faciliter la cotation de ces derniers, les évaluateurs attribuent des sous-critères. (Tableau 1)

**Tableau 1 : Critères et sous-critères évalués par 19 méthodes d'évaluation de PAO**

<b>Critères et sous critères</b>	<b>Nombre de méthodes prenant en compte le critère</b>
<b>ANALYTIQUE</b>	<b>1</b>
Absence de sous critères	1
<b>COMPOSITION-PROCESS</b>	<b>2</b>
% d'alcool	2
% d'eau	2
Maîtrise du processus de conditionnement	2
Maîtrise du processus de fabrication	2
Présence de substances dégradables	1
Présence substances nutritives	1
Protection de la formule	1
<b>DONNEES DE STABILITE</b>	<b>3</b>
Absence de sous critères	3
<b>DUREE D'UTILISATION</b>	<b>12</b>
Conditions de stockage	1
Dose	1
Fréquence	1
Mode de délivrance du produit	2
Produits multi utilisateurs	2
Rapport dose/volume/fréquence total	5
Volume	1
Absence de sous critères	4
<b>ETAPES CRITIQUES DE FABRICATION ET INTERFACE PRODUIT/ENVIRONNEMENT</b>	<b>1</b>
Validation étapes de fabrication et de conditionnement	1
<b>EXPERIENCE AVEC DES FORMULATIONS OU PRODUITS SIMILAIRES</b>	<b>3</b>
Absence de sous critères	3
<b>FABRICATION SELON LES BONNES PRATIQUES DE FABRICATION APPLICABLES AUX PRODUITS COSMETIQUES</b>	<b>2</b>
Absence de sous critères	2
<b>FORMULATION</b>	<b>18</b>
% d'alcool	2
% d'eau	4
pH produit	4
Présence de substances dégradables	4
Présence de substances fonctionnelles	1
Présence de substances oxydatives	2
Résultats challenge test	7
Type de galénique	8
Absence de sous critères	7
<b>HABITUDES DES CONSOMMATEURS ET PRATIQUES</b>	<b>4</b>
Autres mésusages	1

Conditions de stockage	2
Produits multi utilisateurs	2
Utilisation plus longue que prévue	2
Absence de sous critères	2
<b>INTERFACE PRODUIT/ENVIRONNEMENT</b>	<b>18</b>
Contact avec le consommateur	1
Rapport dose/volume/fréquence total	1
Type d'emballage	10
Volume	1
Absence de sous critères	7
<b>MODE D'EMPLOI</b>	<b>7</b>
Catégorie de personne	1
Nature surface corporelle	1
Produits rincés	6
Absence de sous critères	1
<b>POPULATION CIBLE</b>	<b>14</b>
Catégorie de personnes	10
Absence de sous critères	4
<b>PROCEDE DE FABRICATION</b>	<b>1</b>
Validation méthode de fabrication	1
<b>RISQUES PARTICULIERS</b>	<b>2</b>
Conditions de stockage	1
Produits multi utilisateurs	1
Produits nomades	2
<b>ZONE D'APPLICATION</b>	<b>14</b>
Exposition à la lumière	3
Nature surface corporelle	10
Absence de sous critères	4

Pour un même critère, le nombre de sous-critères peut varier de 0 à 8.

Pour le critère *formulation* évalué par 18 méthodes, 7 méthodes évaluent uniquement les résultats du challenge test, 4 méthodes prennent en compte le type de galénique, la nature des matières premières (ex : présence de substances nutritives), la composition en eau, la composition en alcool et/ou le pH du produit, 7 méthodes ne donnent pas de détails sur ce critère.

Pour le critère *produit/environnement* évalué par 18 méthodes, 9 méthodes évaluent uniquement le type d'emballage, 2 méthodes ajoutent à ce critère l'évaluation du contact avec le consommateur et/ou la surface de contact avec l'environnement, 7 méthodes ne donnent pas de détails sur ce critère.

Pour le critère *zone d'application* évalué par 14 méthodes, 7 méthodes évaluent uniquement la nature de la surface corporelle sur laquelle le produit est appliqué, 3 méthodes ajoutent l'exposition à la lumière de la zone d'application, 4 méthodes ne donnent pas de détails sur ce critère.

Pour le critère *population cible* évalué par 14 méthodes, 10 méthodes évaluent les catégories de personnes, 4 méthodes ne donnent pas de détails sur ce critère.

Pour le critère *durée d'utilisation* évalué par 12 méthodes, 5 méthodes évaluent uniquement le rapport dose/volume/fréquence, 2 méthodes ajoutent le mode de délivrance du produit, 1 méthode n'évalue que le volume total du produit, et 4 méthodes ne donnent pas de détails sur ce critère.

Il en est de même pour les autres critères.

Cette variabilité est due à la définition que l'on donne à chaque critère et donc aux choix des paramètres qui leur sont attribués. Par exemple, la définition donnée par l'ANSM du critère *formulation* est claire et est ciblée sur « la capacité du système conservateur à conserver l'intégrité intrinsèque de la formule », dans ce cas le paramètre microbiologique est impliqué. C'est à l'évaluateur de choisir les paramètres permettant de préciser ce critère pour faciliter sa cotation. Lors de cette étape, l'évaluateur se voit confronter à un large choix de paramètres liés à l'aspect microbiologique d'une part : pH de la formule, % en eau, activité de l'eau, résultats du challenge test, et à l'aspect composition intrinsèque de la formule d'autre part : nature des matières premières, présence de substances sensibles...

### ***Cotations et facteurs de risque***

Avant d'aborder l'étude de cotation, il est important de différencier les notions de danger, de risque et de facteur de risque.

Un danger est une propriété ou une capacité d'un objet, d'une personne, ou d'un processus pouvant entraîner des conséquences néfastes, ici la dégradation du produit ou l'insécurité du consommateur. Un danger est donc une source possible d'accident (contamination du produit par des microorganismes de l'air, pénétration du produit via les couches épidermiques des zones d'application...)

Le risque est la probabilité que la dégradation du produit se manifeste effectivement, ou qu'une réaction au produit apparaissent chez l'utilisateur.

Les facteurs de risques sont des éléments qui peuvent augmenter ou diminuer la probabilité de survenance d'un accident ou la gravité d'un événement.<sup>[5,6]</sup>

Considérons, par exemple, un danger : produit contaminé par un microorganisme, un risque : risque d'infection cutanée et un facteur de risque : le fait de ne pas utiliser de conservateurs dans la formule. Ce n'est pas l'absence de conservateurs qui infecte, mais le microorganisme, et le fait d'utiliser le produit sans conservateurs augmente le risque.

L'évaluateur de la PAO va donc devoir attribuer à chaque critère et sous-critères des facteurs de risques et décider si le critère évalué augmente ou diminue la probabilité de dégradation du produit, augmente ou diminue la protection de l'utilisateur.

Les résultats de cette étude sur les facteurs de risque montrent l'utilisation de différentes gammes de cotations. Treize méthodes utilisent une gamme de facteurs de risque allant de 0 à 4, 4 méthodes utilisent une gamme de 0,5 à 4, et enfin 2 méthodes utilisent une gamme allant de 1 à 4.

La question de facteur de risque se pose pour l'ensemble des critères. Afin d'illustrer cette différence de cotation, 2 exemples sont présentés :

Selon le nombre de catégories d'emballages considérées par la méthode : 5 pour la méthode 1, 4 pour la méthode 2 et 3 pour la méthode 3, l'emballage « pot » par exemple peut obtenir un facteur de risque de 4 ou de 3, l'emballage flacon pompe peut obtenir un facteur de risque de 1 ou de 2, et l'emballage de type *airless* peut obtenir un facteur de risque de 0,5 ou de 1.



**Tableau 2 : Différence de cotation (sous-critère : type d'emballage)**

Type d'emballage	Méthode 1	Pot	4
		Flacon	3
		Tube	2
		Flacon pompe	1
		Aérosol/ <i>Airless</i>	0,5
	Méthode 2	Pot	4
		Flacon avec bouchon dévissable	3
		Tube/Flacon pompe	2
		<i>Airless</i> /Aérosol/Vaporisateur	1
	Méthode 3	Pot	3
		Tube ou flacon pompe	2
		<i>Airless</i>	1

Il en est de même pour les catégories de personnes prises en compte (Tableau 3). La catégorie enfant peut par exemple obtenir un facteur de risque de 1, 2 ou 3.

**Tableau 3 : Différence de cotation (sous-critère : catégorie de personnes)**

Catégorie de personnes	Méthode 1	Nourrissons/personnes âgées	2
		Enfants (3 à 12 ans)	1
		Adultes	0,5
	Méthode 2	Bébés (< 3 ans)	4
		Enfants (3 à 12 ans)	3
		Séniors (> 60 ans)	2
		Adolescents, Adultes	1
	Méthode 3	Nourrissons/personnes âgées	3
		Enfants	2
		Adultes	1

Ces diverses notations ont pour conséquence des différences d'influence des sous-critères, pouvant aller de 1/4 à 1/36 dans le calcul mathématique final. Dans notre comparaison de 19 méthodes, le test du pH peut avoir une importance de 1/15 comme une importance de 1/36 dans le calcul mathématique final. Cela signifie que selon le nombre de critères, de sous-critères et de la gamme de facteur de risque utilisée, un même sous-critère aura, soit beaucoup, soit très peu de poids dans le calcul final.

## *Méthodes de calcul*

Cette étude a relevé l'utilisation de deux modes de calculs :

Le premier correspond à la différence entre la DDM (30 M) et la somme des notes de chacun des critères ou sous-critères. Ce mode de calcul est utilisé par 6 méthodes.

$$PAO = DDM - (\sum \text{NOTES}) = 30 \text{ M} - \text{TOTAL DES RISQUES}$$

Le second correspond à la PAO théorique, obtenu en faisant le produit des notes attribuées à chacun des critères ou sous-critères. Selon l'intervalle dans lequel se trouve la PAO théorique, la PAO est déterminée. Ce mode de calcul est utilisé dans 13 méthodes.

$$PAO_{Th} = RT = \Pi (\text{NOTES})$$

Intervalles de PAO théorique :

$$RT \geq 1 \text{ et } \leq 8 \Rightarrow PAO_{Th} \leq 18 \text{ mois}$$

$$RT > 8 \text{ et } \leq 48 \Rightarrow PAO_{Th} \leq 6 \text{ mois}$$

$$RT > 48 \Rightarrow PAO_{Th} \text{ non applicable (revoir la conception du produit)}$$

Un exemple illustre l'impact de la méthode de calcul sur la PAO :

Pour un même produit (type encre de tatouage), les notes obtenues aux 5 critères sur lesquels est basée leur évaluation sont : A : 1, B : 1, C : 2, D : 2, E : 1.

En suivant le premier mode de calcul, une PAO inférieure à 18 mois est déterminée. En suivant le second mode de calcul, la PAO est définie à 23 mois.

Ces différences ont une conséquence directe sur la valeur de la PAO finale. Ceci nous amène à aborder d'un point de vue critique cette méthode théorique d'évaluation de la PAO.

L'inconvénient majeur de cette méthode se basant sur une estimation, donc une détermination théorique, est que l'attribution des cotations et le choix du mode de calcul sont laissés à la libre appréciation du responsable de la mise sur le marché. L'appréciation des différents critères est hautement subjective. En effet, pour la zone d'application par exemple, si le contour de l'œil est coté 4, le contour des lèvres est-il coté 1 comme toute application en topique, 2, 3 ou 4 ? C'est pourquoi un travail rigoureux doit être fait sur la recherche d'une

définition quantifiable du risque, cette recherche est l'étape la plus déterminante dans l'estimation de la PAO. Si cette étape est négligée, l'évaluateur, par l'intermédiaire du RT, peut faire varier la valeur de la PAO ou plus grave encore, s'en servir d'outil marketing.

## **Conclusion**

Les résultats de cette étude rétrospective entre janvier 2014 et mai 2016 ont mis en évidence les divergences de méthodes d'estimation de la PAO : les critères pris en compte dans la méthode d'estimation, le choix des sous-critères qui les définissent, l'influence des sous-critères par l'attribution du facteur de risque et enfin le calcul mathématique final. C'est pourquoi, comme l'indique les recommandations de l'ANSM, il est nécessaire de valider cette estimation théorique en pratique par des résultats expérimentaux sur le produit lui-même ou un produit jugé représentatif par l'évaluateur (paramètres physico-chimiques critiques et paramètres microbiologiques).

## **Références**

- [1] Parlement Européen. Règlement cosmétique (CE) N°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques. *Journal officiel de l'Union européenne*. **2009**. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32009R1223> (accédé 10-16)
- [2] International Organization for Standardization. NF EN ISO 17516 Cosmétiques - Microbiologie. Limites microbiologiques. **2015**.
- [3] Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé. *Recommandations relatives à l'estimation de la période après ouverture (PAO)*. **2006**.
- [4] S. De Vaugelade, S. Monsonogo, C. Thomas, S. Bouchonnet, S. Pirnay. Etude rétrospective de rapports de stabilité/compatibilité de produits. *Industries cosmétiques* **2016**, 12, 40-43.
- [5] S. Gaultier-Gaillard, J.P. Louisot. *Diagnostic des risques : Identifier, analyser et cartographier les vulnérabilités*. AFNOR. **2007**.
- [6] International Organization for Standardization. Guide 73:2009- Management du risque – Vocabulaire. **2009**.

## I.2 Conservation et conservateurs

### I.2.1 Contamination microbienne

Les contaminants microbiens peuvent avoir plusieurs origines. Ils peuvent être incorporés lors de la production des produits cosmétiques ou, plus tard, pendant l'utilisation du produit par le consommateur.

Lors de la fabrication du produit les contaminants peuvent être apportés par :<sup>[1]</sup>

- les matières premières (principes actifs, eau, colorants...),
- les articles de conditionnement,
- l'atmosphère des locaux,
- le personnel.

Ces contaminations entraînent la dégradation du produit cosmétique avant sa commercialisation. Les contaminations dues à l'utilisation du produit par le consommateur sont dans un premier temps contrôlées par la nature de la matrice. Quelques-uns des paramètres présentés ci-dessous définissent la sensibilité de la matrice vis-à-vis de cette contamination extérieure.

- **La valeur du pH de la formule** influence le développement des micro-organismes. Un pH inférieur à 3 ou supérieur à 10 défavorise la croissance des micro-organismes. Cependant, la gamme de pH tolérée pour les zones cutanées et muqueuses est comprise entre 4 et 7 pour une population adulte. Ces valeurs de pH sont propices à la contamination microbienne.
- **La qualité de l'eau de formulation** doit répondre aux exigences suivantes : point 6.8 des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) et norme ISO 22716:2007.<sup>[33]</sup>
- **L'activité de l'eau** est la portion d'eau non liée à des solutés dans le produit, donc libre pour le développement des micro-organismes et qui est disponible pour les réactions chimiques et biochimiques (enzymatiques).
- **La présence de matière première hostile** : oxydants ou réducteurs puissants, gaz propulseur ou alcool.

Dans un second temps, l'ajout de conservateurs va permettre d'inhiber ou prévenir le développement des micro-organismes (bactéries, levures, moisissures) dans les produits cosmétiques pendant le stockage et l'utilisation par le consommateur. Ils doivent remplir leurs fonctions de la phase de fabrication jusqu'à la dernière dose délivrée à l'utilisateur dans des conditions normales d'utilisation.

### **I.2.2 Agents conservateurs**

Les agents conservateurs sont définis par la réglementation cosmétique (CE) 1223/2009 comme « *les substances qui sont exclusivement ou principalement destinées à empêcher le développement de micro-organismes dans le produit cosmétique* »<sup>[60]</sup>. La réglementation liste en Annexe V les conservateurs antimicrobiens pouvant être utilisés dans les produits cosmétiques. Elle fixe également leurs limites de concentration et leurs conditions d'utilisation. Les antioxydants ainsi que certaines substances contribuant à la conservation du produit, principalement des alcools et des huiles essentielles, ne font pas partie de cette annexe.

L'orientation du choix d'un conservateur ou d'un mélange de conservateurs se fait selon différents critères. Les principaux sont décrits dans la liste ci-dessous<sup>[39,80]</sup>.

- **Le spectre d'activité** : il doit être le plus large possible (activité vis à vis des bactéries, levures et moisissures) ; c'est pourquoi des mélanges sont souvent utilisés.
- **La compatibilité** avec le procédé de fabrication, le matériau d'emballage et les autres composants de la formule.
- **Le pH de la formulation** : l'efficacité de nombreux conservateurs est étroitement liée aux conditions acido-basiques du milieu.
- **Le coefficient de partage huile/eau** : lorsque la formule est une émulsion, le conservateur va se partager en fonction de ses solubilités entre la phase aqueuse et la phase lipidique. Son efficacité est corrélée à son coefficient de partage huile/eau qui doit être le plus faible possible.

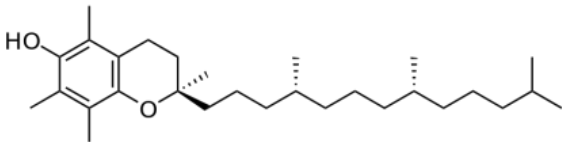
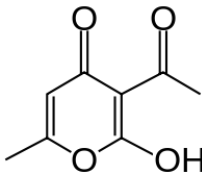
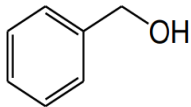
### **I.2.3 Agents antioxydants**

Il est intéressant d'ajouter des antioxydants pour lutter contre les effets néfastes de l'oxydation, notamment l'apparition de phénomènes de rancissement, à proscrire en cosmétique. Les phénomènes d'oxydation peuvent apparaître selon un mécanisme d'auto-oxydation (catalysé par la température, les ions métalliques ou les radicaux « libres ») ou selon un mécanisme de photo-oxydation (initié par la lumière en présence de photosensibilisants)<sup>[47]</sup>. Les antioxydants jouent un rôle essentiel dans les formules contenant des corps gras insaturés ; ce sont des réducteurs capables d'interrompre la réaction de peroxydation et d'empêcher la formation des hydroperoxydes et des peroxydes. Ils sont également introduits dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases. Les antioxydants sont soit d'origine synthétique (dibutylhydroxytoluène, butylhydroxyanisole, gallate d'octyle et de dodécyle...), soit d'origine naturelle. Les tocophérols, notamment l'alpha-tocophérol, naturellement présents dans les huiles végétales, sont fréquemment utilisés, tout comme les antioxydants phénoliques, également très présents dans les extraits végétaux<sup>[18]</sup>.

### **I.2.4 Molécules retenues pour cette étude**

Les trois additifs qui interviennent dans le processus de protection de la matrice de référence sont deux conservateurs (l'alcool benzylique et l'acide déhydroacétique) et un antioxydant (l'alpha-tocophérol). Le Tableau I-1 précise leurs formules brutes, leurs structures, leurs solubilités dans l'eau à 25 °C, et leurs spectres d'activité antimicrobienne.

**Tableau I-1 : Structures et propriétés physico-chimiques des conservateurs et de l'antioxydant retenus pour cette étude** <sup>[68,50,71]</sup>

Composé	Formule brute	Structure chimique	Solubilité dans l'eau à 25 °C (mg.L <sup>-1</sup> )	Activité
Alpha-tocophérol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>		1,9 x 10 <sup>-6</sup>	Antioxydant
Acide déhydroacétique	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>		690	Surtout actif contre Gram (+), activité plus limitée contre Gram (-) et les levures, faible activité contre les moisissures.
Alcool benzylique	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O		42,9	Surtout efficace contre les levures et moisissures, inefficace contre <i>Pseudomonas</i> .

### I.3 Réactions photochimiques

L'exposition directe à la lumière UV peut engendrer la photodégradation des principes actifs et des conservateurs. Dans le cas de produits cosmétiques, en particulier ceux destinés à être en contact prolongé avec la peau, l'exposition à la lumière UV artificielle ou au rayonnement solaire peut entraîner l'inactivation des conservateurs. Cette exposition peut également produire des photoproduits potentiellement toxiques. La complexité de la matrice cosmétique (particulièrement des émulsions huile-dans-eau) peut affecter la photostabilité des conservateurs et leur phototransformation, du fait de l'interaction des composés cibles avec d'autres ingrédients. Par conséquent, l'étude du comportement photochimique de ces ingrédients dans les cosmétiques est une question pertinente. Plusieurs études sur la stabilité sous rayonnements UV de composés au sein de formulations cosmétiques sont rapportées dans la littérature. Gmurek *et al.* ont étudié la photodégradation de parabènes, seuls et en mélange, en utilisant une lampe à UV C en présence et en l'absence de peroxyde d'hydrogène<sup>[27]</sup>. Une autre étude, menée par Alvarez-Rivera *et al.* et portant sur l'identification des photoproduits indésirables des agents de conservation dans les soins personnels, rapporte la transformation photochimique des benzoates, parabènes, butyl hydroxyanisol (BHA), butyl hydroxytoluène (BHT) et triclosan<sup>[48]</sup>. Kim *et al.* se sont intéressés à la photodégradation de produits pharmaceutiques et de soins personnels par des traitements aux UV, avec et sans addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[32]</sup>. Cependant, peu d'études considèrent la toxicité des produits de transformation.

Les processus de photodégradation relèvent de deux mécanismes : photolyse directe ou photolyse indirecte.

#### I.3.1 La phototransformation directe

Pour subir une transformation par photolyse directe, une molécule doit d'abord absorber un photon. Ce lien entre lumière absorbée et effet photochimique est explicité par la première loi de la photochimie : la loi de Grothaus-Draper. Pour que le photon soit absorbé par la molécule, son énergie (qui est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde) doit correspondre à la différence entre l'état fondamental et un état électronique excité possible de la molécule. La capacité d'une espèce à absorber des radiations lumineuses en fonction de leur longueur d'onde est appelée coefficient d'absorption molaire. A la lumière naturelle, une



molécule ne peut subir une phototransformation directe que si elle possède un coefficient d'absorption molaire élevée dans l'UV<sup>[17]</sup>. En somme, une réaction photochimique directe est principalement dépendante de deux paramètres : l'énergie des photons incidents et le coefficient d'absorption molaire du composé irradié.

La phototransformation directe repose ainsi sur la présence de groupements chromophores dans la molécule ciblée. Les substituants du proche environnement du chromophore peuvent venir modifier les caractéristiques de ce dernier, à savoir la valeur de la longueur d'onde maximale d'absorption (effets hypsochrome et bathochrome) et du coefficient d'extinction molaire (effets hyperchrome et hypochrome). Malgré ces effets, il est possible de distinguer les transitions possibles en fonction de la nature des orbitales mises en jeu dans le processus<sup>[22]</sup>.

- Transition  $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Ce type de transition demande beaucoup d'énergie du fait de la grande stabilité des liaisons  $\sigma$  des composés organiques. La bande d'absorption correspondante est intense et située dans l'UV-lointain.

- Transition  $n \rightarrow \pi^*$

Ce type de transition est observé dans le cas de molécules comportant un hétéroatome porteur d'au moins un doublet électronique libre appartenant à un système insaturé. C'est le cas, par exemple, du chromophore C=O, dont la bande d'absorption est située entre 270 et 280 nm.

- Transition  $n \rightarrow \sigma^*$

Ce type de transition nécessite le transfert d'un électron du doublet  $n$  d'un hétéroatome (O, N, S, Cl...) à un niveau  $\sigma^*$ . Il est observé pour les alcools, les éthers, les amines ainsi que pour les dérivés halogénés. Cette transition donne une bande d'intensité moyenne qui se situe à l'extrême limite du proche-UV.

- Transition  $\pi \rightarrow \pi^*$

Ce type de transition est observé dans le cas de composés possédant une double liaison isolée induisant une forte bande d'absorption vers 165-200 nm.

La largeur de la région UV du rayonnement solaire parvenant à la surface de la terre est fortement réduite. Ceci est dû à l'absorption ou au réfléchissement par la troposphère des longueurs d'ondes inférieures à 290 nm. Seuls les groupements contenant des insaturations ou des hétéroatomes vont donc avoir la possibilité de réagir sous irradiation solaire<sup>[75]</sup>. Les transitions électroniques observées seront alors généralement :  $n \rightarrow \pi^*$  ou  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

### I.3.2 La phototransformation indirecte

Pour subir une transformation par photolyse indirecte, la molécule doit :

- soit recevoir de l'énergie via un photosensibilisateur à l'état de triplet électronique généré par l'irradiation solaire de matière organique dissoute chromophorique (CDOM),<sup>[55]</sup>
- soit réagir avec un oxydant photochimiquement engendré, tel qu'un radical hydroxyle, un oxygène singulet ou un radical alkylperoxy. L'oxygène singulet et les radicaux alkylperoxy sont principalement générés par l'irradiation solaire de CDOM dans des milieux naturels oxygénés. Certains radicaux hydroxyles semblent également provenir de l'irradiation solaire de CDOM.

L'étude des réactions photochimiques et leur utilisation en chimie organique se sont considérablement développées. La photochimie est aujourd'hui utilisée efficacement en synthèse grâce aux avantages qu'elle représente : peu de déchet, peu coûteuse, mise en évidence de certains intermédiaires... En revanche, la connaissance des mécanismes photochimiques mis en jeu lors de la dégradation de polluants, souvent très complexes, révèle encore du domaine de la recherche. Dans un contexte politique et social de renforcement de la protection et de la sécurité des consommateurs, les études de dégradation de polluants d'origines pharmaceutique, cosmétique, phytosanitaire... sont nombreuses. Si la dégradation de ces substances sous rayonnements UV est étudiée sur le plan cinétique, les propositions des mécanismes de dégradation restent cependant très limitées.

---

## **CHAPITRE II - Matériels et méthodes**

---

Ce chapitre présente l'ensemble des matériels et méthodes utilisés dans le cadre de cette thèse ; il est divisé en cinq parties. La première présente la mise en place du protocole de suivi de la stabilité en conditions réelles et en conditions accélérées de l'émulsion de référence. Les méthodes de mesures organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques appliquées à l'émulsion de référence sont présentées dans la seconde partie. La troisième partie est consacrée aux études de photodégradation des molécules d'intérêt. Elle détaille la préparation des échantillons et le photoréacteur utilisé pour les expériences de photolyse. Les tests *in silico* et *in vitro* mis en œuvre pour estimer la toxicité des photoproduits caractérisés sont présentés en quatrième partie. Enfin, la dernière partie de ce chapitre est dédiée à la présentation des couplages GC-MS et LC-MS utilisés dans le cadre de cette thèse.

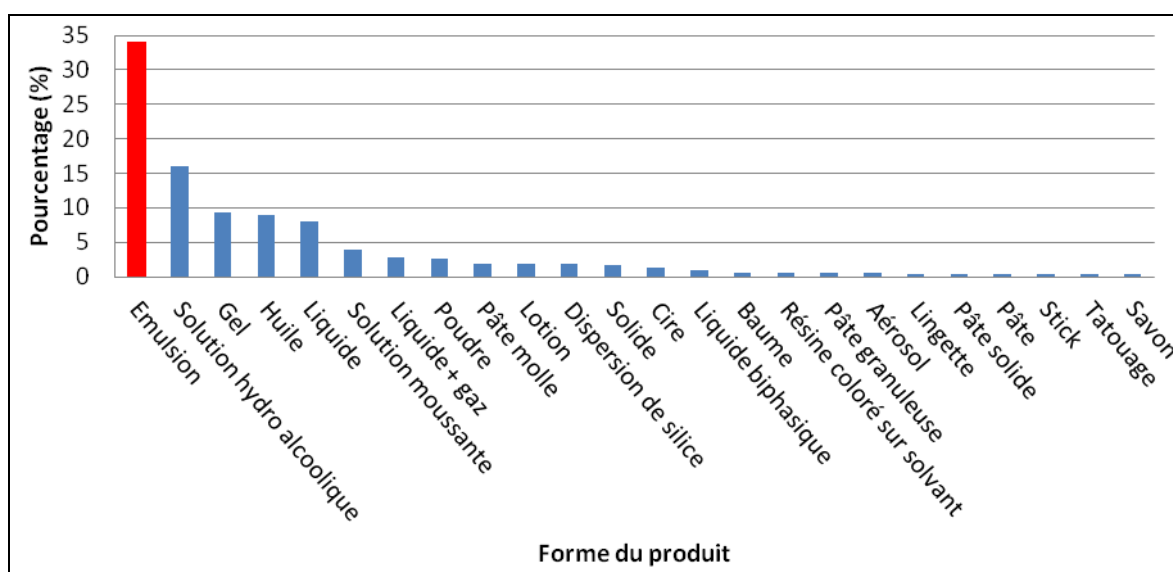
## II.1 Etude de stabilité

### II.1.1 Matrice de référence

Les émulsions sont des systèmes hétérogènes dans lesquels un liquide est dispersé sous forme de globules dans un autre liquide avec lequel il n'est pas miscible. Le « mélange » de la phase discontinue dans le milieu de dispersion se fait par agitation, mécanique en général. Le ou les émulsifiants qui sont le plus souvent des agents de surface ou des polymères hydrophiles, ainsi que les autres constituants de l'émulsion sont dissous ou dispersés dans l'une ou l'autre phase.

En cosmétologie, les émulsions huile dans eau (H/E) sont privilégiées parce qu'elles ne laissent pas de film gras sur la peau. Parmi celles-ci, les émulsions crèmes sont les plus courantes. La longueur de la liste de leurs ingrédients résulte plus des principes actifs qu'elles renferment que du châssis de l'émulsion<sup>[4]</sup>.

Les rapports d'expertises réalisés par EXPERTOX sont en accord avec les données de la littérature : sur une base de 529 rapports d'expertises réalisés entre début 2010 et fin 2011, l'émulsion est la forme la plus représentée avec 34,2% des cas<sup>[13]</sup>. Le même constat est observé sur des données plus récentes issues de l'analyse de 311 rapports d'expertises réalisés entre janvier et juillet 2014 (Figure II-1).



**Figure II-1 : Répartition des formes galéniques utilisées sur la base de 311 rapports d'expertises réalisés entre janvier et juillet 2014 (%)**

Partant de ce constat, le choix de la matrice de référence s'est arrêté sur une émulsion huile dans eau. En collaboration avec le laboratoire ONYLIGNE (La Neuville-en-Hez, France) une formule de type crème a été façonnée. Par définition, la forme crème est une émulsion plus ou moins épaisse constituée de plus de 70% d'un mélange eau + huile. Le laboratoire ONYLIGNE est spécialisé dans la formulation, la fabrication et le conditionnement de produits cosmétiques sur mesure. Deux lots ont été formulés. Le premier, fabriqué le 06/10/2015, a été utilisé pour le suivi de l'émulsion en temps réel. Le deuxième lot, produit le 24/07/2017, a été utilisé pour les études en conditions accélérées afin que ces dernières soient menées sur une émulsion fraîchement formulée. Le Tableau II-1 présente les composés constitutifs de la crème de référence ; il répertorie les numéros de CAS (*Chemical Abstract Service*), les noms INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) et noms chimiques, les fonctions ainsi que les pourcentages des ingrédients dans la formule.

**Tableau II-1 : Formule qualitative et quantitative du produit de référence**

N° CAS	Nom INCI	Fonction	Nom chimique	Concentration (en %)
7732-18-5	AQUA	Solvant	Monoxyde de dihydrogène	74,13
67701-33-1	HYDROGENATED VEGETABLE GLYCERIDES	Emollient / Conditionnement de la peau / Surfactant / Contrôle de la viscosité	Mono- and di-glycérides, C14-C18	4,00
67762-27-0	CETEARYL ALCOHOL	Emulsifiant / Stabilisant d'émulsion / Contrôle de la viscosité	Alcools, C16-C18	4,00
1680-31-5	DICAPRYLYL CARBONATE	Emollient / Conditionnement de la peau	Acide carbonique, Ester de dioctyl	3,00
8007-69-0	PRUNUS AMYGDALUS DUCIS OIL	Emollient / Conditionnement de la peau	/	3,00
56-81-5	GLYCERIN	Humectant	Glycérol	2,50
223747-87-3	ARGANIA SPINOSA KERNEL OIL	Emollient / Conditionnement de la peau	/	2,00
194043-92-0	BUTYROSPERMUM PARKII BUTTER	Emollient / Conditionnement de la peau	/	2,00
73398-61-5	CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE	Emollient / Conditionnement de la peau	/	2,00
246159-33-1	CETEARYL GLUCOSIDE	Emulsifiant / Tensioactif	C12-20 Alkyl Glucoside	1,00
100-51-6	BENZYL ALCOHOL	Conservateur	Phénylméthanol	0,81
38517-23-6	SODIUM STEAROYL GLUTAMATE	Emulsifiant / Stabilisant d'émulsion	Sodium hydrogène N-(1-oxooctadecyl)-L-glutamate	0,50
8001-21-6	HELIANTHUS ANNUUS SEED OIL	Emollient / Conditionnement de la peau	/	0,47
2074-53-5	ALPHA-TOCOPHEROL	Antioxydant / Conditionnement de la peau	3,4-Dihydro-2,5,7,8-tétraméthyl-2-(4,8,12-triméthyltridécy)-2H-benzopyran-6-ol	0,30
11138-66-2	XANTHAN GUM	Stabilisant d'émulsion / Contrôle de viscosité	/	0,20
520-45-6	DEHYDROACTIC ACID	Conservateur	3-acétyl-4-hydroxy-6-méthyl-2H-pyran-2-one	0,07
5949-29-1	CITRIC ACID	Tampon / agent chélatant	2-Hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid	0,02

## II.1.2 Conditionnement

Dans ses notes d'orientation pour l'essai des ingrédients cosmétiques et l'évaluation de la sécurité, le Comité Scientifique européen pour la Sécurité des Consommateurs (CSSC) recommande de réaliser des tests de stabilité pertinents, adaptés au type de produit cosmétique et à l'usage auquel il est destiné. Il précise qu'il convient de s'assurer qu'aucun problème de stabilité n'est induit par le type d'emballage utilisé. Pour cela, il préconise des tests de stabilité physique réalisés avec des emballages inertes et avec ceux destinés à être utilisés sur le marché<sup>[73]</sup>. En effet, une éventuelle évolution/interaction chimique peut être provoquée par la migration de substances du matériau d'emballage dans le produit cosmétique.

Malgré les phénomènes de délamination bien décrits dans la littérature, le verre est souvent considéré comme matériau de référence vis-à-vis des interactions contenant-contenu<sup>[78-64]</sup>. Ce dernier est retenu comme témoin dans toutes les études de compatibilité cosmétique. Au cours des dernières décennies, l'intérêt de l'industrie pour l'emballage plastique a connu une croissance exponentielle. Dans le domaine de l'emballage cosmétique et pharmaceutique, l'une des matières plastiques les plus utilisées est le polyéthylène (PE), une résine thermoplastique obtenue par polymérisation d'éthylène<sup>[8]</sup>.

Afin de prendre en compte cet aspect et d'observer d'éventuelles différences entre un emballage dit « inerte » et un emballage commercial, la stabilité de l'émulsion de référence a été étudiée dans un emballage en verre (Qorpak Kaptclean, VWR) et dans un emballage en plastique de type polyéthylène (Falcon<sup>®</sup> à col large en polyéthylène, LaboModerne). Les emballages ont été remplis avec 30 mL ±1mL de produit.



### II.1.3 Conditions d'essais

Quatre catégories de conditions d'essais peuvent être répertoriées pour l'évaluation de la stabilité. Ces dernières sont citées dans les recommandations sur la stabilité des produits de protection solaire publiées par l'ANSM en 2007<sup>[6]</sup>. Ci-dessous sont présentés chacune des catégories et les choix des conditions d'essais retenues pour cette étude.

#### II.1.3.1 Stabilité en conditions réelles

L'ANSM décrit cette catégorie comme : « *les études de stabilité en conditions normales ou raisonnablement prévisibles de stockage* » et préconise un suivi en temps réel à  $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  ou à température ambiante (TA) « dûment justifiée et contrôlée »<sup>[6]</sup>. Le COLIPA la définit comme étant la « *condition sous laquelle le produit pourrait être stocké. Cette dernière devrait refléter l'exposition normale prévue du produit au cours de son cycle de vie* »<sup>[21]</sup>. Afin le CSSC, la décrit comme « *des conditions normales ou raisonnablement prévisibles d'utilisation* »<sup>[73]</sup>.

Dans ce travail, cette étude de stabilité a été conduite comme suit : stockage à température ambiante contrôlée ( $20,5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ), exposition à la lumière naturelle et ouverture des pots tous les deux jours pour mimer les conditions réelles d'utilisation (contact avec l'environnement extérieur dans le cas d'un pot à ouverture large).

#### II.1.3.2 Stabilité en conditions de vieillissement accéléré

Cette deuxième catégorie est particulièrement intéressante pour l'établissement d'un système de correspondance température/temps. Aujourd'hui, en l'absence de données de validation disponibles, cette corrélation ne fait pas l'objet de recommandations précises dans le domaine cosmétique.

Plusieurs guides proposent des lignes directrices pour surmonter le manque de publications officielles. Ils offrent des conseils scientifiques et techniques, notamment sur le choix des températures d'essai. Par exemple, le guide de l'Agence Nationale brésilienne de Vigilance Sanitaire (ANVISA) préconise des températures de  $40\text{ °C}$ ,  $45\text{ °C}$  et  $50\text{ °C}$ <sup>[12]</sup>. Le guide F1980 publié par la Société Américaine pour les essais et les matériaux sur le vieillissement accéléré des emballages stériles pour dispositifs médicaux, établit son système de correspondance temps/température en menant des essais de  $25\text{ °C}$  à  $60\text{ °C}$  par intervalles de  $5\text{ °C}$ <sup>[7]</sup>. Enfin,

l'étude rétrospective présentée au chapitre I sur les températures de tests les plus utilisées pour les études accélérées fait ressortir les températures suivantes : 45 °C, 50 °C, 55 °C et 60 °C.

La température de 45 °C, actuellement utilisée au sein du laboratoire EXPERTO, ainsi que 3 autres températures de vieillissement : 50 °C, 55 °C et 60 °C, reportées dans les références bibliographiques ci-dessus, ont été retenues pour cette étude.

Ce choix est également en adéquation avec la température de rupture de l'émulsion de référence. En effet, une pré-étude a permis de déterminer la température critique du produit. L'émulsion a été placée à l'étuve à 50 °C ± 2 °C avec augmentation de 5 °C tous les deux jours. Les résultats de cette pré-étude montrent que l'émulsion est « cassée » à partir de 85 °C. Afin de confirmer cette température et d'écarter l'effet du stockage préalable entre les températures 50 °C et 75 °C, un nouveau produit a été placé directement à 85 °C. Le déphasage est visible après 24 heures.

#### *II.1.3.3 Stabilité en conditions extrêmes – cycles chaud/froid*

Ces essais sont réalisés afin de tester la tenue du produit lors de son approvisionnement vers des pays à zones climatiques spécifiques, ou lors de conditions particulières de transport. Ils sont en général réalisés en amont de l'évaluation de la DDM du produit, pendant la phase de validation de la formule (optimisation du choix de l'émulsifiant, choix des pourcentages de phases hydrophile et hydrophobe...). Cette catégorie n'entre pas dans la problématique étudiée, elle n'a donc pas été prise en compte dans cette étude.

#### *II.1.3.4 Stabilité à la lumière*

L'ANSM recommande ces essais pour les produits avec des conditionnements transparents. L'agence préconise des expositions aux UV dans un appareil de type Suntest<sup>®</sup> afin de tester la photostabilité du produit<sup>[6]</sup>.

Dans l'étude présente, cette dernière catégorie de conditions d'essais a fait l'objet d'études spécifiques présentées aux chapitres VI et VII.

Récapitulatif des conditions testées dans le cadre de cette étude :

- Température ambiante pendant 1 an (conditions réelles)
- 45 °C pendant 3 mois (conditions de vieillissement accéléré utilisées actuellement)
- 50 °C, 55 °C et 60 °C pendant 3 mois (conditions de vieillissement accéléré pour minimiser le temps de l'étude de stabilité par augmentation des conditions thermiques).

La fréquence des mesures pour chaque condition de stockage est donnée dans le Tableau II-2.

**Tableau II-2 : Fréquence des mesures**

<b>Conditions</b>	<b>Stockage</b>	<b>Fréquences des mesures</b>
<u>Réelles</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Température ambiante (20,5 °C ± 2 °C)</li> <li>- Lumière ambiante (cycles jour/nuit)</li> <li>- Humidité résiduelle de 45% à 65%</li> <li>- 2 types de contenants : verre et polyéthylène</li> <li>- Ouvertures régulières des contenants tous les 2 jours</li> </ul>	1 / mois
<u>Vieillissement accéléré</u> « classique »	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 45 °C ± 2 °C</li> <li>- Obscurité</li> <li>- Humidité résiduelle de 45% à 65%</li> <li>- 2 types de contenants : verre et polyéthylène</li> </ul>	1 / mois*
<u>Autres vieillissements accélérés</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 °C ± 2 °C</li> <li>- Obscurité</li> <li>- Humidité résiduelle de 45% à 65%</li> <li>- 2 types de contenants : verre et polyéthylène</li> </ul>	1 / semaine
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 55 °C ± 2 °C</li> <li>- Obscurité</li> <li>- Humidité résiduelle de 45% à 65%</li> <li>- 2 types de contenants : verre et polyéthylène</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 60 °C ± 2 °C</li> <li>- Obscurité</li> <li>- Humidité résiduelle de 45% à 65%</li> <li>- 2 types de contenants : verre et polyéthylène</li> </ul>	

\*Pas d'extrapolation possible

## II.2 Paramètres évalués

### II.2.1 Suivi organoleptique par analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est une approche relativement récente puisqu'elle a vu le jour dans les années 50 aux Etats Unis, lors de l'optimisation du degré d'acceptabilité de menus servis aux soldats<sup>[38]</sup>. En 1956, le phénomène de satiété spécifique à une manifestation hédonique sensorielle a été décrit pour la première fois par le physiologiste français Jacques Le Magnen<sup>[40,74]</sup>. Le terme « analyse sensorielle » s'est ensuite fortement développé dans les années 70 dans les grands groupes industriels, notamment dans l'industrie agroalimentaire<sup>[13]</sup>. L'analyse sensorielle vise à garantir aux consommateurs une qualité des produits ; elle doit respecter des revendications établies dans un cahier des charges. Selon la norme française NF ISO 5492, elle est définie comme « *l'examen des propriétés organoleptiques d'un produit par les organes des sens* ». Elle intervient en amont du produit fini, à différentes phases de la production et notamment lors du choix des matières premières ; elle est également pratiquée en aval de la production afin de définir les conditions optimales de stabilité pour le stockage du produit. L'analyse sensorielle est donc essentielle à l'élaboration de la formulation d'un produit.

Dans cette étude, l'objectif de l'analyse sensorielle est de mettre en évidence d'éventuels signes d'instabilité de la matrice cosmétique étudiée. Rapide, facile à mettre en place et nécessitant peu d'équipements, cette pratique est aujourd'hui largement utilisée dans l'évaluation de la stabilité qualitative ou esthétique d'un produit dans le temps. Cependant, les contrôles organoleptiques aujourd'hui effectués restent très subjectifs. En effet, dans la plupart des cas, ces tests, réalisés par une seule personne, à l'œil nu, dépendent fortement de la sensibilité de l'opérateur. Ce manque d'objectivité et de précision fait que la qualité de ces tests est souvent considérée comme médiocre.

D'après Strigler *et al.*, le nombre de sujets recommandé pour l'élaboration d'un profil sensorielle est d'une quinzaine<sup>[24]</sup>. Dans le cadre de nos travaux, l'évaluation sensorielle des échantillons a été effectuée par un panel interne composé de 17 membres pour l'étude en temps réel et de 15 membres pour l'étude en conditions accélérées. Après définition du panel, chaque individu a été formé aux descripteurs utilisés dans l'évaluation des critères de stabilité pour permettre une réponse consensuelle du panel. Pour cela, les descripteurs ont été illustrés

par des émulsions caractéristiques afin de donner des références visuelles et olfactives aux panélistes. Ces références ont été présentées avant chaque séance d'évaluation sensorielle.

La méthode sensorielle utilisée est la métrologie sensorielle, méthode différente des tests consommateurs qui se focalisent sur l'hédonique et le classement. Ici, le test est un test descriptif quantitatif utilisant une échelle structurée, à intervalles allant de 0 à 5, qui vise à caractériser le plus précisément possible les échantillons pour évaluer leur évolution temporelle. Les objets d'étude évalués sont définis comme suit :

- L'aspect est caractérisé par deux descripteurs : *homogénéité* et *fluidité*.
- L'odeur est caractérisée par deux descripteurs : l'*acidité* et la *rancidité*.
- Enfin, la couleur est évaluée avec un nuancier de blanc/gris.

Le Tableau II-3 présente les définitions de chaque descripteur et les caractéristiques des émulsions de références présentées aux panelistes avant chaque évaluation.

**Tableau II-3 : Définitions des descripteurs et références utilisées pour la formation du panel**

Objet d'étude	Descripteur	Critère d'appréciation*	Critère de notation
Aspect	Déphasage	Séparation de la phase aqueuse et de la phase organique	0 = Emulsion homogène 5 = Emulsion « cassée »
	Epaisseur	Viscosité/Fluidité	0 = Lait 5 = Cire
Couleur	Couleur	Intensité de la coloration	0 = Sans coloration (blanc) 5 = Sombre (5 teintes au-dessus du blanc)
Odeur	Acide	Odeur piquante	0 = Sans odeur 5 = Très acide
	Rance	Odeur désagréable résultante de la dégradation des acides gras	0 = Sans odeur 5 = Très rance

\*Appréciation visuelle

### *II.2.1.1 Traitement statistique des données sensorielles*

Différents outils statistiques sont utilisés pour analyser les données issues de l'évaluation sensorielle. De nombreux programmes et/ou extension de logiciels spécialisés dans l'analyse de ce type de données ont été développés ces dernières années. Dans le cadre de notre étude, le package *SensoMineR* a été utilisé. Ce dernier a été conçu et programmé en langage R pour fournir des synthèses de résultats issus de différentes analyses de modèles de variance ou de différentes méthodes d'analyse factorielle accompagnées d'ellipses de confiance<sup>[67]</sup>. Les ellipses de confiances sont construites autour de chaque échantillon pour visualiser l'incertitude quant à la position de l'échantillon donnée par le panel.

#### *II.2.1.1.1 Analyse unidimensionnelle*

La caractérisation des produits commence par une simple description des données. Cela permet de repérer des tendances globales et parfois d'identifier des données aberrantes. Pour cela, une première visualisation graphique, descripteur par descripteur, est effectuée afin de mettre en évidence les descripteurs les plus discriminants. Les hypothèses graphiques sont ensuite validées par un test statistique. La comparaison des médianes est particulièrement intéressante dans le cas de comparaison de groupes. Dans notre étude, un groupe correspond à une durée de stockage (ex : 1 semaine, 2 semaine, 1 mois...). La médiane est plus intéressante que la moyenne dans le cas de notre petite taille d'effectif car elle permet de faire ressortir des valeurs extrêmes pouvant modifier considérablement la moyenne. Le test de Friedman (comparaison de plus de deux médianes) a été utilisé pour cette étude. Il s'agit d'un test non paramétrique utilisé en présence de k échantillons appariés correspondant à k traitements visant à mettre en évidence une différence entre les traitements<sup>[62]</sup>. Ici, les échantillons appariés correspondent à l'émulsion de référence, et les k traitements correspondent aux différents temps de stockage.

#### *II.2.1.1.2 Analyse multidimensionnelle*

Les analyses multidimensionnelles fournissent une représentation de tous les produits dans un espace à dimensions réduites (très souvent bidimensionnel). La technique multivariée la plus couramment appliquée est l'analyse en composantes principales (ACP). Lorsque l'ACP est appliquée à l'analyse descriptive, les produits sont décrits par les notes moyennes des évaluateurs sur les descripteurs sensoriels. L'ACP est construite à partir d'une matrice :

matrice de covariance (cov-ACP) ou matrice de corrélation (corr-ACP). Elles sont toutes deux dérivées de la matrice de données constituée d'échantillons (lignes) et de descripteurs (colonnes). Il convient de s'interroger sur la légitimité du type d'ACP utilisé pour caractériser la variabilité des données sensorielles lorsque ces dernières sont issues du calcul de valeurs moyennes, particulièrement quand le panel est de petite taille. D'après l'étude de Borgognone *et al.* portant sur le choix d'une cov-ACP ou corr-ACP pour l'analyse de cas d'étude, la cov-ACP semble être adéquate lorsque l'échelle de l'analyse descriptive est la même pour tous les descripteurs<sup>[29]</sup>.

Dans l'interprétation d'une analyse sensorielle classique, une attention toute particulière est portée sur la performance du panel. Pour cela, l'effet échantillon, l'effet juge, l'effet session, et leurs interactions sont évalués. Dans le cas présent, le temps trop court de formation du panel et la réalisation d'évaluations uniques (non dupliquées) ne garantissent pas la performance du panel. Il est donc impératif de se poser la question de la variabilité du panel pour estimer l'incertitude des points de données dans le tracé du plan ACP.

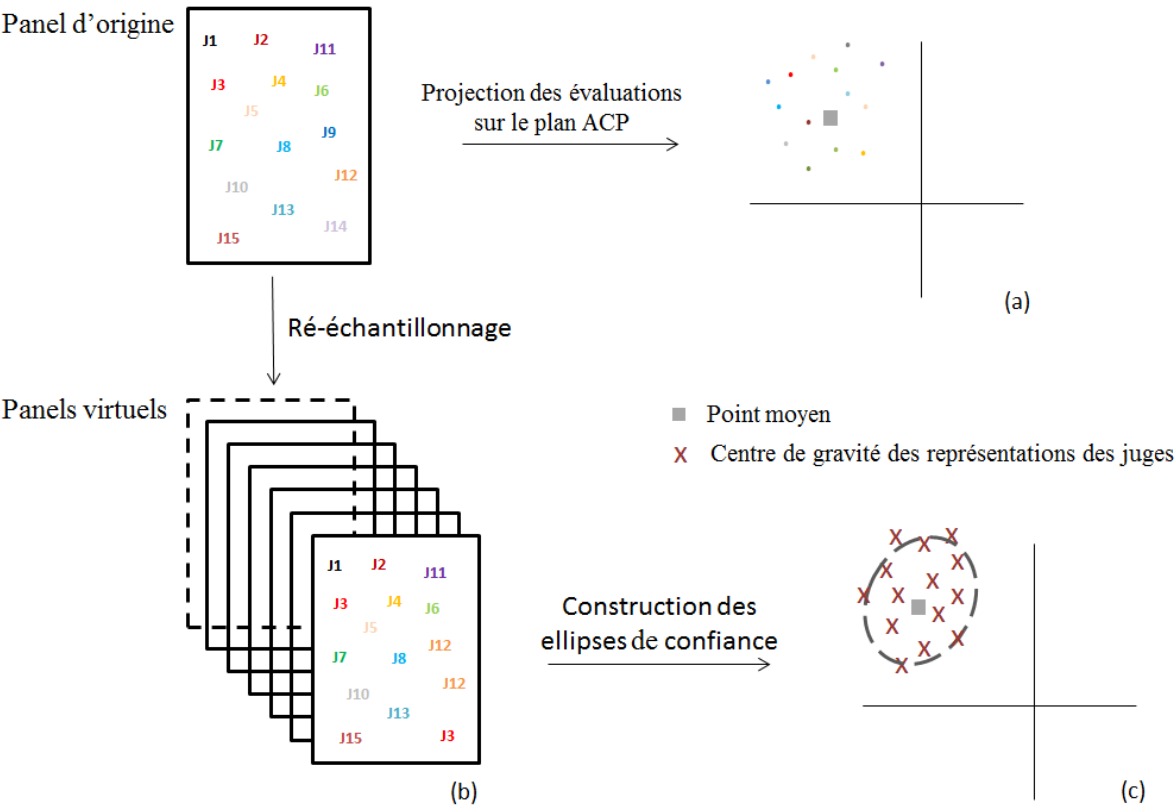
La Figure II-2 résume la démarche entreprise dans le cadre de ce travail.

Pour mesurer la variabilité sur l'évaluation d'un échantillon donné, une possibilité consiste à projeter les évaluations de chaque panéliste sur le plan de l'ACP construit à partir des moyennes des notes affectées à chacun des descripteurs (couleur, déphasage, épaisseur...). Ainsi, chaque évaluation est représentée par un point de données qui montre la perception multidimensionnelle (deux dimensions à la fois dans le plan de l'APC) de l'évaluateur pour un échantillon donné (Figure II-2a). La variabilité des évaluations individuelles est illustrée par la dispersion du nuage de points. Si tous les évaluateurs décrivent l'échantillon de manière similaire pour tous les descripteurs, alors les points seront superposés. Dans le cas inverse, l'incertitude sera illustrée par la distance au point moyen de coordonnées  $(x_m; y_m)$  où  $x_m$  et  $y_m$  correspondent respectivement aux moyennes des valeurs d'abscisses et d'ordonnées des points de données. Comme mentionné ci-dessus, la représentation Figure II-2a ne considère pas la variabilité du panel car chaque point de données est issu d'une mesure unique.

Il est possible de considérer la variabilité de chaque point moyen correspondant à la variabilité du panel ; celle-ci prend en compte à la fois la variabilité des évaluateurs et le nombre d'évaluateurs. Des méthodes sont disponibles pour construire des « régions de confiance » dans l'analyse factorielle. L'une d'entre elles est présentée dans les travaux de Husson *et al.* et est intégrée au *package* *SensoMineR*<sup>®</sup> du logiciel R. La méthode, adaptée aux

évaluations sans répétition, procède par la construction d'ellipses de confiance empiriques en utilisant une méthode de ré-échantillonnage classique<sup>[23]</sup>. Le ré-échantillonnage consiste à construire des panels virtuels à partir du panel d'origine en tirant (avec remise) des juges au hasard dans ce dernier, comme illustré sur la Figure II-2b. L'ellipse de confiance ainsi obtenue illustre la variabilité du panel autour du point moyen (Figure II-2c) ; elle prend en compte 95% des évaluations. Les principales étapes du calcul de la surface de l'ellipse de confiance ainsi obtenue sont présentées dans les travaux de Schubert *et al.*<sup>[57]</sup>

Dans certains cas, la simple lecture de l'ACP ne permet pas de conclure quant à une différence significative d'un ou plusieurs échantillons. Dans ces cas précis, l'analyse statistique de T<sup>2</sup> de Hotelling (extension du test T de Student au domaine multivarié) permet de conclure<sup>[30]</sup>.



**Figure II-2 : Estimation de l'incertitude des points de données dans le tracé d'un plan ACP**



## II.2.2 Paramètres physiques

### II.2.2.1 Observation au microscope

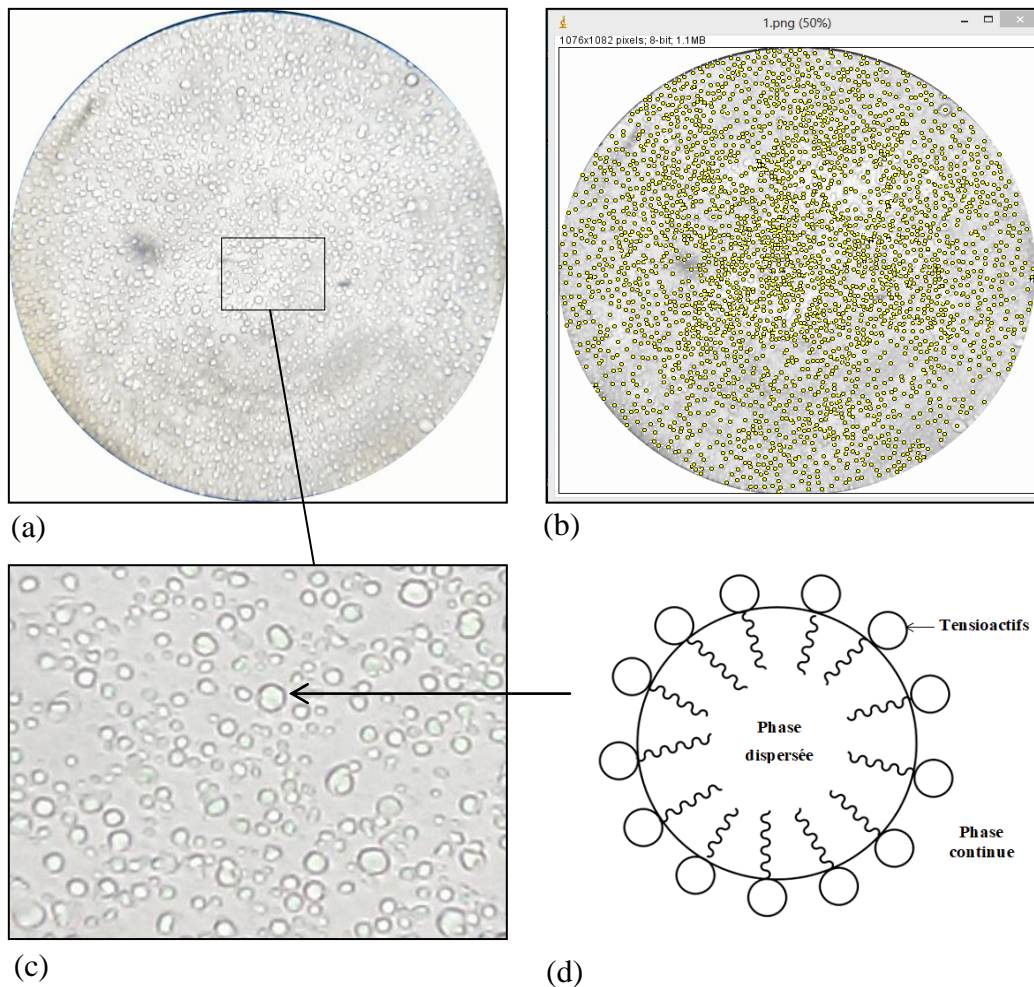
Le microscope est un outil efficace pour observer des phénomènes de coalescence ou des variations de dimension des gouttelettes d'huile au sein d'une émulsion. L'objectif visé ici est simple : il s'agit d'effectuer un comptage du nombre de gouttelettes d'huile dispersées dans la phase continue de l'émulsion.

Préalablement à l'observation au microscope, une petite goutte d'émulsion est disposée entre une lame et une lamelle. La couche d'émulsion doit être la plus fine possible afin d'être traversée par la lumière. La préparation est observée à l'aide d'un microscope monoculaire (Perflex, Escalquens, France) possédant un oculaire X15, et un grossissement X40 sous l'objectif. Ceci permet d'obtenir un niveau de détail suffisant pour l'observation de la phase dispersée, avec un grossissement global X600. Le diamètre du champ oculaire calculé pour ce grossissement est de 0,25 mm. La surface observée est de 0,05 mm<sup>2</sup>.

L'image microscopique est ensuite analysée à l'aide du logiciel ImageJ<sup>®</sup> (*Image Processing and Analysis in Java*). Ce logiciel libre est l'adaptation du logiciel NIH Image, développé sous Macintosh par le département de santé mentale du NIH (*National Institute of Health*) aux Etats Unis.

Dans le cadre de cette étude, nous avons employé ImageJ pour la fonction *Find Maxima* couramment utilisée pour l'analyse d'images de microscopie. Elle permet d'effectuer des opérations mathématiques sur les pixels et notamment de compter le nombre de particules (gouttelettes d'huile) correspondant à un contraste défini par rapport à l'arrière-plan. La fonction peut être effectuée sur une image binaire (composée uniquement de pixels noirs et blancs, les pixels blancs indiquant les objets d'intérêt) ou sur une image en niveaux de gris.

Dans le cadre de nos analyses, l'image traitée est une photographie convertie en niveau de gris (8 bit). Une soustraction de l'arrière-plan est effectuée. La figure ci-dessous représente l'émulsion de référence observée au microscope optique avant et après application de la fonction *Find Maxima*.



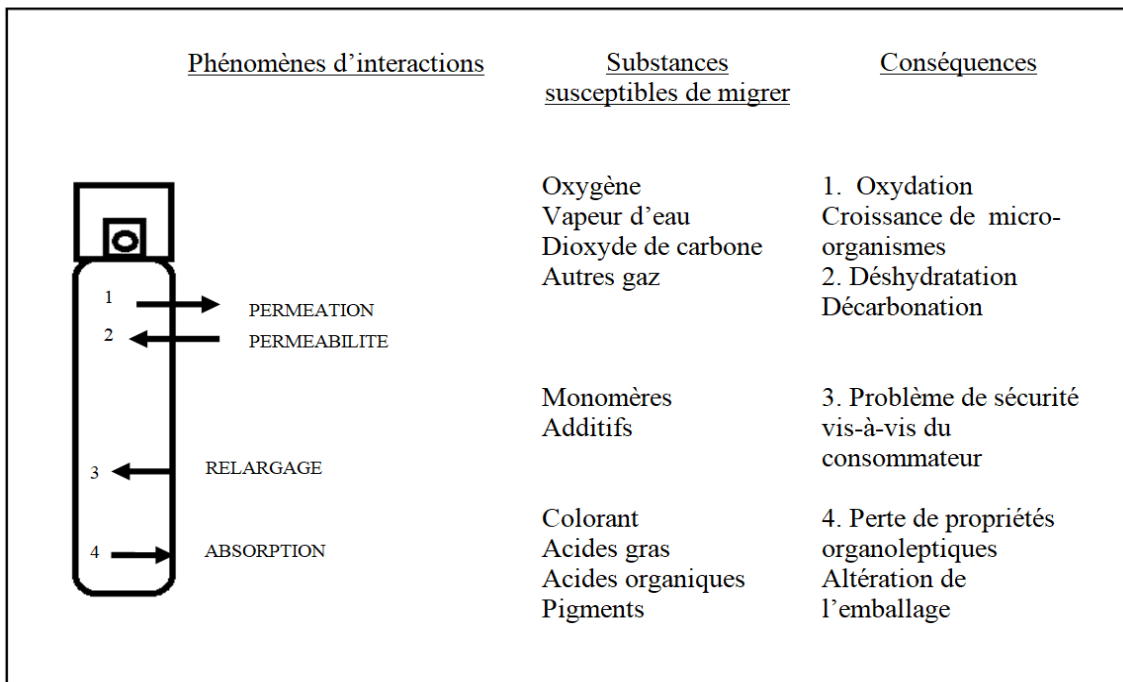
**Figure II-3 : Emulsion de référence observée au microscope optique : (a) avant application de la fonction *Find Maxima* ; (b) après application de la fonction *Find Maxima* ; (c) zoom sur les micelles ; (d) représentation graphique d'une micelle**

#### *II.2.2.2 Test de stabilité à la centrifugeuse*

Le test de centrifugation est basé sur le principe de séparation de deux ou plusieurs substances de densités variées grâce à la force centrifuge. C'est un outil utile pour évaluer et prédire la durée de conservation d'émulsions<sup>[11]</sup>. Les tests ont été effectués avec une centrifugeuse (Centrifuge 4237, ALC International, Milan, Italie) à 3000 rotations par minutes (rpm) pendant 30 minutes, en plaçant 9 g d'échantillon dans des tubes de 10 mL.

### II.2.2.3 Suivi de la masse de l'échantillon dans le conditionnement

La masse de l'échantillon est régulièrement contrôlée par pesée (AJ100, Mettler Toledo, Viroflay, France). Ce paramètre a pour but d'informer sur l'étanchéité du conditionnement. Une mauvaise étanchéité peut conduire à des phénomènes de migration de gaz de l'extérieur vers l'intérieur du contenant (perméabilité) ou au phénomène inverse (perméation). Par ailleurs, l'interaction entre le contenant et le produit peut aboutir à des transferts de matière. Les différents types d'interactions sont illustrés sur la Figure II-4<sup>[76]</sup>.



**Figure II-4 : Transferts de matières intérieur/extérieur et emballage/produit possibles**

### II.2.3 Paramètres chimiques

La stabilité chimique d'un produit se traduit par une composition qualitativement et quantitativement constante des ingrédients qui le constituent. Le pH de l'émulsion a été contrôlé afin de détecter une éventuelle modification de la composition chimique. Les mesures ont été réalisées avec un pH-mètre (MP 220/225, Mettler Toledo, Viroflay, France) de résolution 0,01, équipé d'électrodes combinées (électrode en verre et électrode de référence) et calibré avec des solutions tampons régulièrement renouvelées. Si le pH est considéré comme le paramètre le plus important dans le suivi de la stabilité chimique par Issa. *et al.*<sup>[77]</sup>, il n'informe cependant pas sur la nature même de la modification. C'est pourquoi le

dosage spécifique d'un constituant ou d'une famille de constituants après déstabilisation du produit et la mesure de sa concentration est indispensable dans le suivi de la stabilité chimique du produit.

Dans le cadre de notre étude, une méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) à piégeage d'ions a été sélectionnée. Le choix de ce couplage et ses spécificités sont présentés en dernière partie de ce chapitre. La mise au point de la méthode analytique a été adaptée à l'identification, la séparation et le dosage simultané des actifs d'intérêt : alcool benzylique, acide déhydroacétique et alpha-tocophérol. Les deux premiers interviennent dans la protection antimicrobienne de l'émulsion. L'alpha-tocophérol protège la formule de l'oxydation (notamment du rancissement des corps gras d'origine végétale) et aide la peau à lutter contre le stress oxydant.

#### **II.2.4 Paramètres microbiologiques**

Comme énoncé au chapitre précédent, le concept de PAO repose principalement sur la stabilité microbiologique des produits cosmétiques, étant donné qu'il s'agit du point le plus critique pour la sécurité du consommateur. A ce sujet, un renforcement des exigences concernant les limites microbiologiques acceptables pour un produit cosmétique est paru en janvier 2015, à travers la norme NF EN ISO 17516:2015 Cosmétiques – Microbiologie – Limites microbiologiques. Dans la pratique, plusieurs essais microbiologiques sont effectués par les fabricants de produits cosmétiques tels que :

- l'estimation de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) permettant d'identifier les produits à faible risque,
- le dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT),
- le test de provocation (*Challenge Test*, CT) afin de garantir l'efficacité du système de conservation.

Chacun de ces contrôles doit être en conformité avec les critères d'acceptation prévus par les normes correspondantes :

- NF EN ISO 17516:2015 Cosmétiques – Microbiologie – Limites microbiologiques pour le DGAT ;

- NF EN ISO 11930:2012 Cosmétiques - Microbiologie - Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique pour le CT. Selon cette même norme, certains fabricants peuvent être dispensés de CT sur les produits cosmétiques pour lesquels un contrôle du risque microbiologique a été démontré ( $a_w < 0,75$  ; flacon *airless*...).

#### II.2.4.1 Activité de l'eau

La valeur de l'activité de l'eau, notée  $a_w$ , représente la portion d'eau non liée à des solutés dans le produit ( $0 < a_w \leq 1$ ,  $a_w = 1$  pour l'eau pure). Cela représente l'ensemble des molécules d'eau non impliquées dans des liaisons ou interactions avec d'autres composés dans la formule. C'est aussi la fraction d'eau libre qui permet le développement des micro-organismes et qui est disponible pour les réactions chimiques et biochimiques<sup>[4]</sup>. Ainsi trop « d'eau libre » peut réduire la qualité du produit et, par conséquent, sa durée de vie.

L'Equilibre Humide Relatif (EHR) mesuré est exprimé en % d'Humidité Relative (HR) ; il donne la valeur d' $a_w$  comme suit :

$$a_w = p/p_o = ERH (\%) / 100$$

$p$  = Pression de la vapeur d'eau présente dans le produit

$p_o$  = Pression de la vapeur de l'eau pure

L'équilibre d'humidité relative d'un produit est défini par la pression partielle de vapeur d'eau à sa surface et dépend de la composition, de la température, de la quantité d'eau, des conditions de stockage, mais aussi de la pression ambiante et du conditionnement du produit.

Cette valeur informe dans un premier temps sur la capacité de développement des micro-organismes (Tableau II-4). Dans un second temps, cette valeur donne une information sur la déshydratation du produit.

**Tableau II-4 : Valeurs d'activité de l'eau et de pH nécessaires pour le développement de certains micro-organismes<sup>[4]</sup>**

Micro-organismes	Activité de l'eau	pH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥ 0,95	5,0-9,0
<i>Enterobacteriaceae</i>	≥ 0,92	5,5-9,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	≥ 0,80	5,0-9,0
Levures, moisissures	≥ 0,70	5,0-9,0
Aucun	< 0,60	5,0-9,0

$a_w$  est mesurée à l'aide d'un  $a_w$ -mètre (Novasina AG, Lachen, Suisse). L'émulsion est placée dans une capsule puis disposée dans une chambre de mesure étanche. L'eau libre modifie l'humidité ambiante à l'intérieur de la chambre. Une enceinte de mesure évalue en permanence les conditions climatiques à l'intérieur de la cellule. La valeur d' $a_w$  est mesurée après stabilisation du système.

#### II.2.4.2 Dénombrement de germes totaux

Dans un premier temps, cette étude a eu pour but de valider une méthode commercialisée sous l'appellation « Kits Compact Dry TC », méthode alternative à celle dite « DGAT » encadrée par la norme ISO 21149:2006 Cosmétiques – Microbiologie – Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles révisée en juin 2017<sup>[36]</sup>. Cette méthode alternative était la plus adaptée à nos travaux, considérant l'équipement disponible qui ne permettait pas la préparation de milieux gélosés classiques. Dans un second temps, l'utilisation de ces kits en routine a permis les mesures de l'activité microbiologique de l'émulsion de référence tout au long des études en temps réel et en conditions accélérées. La validation de cette méthode alternative a fait l'objet d'une publication scientifique présentée au chapitre V qui présente l'étude du suivi des paramètres microbiologiques de l'émulsion de référence.

### II.2.4.3 Challenge test

En plus du suivi microbiologique par dénombrement des germes aérobies totaux, l'efficacité des conservateurs a été testée en réalisant un *challenge test*. Il consiste en une contamination intentionnelle d'un produit cosmétique avec un inoculum fixe de micro-organismes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (bactéries), *Candida albicans* (levure) et *Aspergillus niger* (moisissure). Les dénombrements de germes sont effectués à différents moments (T + 7 jours, T + 14 jours et T + 28 jours) pour suivre l'évolution de la contamination et observer la croissance ou la décroissance microbienne. Les résultats du CT sont soumis soit : à la Pharmacopée européenne EP 5.1.3, à la Pharmacopée américaine - USP51, à la norme française NF EN ISO 11930:2012 ou à la SOP (*Standard operating procedures for quality assurance system and procedures for pharmaceutical industry*). L'ensemble des CT de cette thèse ont été réalisés par le laboratoire LABEXAN (Cognac, France) par la méthode normée et ont été soumis à la norme NF EN ISO 11930:2012.

## II.3 Etudes de photodégradation

### II.3.1 Préparation des échantillons

#### II.3.1.1 Préparation des solutions pour la caractérisation des photoproduits

Dans le cadre de ces études, la photodégradation de l'alpha-tocophérol a été étudiée dans l'acétonitrile du fait de sa très faible solubilité dans l'eau ( $1,9 \times 10^{-6}$  mg.L<sup>-1</sup> à 25 °C). La photodégradation de l'acide déhydroacétique a été étudiée dans l'acétonitrile et dans un mélange eau ultra pure (Direct-Q<sup>®</sup> 3 Water Purification System, Marck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, France) et acétonitrile (50:50 v/v). Les solutions ont été préparées par pesée (XP105DR, Metler Toledo, Viroflay, France) en considérant les concentrations utilisées dans notre émulsion de référence et en accord avec la réglementation. Pour chaque composé, des solutions dégazées ont été préparées en atmosphère inerte afin d'étudier le rôle de l'oxygène dissout dans les mécanismes de photodégradation.

Les solutions ont été placées dans des tubes de quartz avant irradiation. Après photolyse, les échantillons ont été séchés puis dilués dans le dichlorométhane pour analyse par couplage GC-MS, dilués dans la phase mobile utilisée pour la séparation chromatographique pour analyse par couplage LC-MS.

### *II.3.1.2 Extraction des échantillons pour les analyses ciblées*

La matrice étudiée pour les analyses ciblées des composés et de leurs produits de photolyse est l'émulsion de référence utilisée pour les études de stabilité.

Après irradiation, les analytes doivent être extraits de la matrice préalablement aux analyses par GC-MS et LC-MS. Une méthode d'extraction liquide/liquide a été retenue ; il s'agit de solubiliser le composé recherché dans un solvant non miscible avec l'eau et de séparer la phase organique contenant les composés à extraire de la phase aqueuse. Un bain à ultrasons a été utilisé pour homogénéiser la solution. L'utilisation d'ultrasons permet par ailleurs de réduire le temps d'extraction et d'augmenter le rendement. Cette méthode d'extraction, peu sélective, permet de récupérer le maximum de photoproduits formés. Les procédures d'extraction spécifiquement utilisées pour l'alpha-tocophérol et pour l'acide déhydroacétique sont détaillées dans les parties expérimentales des articles correspondants, respectivement au chapitre VI et au chapitre VII.

### **II.3.2 Photoréacteur utilisé dans la cadre de cette étude**

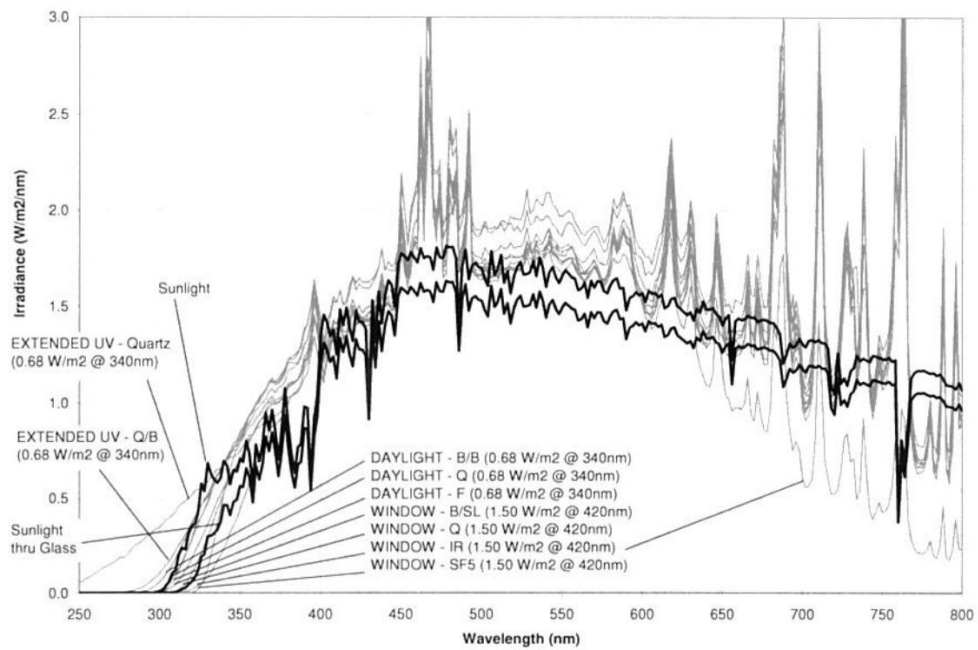
Les expériences de photodégradation ont été réalisées avec le photoréacteur représenté sur la Figure II-5. L'enceinte de vieillissement accéléré (Q-SUN Xe-1, Q-LAB, Saarbrücken, Allemagne) a principalement été conçue pour l'étude du comportement de matériaux face à des contraintes naturelles comme la chaleur, l'humidité et la lumière. L'enceinte est munie d'une ventilation reliée à un capteur de température sur panneau noir pour réguler la température intérieure. Pour reproduire fidèlement le spectre de la lumière solaire, cette enceinte est équipée d'une lampe à arc de xénon et d'un filtre « lumière naturelle » (X-7640, Q-LAB, Saarbrücken, Allemagne).

La Figure II-6 souligne la ressemblance du spectre d'émission du Q-SUN équipé d'un filtre « lumière naturelle » avec des spectres de lumière solaire naturelle à midi. La puissance d'irradiation émise par l'enceinte est contrôlée à la longueur d'onde 340 nm. Par exemple, dans le sud de la France, à Sanary-sur-Mer, l'irradiation en été à midi, est mesurée à 0,7 W/m<sup>2</sup> à cette longueur d'onde. Les expériences au laboratoire ont été réalisées à 0,68 W/m<sup>2</sup> car la ventilation de l'enceinte de vieillissement de l'enceinte ne permet pas la régularisation de la température au-delà de cette valeur.





**Figure II-5 : Enceinte de vieillissement accéléré Q-SUN**



**Figure II-6 : Spectres d'émission de la lumière du soleil et de lampes à arc de xénon équipées de filtres**

## II.4 Estimations toxicologiques

### II.4.1 Tests d'estimation de toxicité *in silico*

Les tests toxicologiques *in silico* visent à compléter les tests de toxicité *in vitro* et *in vivo* ; ils permettent de réduire l'expérimentation animale, le coût et le temps d'obtention des résultats. De plus, les méthodes de calcul présentent l'avantage de pouvoir estimer la toxicité des produits sans les synthétiser.

La toxicologie *in silico* englobe une grande variété d'outils de calcul :<sup>[2]</sup>

- des bases de données pour stocker des données sur la toxicité des produits et leurs propriétés chimiques,
- des logiciels pour engendrer des descripteurs moléculaires,
- des outils de simulation pour la biologie des systèmes et la dynamique moléculaire,
- des méthodes de modélisation pour la prédiction de la toxicité,
- des outils de modélisation tels que des logiciels statistiques et des logiciels pour engendrer des modèles de prédiction,
- des systèmes experts qui incluent des modèles préconstruits dans des serveurs web ou des applications autonomes pour prédire la toxicité,
- des outils de visualisation.

La prédiction de la toxicité des composés étudiés et de leurs produits de dégradation a été estimée par le logiciel T.E.S.T. (*Toxicity Estimation Software Tool*). Il s'agit d'un logiciel développé par l'Agence de Protection Environnementale des États Unis et librement accessible sur internet<sup>[20]</sup>. La prédiction se base sur une relation quantitative corrélant la structure d'une molécule à son activité toxique (*Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR*). Il s'agit d'un modèle mathématique utilisé pour prédire différents types de toxicité à partir des caractéristiques physiques et structurales des molécules testées (poids moléculaire, nombre de cycles, coefficient de partage octanol-eau, etc.) appelés descripteurs moléculaires. En pratique, ce modèle permet d'estimer la toxicité d'un produit chimique en utilisant une fonction linéaire de descripteurs moléculaires de type :

$$\text{Toxicité} = ax_1 + bx_2 + c$$

où  $x_1$  et  $x_2$  sont les variables de descripteurs indépendants, a, b et c des paramètres ajustés. Au total, 45 descripteurs sont utilisés par le logiciel.

Le logiciel inclut des modèles pour les tests de toxicité prédictive suivants :

- Estimation de la dose décimant 50% d'une population de poissons à « tête de boule » (*Fathead minnow*) ;
- Estimation de la dose décimant 50% d'une population de daphnies (*Daphnia magna*), ainsi que des effets sur la reproduction et la mobilité ;
- Estimation de la dose inhibant la croissance de 50% d'une population de protozoaires (*Tetrahymena pyriformis*) ;
- Estimation de la dose décimant 50% d'une population de rats ;
- Estimation des effets sur le développement de l'embryon pendant la grossesse : mort de l'organisme, anomalies structurelles, altération de la croissance et déficiences fonctionnelles ;
- Estimation de la mutagénicité cellulaire ;
- Estimation du facteur de bioaccumulation.

Dans le cas des substances pour lesquelles des données expérimentales sont disponibles, les résultats *in silico* obtenus sont comparés aux données de la littérature.

#### **II.4.2 Tests d'estimation de toxicité *in vitro***

Les tests d'écotoxicologie *in vitro* constituent des outils précieux pour évaluer l'effet d'une irradiation UV-visible sur la toxicité associée à un mélange complexe car ils estiment une toxicité globale et non individuelle. Dans notre étude, l'estimation *in vitro* a permis de mettre en évidence l'impact des produits formés sur une population représentative de l'écosystème aquatique. Contrairement aux essais réalisés *in vivo* sur les animaux et les plantes, ces tests écotoxicologiques sont rapides, faciles à mettre en œuvre, et consomment un faible volume d'échantillon.

Les essais *in vitro* sont menés au laboratoire sur des bactéries *Vibrio fischeri*. Il s'agit de bactéries marines non pathogènes qui ont pour particularité de produire une bioluminescence naturelle. Cette production de lumière est liée au cycle énergétique de la cellule. Une inhibition de la bioluminescence peut être interprétée comme une perturbation du métabolisme énergétique de la bactérie<sup>[45]</sup>. Ces bactéries sont largement utilisées pour

l'estimation de la toxicité aigüe car elles présentent des avantages majeurs : elles tolèrent de longues périodes de stockage, elles sont sensibles à une large gamme de produits chimiques et permettent une obtention des résultats très rapide (détermination de l'EC50 en 15 à 30 minutes).

Le procédé expérimental utilisé au cours de ces études est basé sur le protocole ISO 11348-3 1998. Les cellules de *Vibrio fischeri* sont positionnées dans un incubateur (LUMIStherm, Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Allemagne) et des mesures de luminescence sont réalisées, en fonction du temps de contact, pour les solutions avant et après irradiation. Les mesures de luminescence ont été effectuées avec un luminomètre (LUMIStox 300, Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Allemagne).

## II.5 Développements analytiques en couplages GC-MS et LC-MS

Parce qu'elle permet de séparer efficacement des mélanges complexes, la chromatographie en phase liquide ou gazeuse est couramment utilisée pour l'analyse d'ingrédients cosmétiques. Pour tenter d'identifier des produits résultants de la photolyse d'un actif cosmétique, il est nécessaire de travailler en parallèle en chromatographie en phase gazeuse, pour la détection des produits apolaires à peu polaires, et en chromatographie en phase liquide, pour celle des produits plus polaires. Le couplage de l'une ou l'autre de ces techniques séparatives avec la spectrométrie de masse permet d'apporter des renseignements sur la masse moléculaire et, si les performances de l'instrument l'autorisent, la composition élémentaire de la molécule. Des informations sur sa structure moléculaire sont également déduites du spectre de masse après analyse des dissociations spontanées ou induites par collisions se produisant soit dans la source d'ions soit durant le trajet des ions dans l'analyseur<sup>[28]</sup>.

Les grands principes de la chromatographie et de la spectrométrie de masse ne sont pas rappelés ici dans la mesure où ces techniques font l'objet d'une utilisation de routine depuis de nombreuses années. Il existe de nombreux ouvrages spécialisés dans les techniques couplant chromatographie (en phase gazeuse ou liquide) et spectrométrie de masse ; ils répertorient les différents modules des instruments, détaillent leurs principes de fonctionnement et principales applications<sup>[63,19,42,65]</sup>.

Dans le cadre de cette thèse, la quantification des molécules d'intérêt a été réalisée par couplage GC-MS. Les analyses des différentes solutions de principes actifs étudiées ainsi que l'élucidation structurale des photoproduits formés ont été réalisées par GC-MS et LC-MS. Le choix des appareils retenus pour cette étude est argumenté ci-dessous. Les paramètres de GC et de MS sélectionnés pour le dosage des molécules d'intérêt sont présentés au chapitre IV. De même, la description détaillée des équipements et leur programmation pour l'élucidation structurale des photoproduits sont exposées dans les parties expérimentales des articles présentés aux chapitres VI et VII.

### **II.5.1 Appareillage utilisé en couplage GC-MS**

La chromatographie en phase gazeuse permet l'analyse de mélanges très complexes dont les constituants peuvent considérablement différer par leur nature et leur volatilité. Son couplage avec un spectromètre de masse de type « piège ionique », réputé pour son excellente sensibilité en balayage (le stockage des ions limite les pertes en transmission qui caractérisent les filtres quadripolaires traditionnels) est une technique de choix dès lors que l'on s'intéresse à des molécules inconnues, à faible concentration dans l'échantillon. Les étapes du fonctionnement de la trappe ionique (cycles ionisation-éjection/détection des ions) s'effectuant dans un même espace sur des temps relativement longs (ms), il est possible d'utiliser toutes les options de l'analyse par spectrométrie de masse en faisant varier les paramètres d'ionisation (ionisation électronique ou chimique), de sélection, de fragmentation et de détection des ions au cours d'un chromatogramme.

La trappe ionique est également un instrument idéal pour les expériences MS/MS utiles à l'élucidation structurale des photoproduits. L'ion isolé peut être accéléré par résonance. Dans ce cas, l'accumulation de collisions avec le gaz vecteur, l'hélium, apporte l'énergie interne nécessaire à la fragmentation de l'ion sélectionné. Un balayage en masse/charge ( $m/z$ ) permet de détecter les ions fragments produits. Une méthode alternant isolements et fragmentations successives est également possible, dans la limite de la sensibilité de l'appareil ; on parle alors de spectrométrie de masse « multi-étapes » ( $MS^n$ ).

## II.5.2 Appareillage utilisé en couplage LC-MS

La chromatographie en phase liquide à haute performance est mieux adaptée que la GC aux composés fragiles ou peu volatils. Son couplage avec un spectromètre de masse de type FT-ICR (Fourrier Transform – Ion Cyclotron Resonance Solarix XR (9.4 T)) confère un grand pouvoir résolutif et donc une excellente précision sur la mesure des rapports  $m/z$ , ce qui permet d'assigner des formules brutes aux ions détectés<sup>[69,43]</sup>. Le FT-ICR détermine le rapport  $m/z$  d'un ion grâce à la mesure de sa fréquence cyclotronique dans un champ magnétique stable. Cette technique a été inventée et décrite en 1974 par Comisarow et Marshall<sup>[51]</sup>. Ce type d'appareil permet d'effectuer à la fois une fragmentation dans la cellule de collision mais aussi dans le piège quadropolaire situé en amont, même si le rendement de chacune des étapes limite le processus.



---

**CHAPITRE III - Suivi des propriétés  
organoleptiques d'une émulsion  
cosmétique huile/eau**

---



La plupart des tests de stabilité et de compatibilité réalisés pour la détermination de la date de durabilité minimale des produits cosmétiques sont basés sur l'observation macroscopique des propriétés organoleptiques (aspect, couleur et odeur). L'évaluation de ces paramètres n'est généralement pas soumise à une procédure sensorielle normée.

Ce chapitre présente l'ensemble des résultats de l'étude du suivi des propriétés organoleptiques de l'émulsion de référence. Le but de la présente étude a été d'intégrer des tests discriminants dans l'évaluation de la stabilité d'une émulsion cosmétique contenue dans un emballage en verre et dans un emballage en polyéthylène. Il s'agit d'évaluer l'influence de l'emballage, de la température et du temps dans des conditions normales et accélérées de vieillissement. L'approche statistique et son application à l'analyse des données issues de l'étude de vieillissement en temps réel pour les échantillons de l'émulsion de référence contenue dans du verre est d'abord détaillée. Dans un second temps, les résultats de l'influence de l'emballage en polyéthylène et des températures utilisées pour les études de vieillissement accéléré sont présentés.

## **III.1 Approche statistique**

### **III.1.1 Analyse unidimensionnelle**

#### *III.1.1.1 Description graphique des données*

La stratégie d'évaluation des différents descripteurs de l'émulsion étudiée est détaillée au paragraphe II.2.1 du chapitre matériels et méthodes.

L'observation graphique des moyennes des notes des panélistes pour chaque échantillon (notes de 0 à 5) donne une première idée quant au caractère significatif des descripteurs choisis. Les descripteurs « couleur » et « épaisseur » semblent être les plus discriminants (Figures III-1a et III-1c). Afin de confirmer cette hypothèse et de s'assurer de la signification réelle de ces derniers, un test statistique a été réalisé.

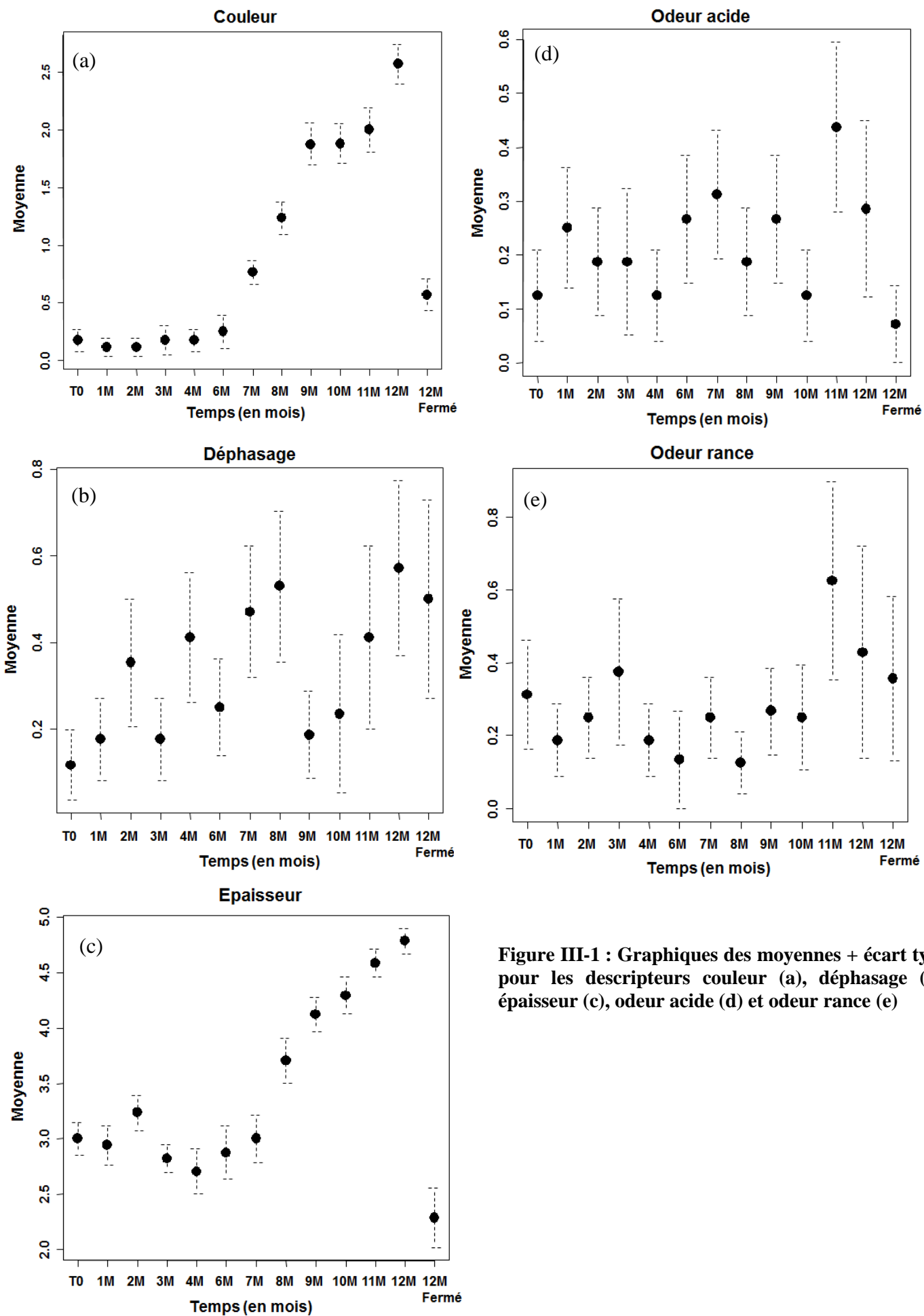


Figure III-1 : Graphiques des moyennes + écart type pour les descripteurs couleur (a), déphasage (b), épaisseur (c), odeur acide (d) et odeur rance (e)

### III.1.1.2 Etablissement du modèle statistique

- Hypothèses uni/bilatérales

Dans la présente étude, deux hypothèses sont en compétition : l'hypothèse nulle notée  $H_0$  (la moyenne ou la médiane de l'échantillon stocké au temps T est égale à la moyenne ou la médiane de l'échantillon stocké au temps T+1) et l'hypothèse alternative notée  $H_a$  (la moyenne ou la médiane de l'échantillon stocké au temps T est différente de la moyenne ou la médiane de l'échantillon stocké au temps T+1).

Il s'agit donc d'un test bilatéral ; ce dernier diffère d'un test unilatéral associé à une hypothèse alternative selon laquelle le signe de la différence potentielle est connu à l'avance<sup>[41]</sup>.

- Distribution des données

Seuls les échantillons suivant une loi normale peuvent faire l'objet d'une analyse de variance paramétrique. Afin de vérifier la distribution normale des données, un test de normalité a été réalisé : l'hypothèse qu'un échantillon est dérivé d'une population normalement distribuée a été testée par le test de Shapiro-Wilk<sup>[61]</sup>. Les résultats sont présentés dans le Tableau III-1.

**Tableau III-1 : Test de normalité (Shapiro-Wilk)**

Descripteur	Test de Shapiro-Wilk			
	H <sub>0</sub> : Population normalement distribuée H <sub>a</sub> : Population non normalement distribuée			
	W Statistique	<i>p-value</i>	Niveau de signification	Conclusion
Déphasage	0,58117	< 2,2 e-16	0,05	<b>H<sub>0</sub> refusée</b>
Epaisseur	0,90537	2,224 e-10	0,05	<b>H<sub>0</sub> refusée</b>
Couleur	0,80945	2,031 e-15	0,05	<b>H<sub>0</sub> refusée</b>
Odeur acide	0,51238	< 2,2 e-16	0,05	<b>H<sub>0</sub> refusée</b>
Odeur rance	0,48972	< 2,2 e-16	0,05	<b>H<sub>0</sub> refusée</b>

Les conclusions du test de normalité indiquent que les données ne suivent pas une distribution normale. Cette conclusion amène à l'utilisation de tests dits « non paramétriques ».

- Caractéristiques des échantillons

Les échantillons évalués après les différents traitements (temps de stockage) sont les mêmes (émulsion de référence). Il s'agit d'une comparaison de plusieurs séries de mesures différées dans le temps. Dans ce cas, les échantillons sont dits « appariés »<sup>[62]</sup>.

- Conclusion relative au modèle statistique

Ces résultats préliminaires ont conduit à l'utilisation d'un test bilatéral non paramétrique pour la comparaison de n échantillons appariés : le test de Friedman<sup>[62]</sup>. Les résultats des tests de Friedman sont présentés dans le Tableau III-2.

**Tableau III-2 : Statistiques khi-carré de Friedman, degrés de liberté (ddl) et « p-values » correspondants**

Descripteur	<i>Friedman chi-squared</i>	ddl	<i>p-value</i>	Significatif
Déphasage	9,7829	11	0,5500	Non
Epaisseur	82,7380	11	4,35 e-13	Oui
Couleur	102,2400	11	2,2 e-16	Oui
Odeur acide	13,2700	11	0,2761	Non
Odeur rance	17,1000	11	0,1049	Non

Les conclusions des tests de Friedman confirment les hypothèses émises par l'analyse graphique. Les descripteurs significativement discriminants pour les produits contenus dans du verre en vieillissement réel sont : « épaisseur » et « couleur ».

### III.1.2 Analyse multidimensionnelle

Une analyse multidimensionnelle a été réalisée pour comparer le profil sensoriel des échantillons de l'émulsion de référence aux différents temps de stockage. L'analyse en composantes principales (ACP) résultant de la moyenne des notes par échantillon et par descripteur est présentée sur la Figure III-2. Chaque couleur représente un échantillon. Les points représentent les échantillons vus par chaque panéliste. Le point moyen par échantillon est représenté par un carré.

La lecture de cette ACP montre que les panélistes n'évaluent pas les échantillons de façon homogène. La couleur correspondante à un échantillon (par exemple le vert) est dispersée et mélangée avec les couleurs d'autres échantillons (bleu, gris...). Cela n'est pas surprenant car, comme expliqué par Husson *et al.*, il est très difficile d'obtenir un consensus satisfaisant pour tous les panélistes lors d'une analyse sensorielle descriptive<sup>[23]</sup>.

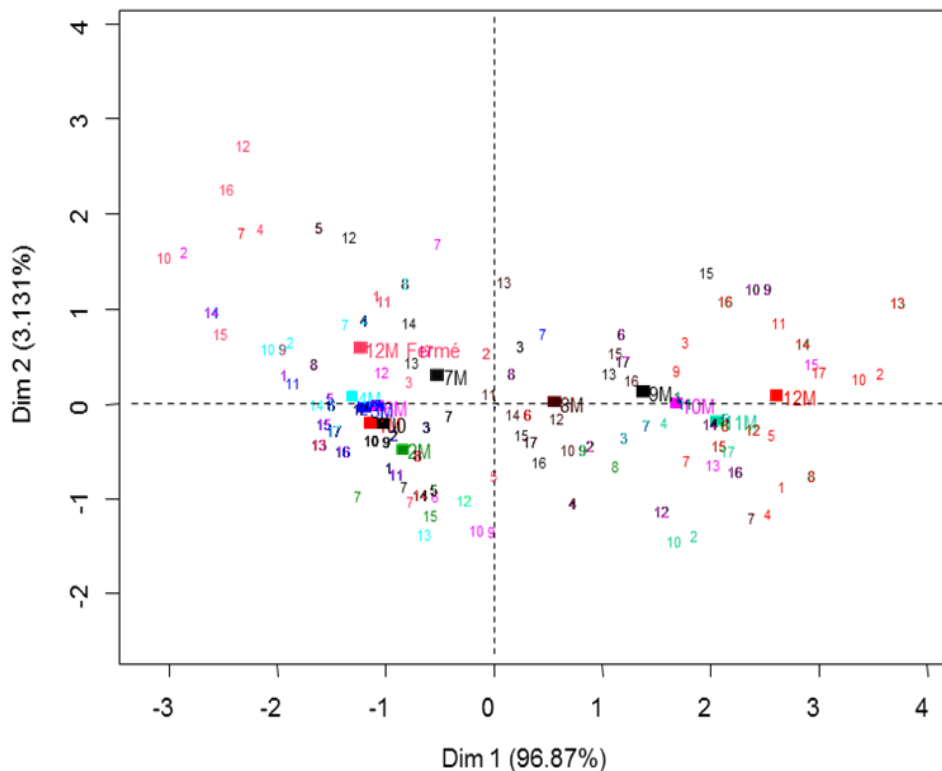
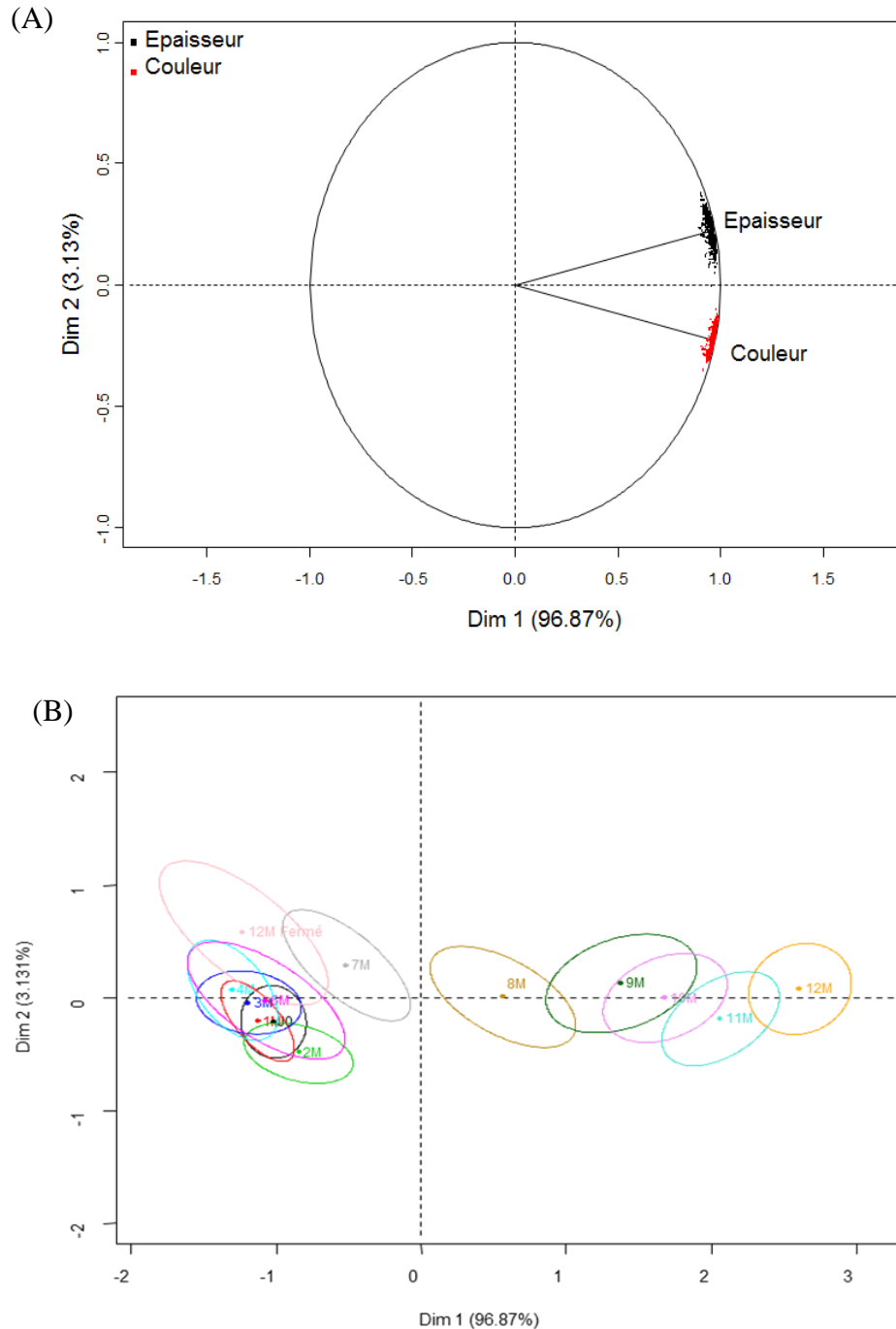


Figure III-2 : Représentation de l'évaluation de chaque panéliste pour chaque échantillon (temps réel, emballage en verre)

Afin d'évaluer l'incertitude liée à la position de chaque échantillon, la méthode de ré-échantillonnage a été appliquée. Le cercle de corrélation et la représentation multidimensionnelle des échantillons avec les ellipses de confiances résultantes sont présentées en Figure III-3.



**Figure III-3 : (A) Cercle des corrélations (B) Représentation des panels virtuels construits par ré-échantillonnage avec des ellipses de confiance contenant 95% des évaluations sensorielles (temps réel, emballage en verre)**

Grâce aux ellipses de confiance, il est mis en évidence que l'échantillon correspondant à un vieillissement pendant 7 mois est différent des échantillons stockés aux temps inférieurs. Il apparaît que les ellipses des échantillons stockés pendant 8 et 9 mois se chevauchent faiblement. Leur distinction n'apparaît pas comme évidente par la simple observation de l'ACP. Il en est de même pour les échantillons stockés pendant 11 et 12 mois. Afin de confirmer leur distinction, des tests T2 de Hotelling ont été réalisés (se reporter au paragraphe II.2.1.1.2 du chapitre II) <sup>[30]</sup>. Les « *p-values* » résultantes du test entre deux échantillons sont données dans le Tableau 3. Les cases colorées signifient que le test est significatif (*p-value* < 0,05) et donc que les produits sont évalués comme différents.

**Tableau III-3 : Résultats des tests T2 de Hotelling (emballage en verre)**

	J0	1M	2M	3M	4M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M	12M Fermé
J0	1	0.7174	0.282	0.476	0.182	0.7752	0.0002446	3.752e-08	2.174e-10	8.115e-14	4.337e-16	1.024e-18	0.03785
1M	0.7174	1	0.2738	0.7305	0.4813	0.5889	4.351e-06	1.549e-09	1.632e-10	8.695e-14	1.874e-15	1.056e-18	0.01815
2M	0.282	0.2738	1	0.03186	0.02294	0.2119	7.176e-05	8.755e-08	1.316e-08	2.846e-11	7.052e-13	8.319e-16	0.003515
3M	0.476	0.7305	0.03186	1	0.8011	0.8683	0.0007907	1.988e-07	6.913e-10	1.335e-12	1.335e-14	9.665e-17	0.07293
4M	0.182	0.4813	0.02294	0.8011	1	0.6619	6.828e-05	9.663e-09	8.016e-11	8.041e-14	1.417e-15	2.665e-18	0.09751
6M	0.7752	0.5889	0.2119	0.8683	0.6619	1	0.005217	1.67e-06	3.384e-08	1.923e-10	1.102e-11	1.47e-14	0.1855
7M	0.0002446	4.351e-06	7.176e-05	0.0007907	6.828e-05	0.005217	1	0.001121	1.45e-06	5.131e-09	1.086e-10	8.175e-14	0.0557
8M	3.752e-08	1.549e-09	8.755e-08	1.988e-07	9.663e-09	1.67e-06	0.001121	1	0.03834	0.00146	3.569e-05	2.796e-08	9.979e-06
9M	2.174e-10	1.632e-10	1.316e-08	6.913e-10	8.016e-11	3.384e-08	1.45e-06	0.03834	1	0.393	0.007894	0.000178	3.743e-08
10M	8.115e-14	8.695e-14	2.846e-11	1.335e-12	8.041e-14	1.923e-10	5.131e-09	0.00146	0.393	1	0.1222	0.001405	3.027e-10
11M	4.337e-16	1.874e-15	7.052e-13	1.335e-14	1.417e-15	1.102e-11	1.086e-10	3.569e-05	0.007894	0.1222	1	0.06902	1.515e-11
12M	1.024e-18	1.056e-18	8.319e-16	9.665e-17	2.665e-18	1.47e-14	8.175e-14	2.796e-08	0.000178	0.001405	0.06902	1	3.207e-14
12M Fermé	0.03785	0.01815	0.003515	0.07293	0.09751	0.1855	0.0557	9.979e-06	3.743e-08	3.027e-10	1.515e-11	3.207e-14	1

Les résultats des tests T2 de Hotelling indiquent que les échantillons stockés pendant les 6 premiers mois de stockage sont identiques. Une différence est cependant observée entre l'échantillon stocké pendant 2 mois et ceux stockés pendant 3 et 4 mois ; elle n'est plus observée pour l'échantillon stocké pendant 6 mois. La première hypothèse envisagée pour interpréter cette différence est l'application d'un mauvais traitement lors de l'ouverture des pots des échantillons stockés pendant 3 et 4 mois (temps d'ouverture trop long, échantillon mal refermé...). Cependant, ces échantillons ne sont pas considérés comme différents des



échantillons stockés pendant 1 et 6 mois, ce qui ne permet pas de valider cette hypothèse. La seule possibilité envisagée pour expliquer cette différence est une erreur du panel lors de l'évaluation de l'échantillon stocké pendant 2 mois.

L'hypothèse émise lors de l'observation de l'ACP sur la différence entre les échantillons stockés pendant 8 et 9 mois est confirmée par les tests T2 de Hotelling. De plus, il apparaît que les échantillons stockés pendant 11 et 12 mois sont identiques. Les mesures étant arrêtées à 12 mois, il n'est pas possible de conclure que ce dernier résultat traduit un ralentissement du processus de vieillissement de l'échantillon.

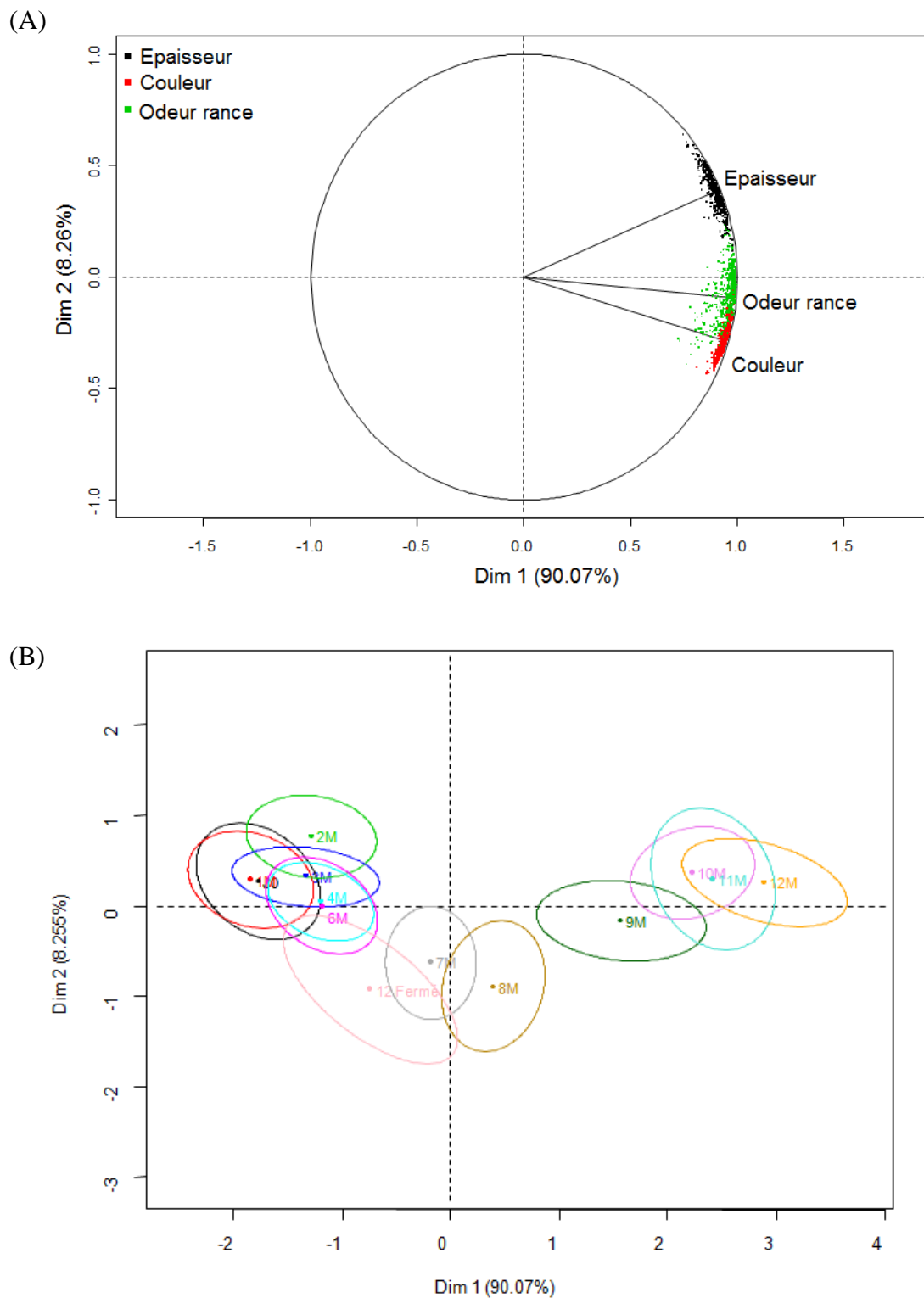
Enfin, l'échantillon correspondant à un stockage pendant 12 mois sans ouverture, ne semble pas vieillir de la même façon que celui ayant subi une ouverture régulière. Il apparaît différent du T0, mais est identique aux échantillons stockés entre 4 et 7 mois avec ouverture. L'ouverture des pots, produisant le contact avec l'air extérieur, semble ainsi avoir une influence significative sur la couleur et l'épaisseur de l'émulsion. L'oxydation possible des corps gras par l'oxygène atmosphérique introduit lors de l'ouverture et la déshydratation du produit pourraient être à l'origine de ce vieillissement.

### **III.2 Influence de l'emballage**

La démarche statistique présentée ci-dessus a été appliquée à l'étude de l'influence de l'emballage sur le vieillissement de l'échantillon. Les données issues de l'étude de vieillissement en temps réel pour les échantillons de l'émulsion de référence contenue dans du polyéthylène ont été soumises aux mêmes analyses unidimensionnelle et multidimensionnelle.

L'analyse unidimensionnelle a révélé trois descripteurs discriminants : « couleur », « épaisseur » et « odeur rance ». Ce dernier, défini comme non discriminant lors de l'analyse des échantillons contenus dans du verre, semble caractéristique du vieillissement de l'émulsion contenue dans du PE.

L'analyse multidimensionnelle (Figure III-4B) et les tests T2 de Hotelling (Tableau III-4) montrent que le produit devient significativement différent après 7 mois de stockage. L'échantillon correspondant à un stockage pendant 12 mois sans ouverture, ne semble pas vieillir autant que celui ayant subi une ouverture régulière. Ces observations sont identiques à celles observées pour les échantillons contenus dans du verre.



**Figure III-4 : (A) Cercle des corrélations (B) Représentation des panels virtuels construits par ré-échantillonnage avec des ellipses de confiance contenant 95% des évaluations sensorielles (temps réel, emballage en polyéthylène)**

**Tableau III-4 : Résultats des tests T2 de Hotelling (emballage en polyéthylène)**

	T0	1M	2M	3M	4M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M	12M Fermé
T0	1	0.9616	0.0912	0.4921	0.1272	0.238	3.38e-4	9.28e-6	2.977e-7	7.29e-10	6.777e-11	7.195e-11	0.02402
1M	0.9616	1	0.05615	0.353	0.05798	0.1487	1.183e-4	3.038e-6	1.208e-7	3.221e-10	3.064e-11	4.081e-11	0.01637
2M	0.0912	0.05615	1	0.3514	0.1089	0.1238	2.105e-4	1.347e-5	1.118e-6	2.167e-8	3.162e-9	2.868e-9	0.001567
3M	0.4921	0.353	0.3514	1	0.625	0.6589	2.927e-3	1.326e-4	5.67e-6	1.843e-8	1.826e-9	8.507e-10	0.02088
4M	0.1272	0.05798	0.1089	0.625	1	0.9949	0.02703	0.001013	9.219e-6	4.124e-9	2.672e-10	7.333e-11	0.1125
6M	0.238	0.1487	0.1238	0.6589	0.9949	1	0.06766	0.004142	2.327e-5	1.089e-8	1.046e-9	1.606e-10	0.1653
7M	3.38e-4	1.183e-4	2.105e-4	0.002927	0.02703	0.06766	1	0.4592	0.006178	1.667e-5	4.82e-6	4.938e-7	0.3756
8M	9.28e-6	3.038e-6	1.347e-5	0.0001326	0.001013	0.004142	0.4592	1	0.02865	1.364e-4	6.204e-5	5.181e-6	0.1217
9M	2.977e-7	1.208e-7	1.118e-6	5.67e-6	9.219e-6	2.327e-5	6.178e-3	0.02865	1	0.119	0.1199	0.01631	1.25e-45
10M	7.29e-10	3.221e-10	2.167e-8	1.843e-8	4.124e-9	1.089e-8	1.667e-5	1.364e-4	0.119	1	0.9373	0.5122	1.444e-7
11M	6.777e-11	3.064e-11	3.162e-9	1.826e-9	2.672e-10	1.046e-9	4.82e-6	6.204e-5	0.1199	0.9373	1	0.6729	6.377e-8
12M	7.195e-11	4.081e-11	2.868e-9	8.507e-10	7.333e-11	1.606e-10	4.938e-7	5.181e-6	0.01631	0.5122	0.6729	1	2.792e-9
12M Fermé	0.02402	0.01637	0.001567	0.02088	0.1125	0.1653	0.3756	0.1217	1.25e-45	1.444e-7	6.377e-8	2.792e-9	1

### III.3 Influence de la température

La démarche statistique précédemment décrite a été appliquée à l'étude de l'influence de la température sur le vieillissement de l'émulsion cosmétique. Les données issues des études de vieillissement accéléré de l'émulsion de référence contenue dans du verre et dans du polyéthylène ont été soumises aux mêmes analyses unidimensionnelles. Les descripteurs qui se sont révélés être significatifs à l'issue de cette analyse (Tests de Friedman) sont présentés dans le Tableau III-5.

**Tableau III-5 : Facteurs significatifs selon la température de stockage et le type d'emballage**

Température de stockage (°C)	Descripteurs significatifs* (emballage verre)	Descripteurs significatifs* (emballage PE)
45	Déphasage Epaisseur Couleur	Déphasage Epaisseur Couleur Odeur rance
50	Déphasage Epaisseur Couleur	Déphasage Epaisseur Couleur Odeur rance
55	Déphasage Epaisseur Couleur Odeur acide	Déphasage Epaisseur Couleur Odeur acide Odeur rance
60	Déphasage Epaisseur Couleur Odeur acide	Déphasage Epaisseur Couleur Odeur acide Odeur rance

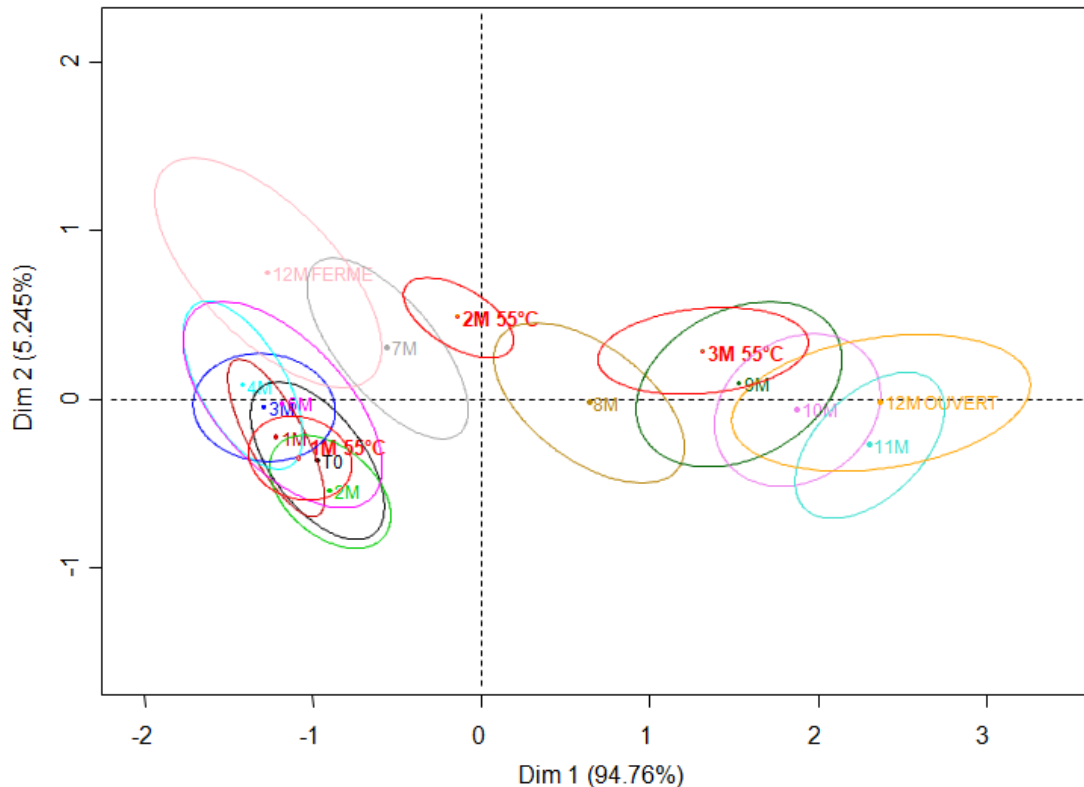
\* « *p-value* » calculée inférieure au niveau de signification  $\alpha = 0,05$  ; hypothèse  $H_a$  du test de Friedman (échantillons différents) retenue

Les descripteurs « épaisseur » et « couleur », révélés significatifs lors de l'analyse des données en temps réel, le sont également pour les données acquises en accéléré. Le descripteur « odeur acide » est significatif pour les conditions 55 °C et 60 °C quelque soit le type d'emballage. L'élévation de la température de stockage semble favoriser un phénomène conduisant à la formation de composés aux propriétés odorantes induisant un ressenti « acide ».

Enfin, l'hypothèse émise lors de l'étude de l'influence de l'emballage en PE se confirme pour les données en temps accéléré : le descripteur « odeur rance » est significatif pour toutes les conditions « emballage PE ».

Une analyse multidimensionnelle permet de projeter sur un même plan les résultats issus de l'analyse d'échantillons stockés dans des conditions de température élevée et celles issues de l'analyse des échantillons stockés à température ambiante. A titre d'exemple, l'ACP de la projection des résultats des évaluations des échantillons stockés à 55 °C et de ceux stockés à température ambiante est présentée en Figure III-5. Les descripteurs en commun : « épaisseur » et « couleur », ont été pris en compte pour la construction de l'ACP. Pour une

meilleure visibilité, seuls les échantillons correspondants aux durées de stockage 1, 2 et 3 mois stockés à 55 °C ont été représentés (ellipses rouges annotées 1M 55 °C ; 2M 55 °C et 3M 55 °C).



**Figure III-5 : Représentation des panels virtuels construits par ré-échantillonnage avec des ellipses de confiance contenant 95% des évaluations sensorielles (condition réelle et condition accélérée 55 °C, emballage en verre)**

Du point de vue des descripteurs « épaisseur » et « couleur », l'échantillon 1M 55 °C est évalué comme identique aux échantillons stockés entre 1 et 6 mois à température ambiante et différent des échantillons stockés plus de 6 mois dans les mêmes conditions. L'échantillon 2M 55 °C est évalué différent des échantillons stockés à température ambiante quelque soit la durée de stockage. Il semble cependant présenter des ressemblances avec les échantillons stockés pendant 7 et 8 mois à température ambiante. Enfin, l'échantillon 3M 55 °C est évalué comme identique à l'échantillon stocké 9 mois à température ambiante.

### III.4 Conclusion

L'utilisation de l'analyse unidimensionnelle a permis de révéler des différences sensorielles induites par le type d'emballage, la température et la durée de stockage. Ils concernent l'épaisseur, la couleur, l'odeur et la séparation de phases. Il est apparu que tous les paramètres organoleptiques ne changent pas de la même manière en fonction du type d'emballage et de la température de stockage. Par exemple, l'odeur rance apparaît seulement dans l'emballage en polyéthylène alors que la séparation de phases et l'émanation de l'odeur acide ne se produisent que lorsque l'émulsion est soumise à des températures élevées.

L'analyse multidimensionnelle, notamment l'ACP et la méthode de ré-échantillonnage, met en évidence de fortes différences entre les produits avant et après 6 mois de stockage à température ambiante, quel que soit le type d'emballage utilisé. Elle permet également de confirmer l'influence significative de la température et de l'emballage sur la stabilité de l'émulsion cosmétique étudiée.

Il est intéressant de constater que les propriétés sensorielles d'une émulsion cosmétique évoluent différemment en fonction de la température et du matériau dans lequel elle est stockée. Après une période de stockage de 12 mois, l'émulsion stockée dans le polyéthylène a évolué différemment de celle stockée dans le verre. Les facteurs significatifs ne sont pas les mêmes à température ambiante et à températures élevées. De plus, l'émulsion ayant subi un traitement mimant les conditions réelles d'utilisation (ouverture régulière) évolue plus rapidement que la même émulsion dont l'emballage a été conservé fermé tout au long des tests. Ceci illustre le rôle joué par l'atmosphère, très probablement par l'oxygène, sur le vieillissement de l'émulsion cosmétique.

En résumé, l'approche statistique proposée pour évaluer la durée de vie du produit est relativement facile ; elle est surtout plus réaliste que les tests classiques de stabilité et de compatibilité établis pour la détermination de la date de péremption, tests généralement non soumis à une procédure sensorielle.



---

## **CHAPITRE IV - Suivi des paramètres physico-chimiques**

---



Ce chapitre présente l'ensemble des résultats de l'étude du suivi des paramètres physico-chimiques de l'émulsion de référence. La première partie présente les résultats du suivi d'une émulsion cosmétique en conditions normales et accélérées de vieillissement. Des essais de corrélation entre conditions normales et conditions accélérées par augmentation de la température sont proposés pour les paramètres classiquement intégrés, ou pouvant être intégrés, dans le protocole de stabilité utilisé par les laboratoires de tests. Ces derniers ont pour but d'évaluer un vieillissement en temps réel à partir d'une mesure en condition accélérée. La deuxième partie présente l'étude consacrée au suivi de la concentration des molécules d'intérêt au sein de l'émulsion cosmétique, études menées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

## IV.1 pH

### IV.1.1 Résultats du suivi en conditions réelles de vieillissement

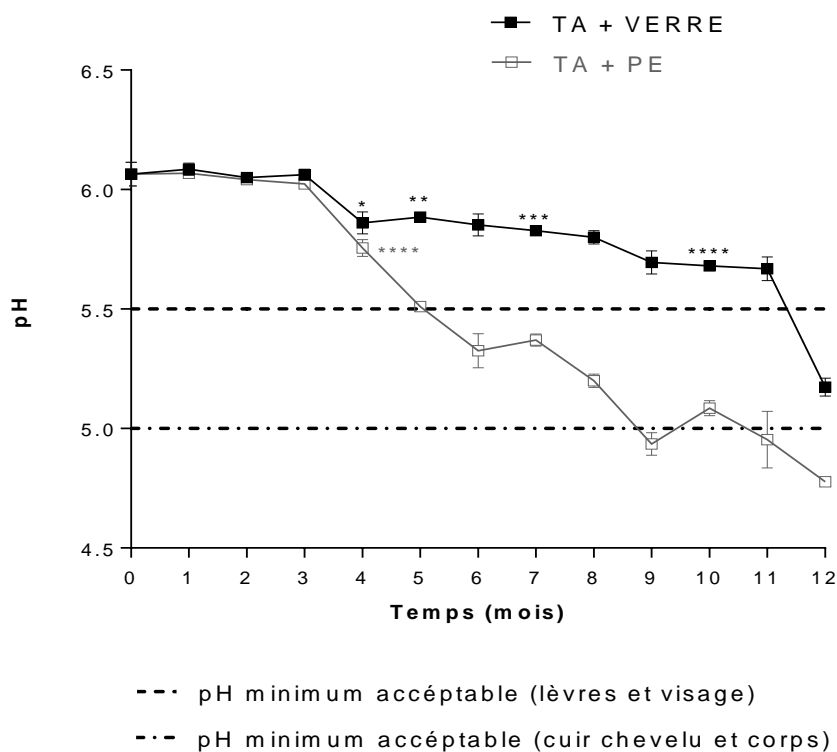
La Figure IV-1 représente l'évolution du pH de l'émulsion de référence après stockage en conditions réelles et raisonnablement prévisibles, dans un contenant en verre et dans un contenant en polyéthylène. Le pH mesuré à  $T_0$  est de 6,07. Aucune différence significative n'est observée durant les trois premiers mois de stockage, quel que soit le type de contenant. Le pH devient significativement différent à partir du quatrième mois dans les deux conditions : PE et verre ( $p < 0,05$  ; test de Dunnett)<sup>[14]</sup> ; et ne cesse de diminuer jusqu'à la fin des mesures, soit après 1 an de stockage. Le pH atteint une valeur minimale de 5,67 pour l'émulsion contenue dans le verre et de 4,95 pour celle contenue dans le PE. Une différence maximale est observée après 9 mois de stockage : le pH mesuré dans le PE à 10 mois est 0,8 fois inférieur à celui mesuré pour l'émulsion contenue dans le verre. L'influence du matériau d'emballage est clairement observée pour ce paramètre. L'acidification plus nette de l'émulsion en contact avec le PE peut être expliquée par le rejet d'une substance ou d'un mélange de substances constitutives du plastique pouvant provenir du polymère lui-même ou d'additifs utilisés lors du procédé de fabrication.

Du point de vue de l'acceptabilité du produit, permettant une utilisation sans risque pour le consommateur, des limites minimales et maximales de pH correspondantes aux zones d'application du produit sont définies. Le Tableau IV-1, tiré de l'ouvrage *Conception des produits cosmétiques : la formulation* par A.M. Pensé-Lhéritier<sup>[4]</sup>, indique ces gammes de pH acceptables, selon la zone d'application, pour une population adulte.

**Tableau IV-1 : Gamme de pH acceptable, selon la zone d'application, pour une population adulte**

Partie du corps	Gamme de pH
Hygiène buccale	6,0 – 10,5
Contour des yeux	7,0 – 7,2
Lèvres et visage	5,5 – 6,5
Cuir chevelu et corps	5,0 – 5,5
Muqueuses	4,0 – 5,0

Dans la présente étude, l'émulsion prise en référence peut prétendre à la qualification « émollissante » par les effets adoucissant et hydratant des ingrédients qui la constituent (huile d'argan, huile d'amande douce...). Son utilisation est donc dédiée aux mains, au visage, voire au corps. Les limites correspondantes à ces zones d'application sont reportées sur la Figure IV-1. La limite minimale, fixée à 5,5 pour la zone « lèvres et visage », est atteinte après 6 mois de stockage dans l'emballage PE alors que celle pour la zone « cuir chevelu et corps » n'est atteinte qu'après 9 mois de stockage. Il est ici mis en évidence l'importance du choix des revendications. Ces dernières sont déterminantes pour l'évaluation de la DDM, puisque les résultats des tests doivent les satisfaire tout au long de la durée de vie du produit. Le produit contenu dans le verre satisfait aux exigences des deux types de zones plusieurs mois après celui contenu dans le PE. Les mesures ayant été arrêtées à 12 mois, il n'est pas possible de conclure quant au « décrochage » observé pour le dernier point qui semble traduire une chute du pH en dessous de la limite acceptable pour les zones « lèvres et visage ».



**Figure IV-1 : pH de l'émulsion de référence après stockage dans un emballage en verre et dans un emballage en polyéthylène (PE). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart type à chacun des temps de mesures. Des différences significatives sont observées à partir du temps T0 + 4mois (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,005$  ; \*\*\*  $p < 0,0005$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  ; test de Dunnett).**

#### IV.1.2 Résultats du suivi en conditions accélérées de vieillissement

Le Tableau IV-2 présente les résultats des mesures de pH de l'émulsion de référence après stockage dans des conditions accélérées.

Les échantillons stockés à 45 °C présentent des valeurs de pH supérieures à 5,0 et 5,5. Ils restent au-dessus des limites de pH acceptables pour les deux types de zones après 3 mois de stockage. Pour les conditions 50 °C, 55 °C et 60 °C, les pH mesurés après trois mois de stockage sont inférieurs à ceux obtenus après 1 an de stockage en conditions normales.

Enfin, comme dans les conditions normales de vieillissement, une différence est observée entre les pH des échantillons contenus dans du verre et ceux contenus dans du PE.

**Tableau IV-2 : Evolution du pH de l'émulsion de référence dans des conditions accélérées de vieillissement**

Température de stockage (°C)	Temps (mois)	pH* (emballage verre)	pH* (emballage PE)
45	0	6,07	6,07
	1	6,23	5,51
	2	5,92	5,58
	3	5,71	5,55
50	0	6,07	6,07
	1	5,77	5,64
	2	5,54	5,49
	3	5,41	5,33
55	0	6,07	6,07
	1	5,71	5,65
	2	5,49	5,24
	3	5,31	4,62
60	0	6,07	6,07
	1	5,63	5,60
	2	5,36	5,18
	3	5,27	4,52

\* moyenne n = 6

### **IV.1.3 Stratégie de corrélation entre les données du suivi en conditions normales et les données issues du vieillissement accéléré**

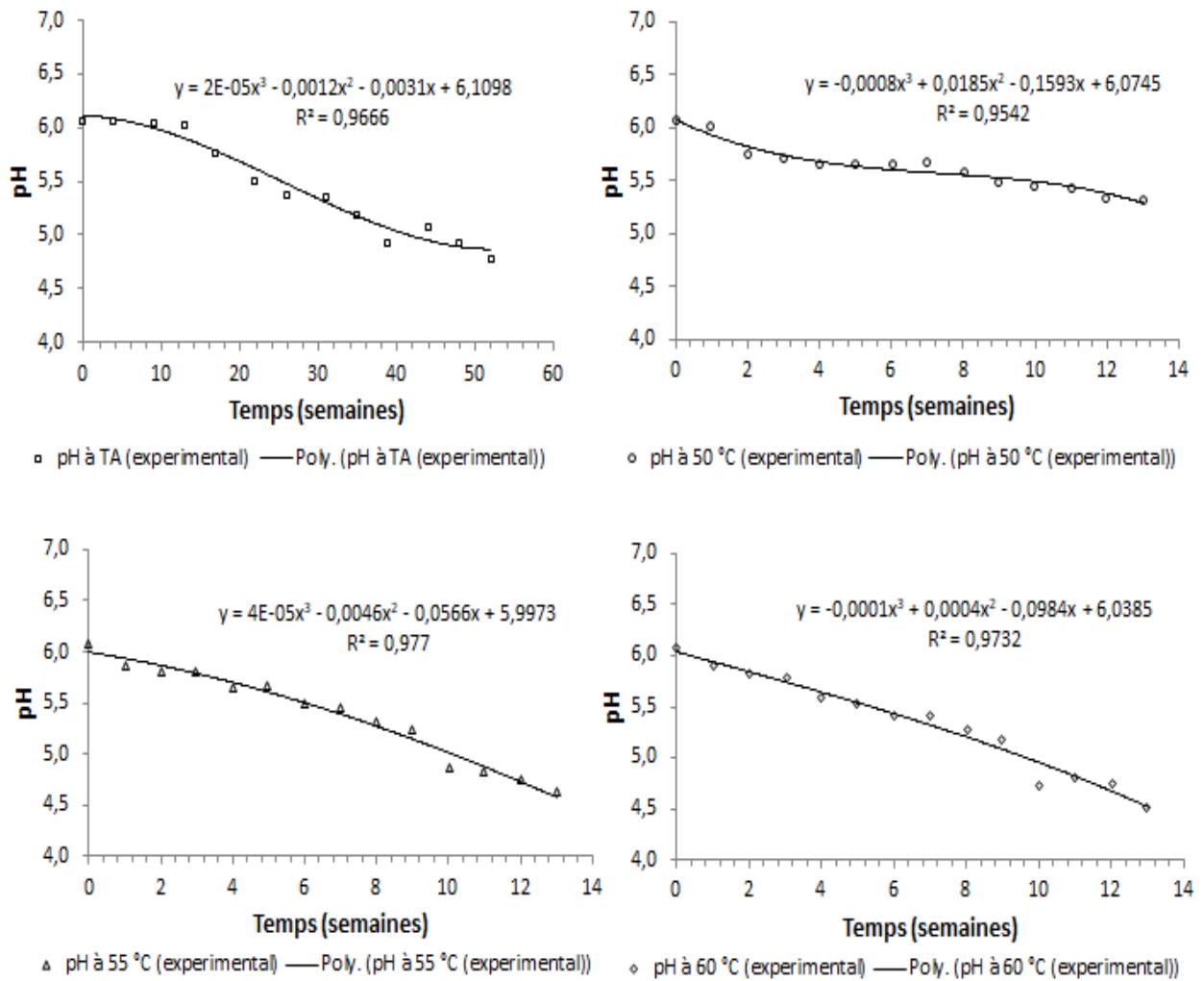
- Modélisation mathématique

La stratégie consiste tout d'abord à modéliser mathématiquement l'évolution du pH de l'émulsion de référence en fonction du temps, pour un stockage en conditions normales et en conditions accélérées.

La première étape consiste à faire ressortir la tendance suivie par les données. Il suffit d'obtenir la courbe de tendance, appelée également « ajustement », des séries de mesures expérimentales à 2 variables ( $x ; y$ ), avec  $x = \text{temps}$  et  $y = \text{pH}$ . Seules les séries à plus de 4 mesures expérimentales ont été prises en compte afin d'avoir suffisamment de points pour modéliser la tendance. Les conditions accélérées considérées sont celles pour lesquelles les mesures ont été réalisées toutes les semaines pendant 3 mois à 50 °C, 55 °C et 60 °C, permettant ainsi d'obtenir 13 points expérimentaux à chaque température.

Dans le cas présent, l'ajustement de la modélisation de l'évolution du pH en fonction du temps par une fonction affine n'est pas adapté. Comme le montre la Figure IV-2, une régression polynomiale semble être le meilleur ajustement dans ce cas.

La régression cubique semble être le choix le plus judicieux, quelle que soit la condition de stockage ; elle est basée sur la méthode de détermination des moindres carrés<sup>[49]</sup>.



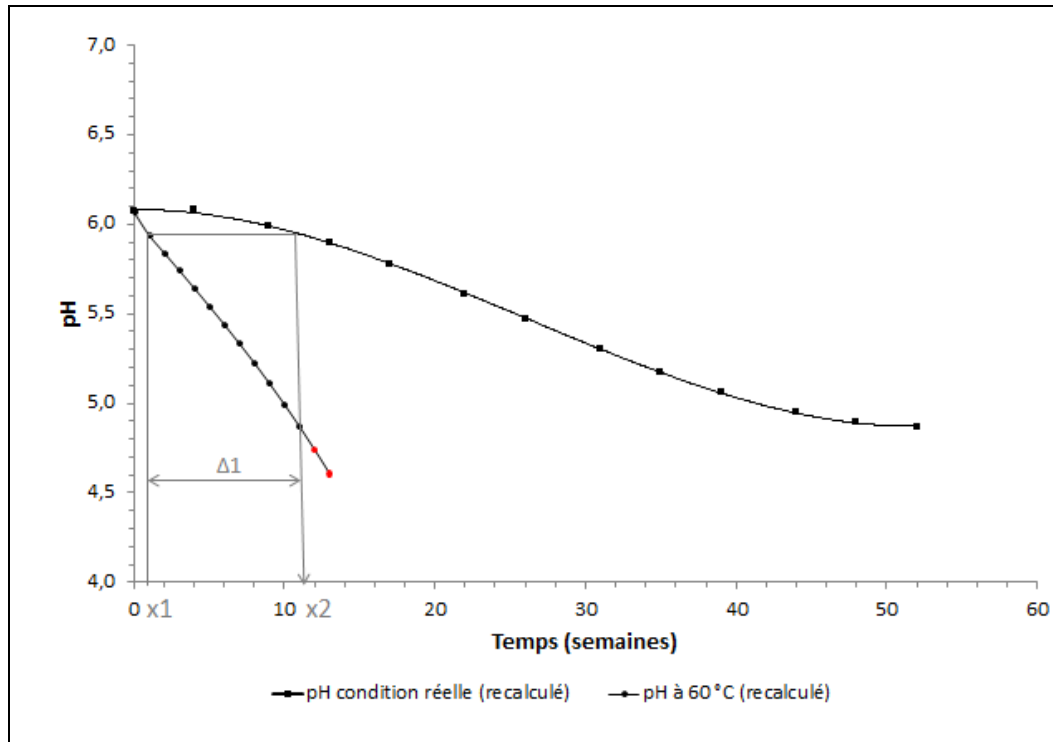
**Figure IV-2 : Courbes de régression du pH en fonction du temps : (a) conditions réelles, température ambiante (TA) ; (b) 50 °C ; (c) 55 °C ; (d) 60 °C**

- Calcul des deltas temps

La deuxième étape consiste à utiliser les équations des courbes de régression pour obtenir des séries de données recalculées pour chaque condition de stockage. A titre d'exemple, les séries de données théoriques obtenues pour la condition réelle et la condition accélérée 60 °C sont présentées en Figure IV-3.

A partir de ces données, il est possible de calculer les deltas ( $\Delta x$ ) entre le temps  $x_1$  correspondant à une valeur  $y_1$  à 60 °C et le temps  $x_2$  auquel cette même valeur  $y_1$  est retrouvée en conditions réelles. Le premier delta est représenté sur le graphique de la Figure IV-3. Pour les deux derniers points de la série de données à 60 °C : (12;4,74) et

(13;4,61) (symbolisés en rouge sur la Figure IV-3) une extrapolation de la courbe de tendance en condition réelle a dû être effectuée. En effet, les valeurs de pH, respectivement de 4,74 et de 4,61 sont en dessous de la valeur de pH du dernier point de donnée pour la condition réelle (52;4,87).



**Figure IV-3 : Représentation du delta temps entre les données théoriques à température ambiante et en condition accélérée à 60 °C**

- Fonction  $\Delta = f(\text{pH})$

L'étape suivante consiste à tracer les  $\Delta$  calculés en fonction des pH théoriques pour chaque condition accélérée. La Figure IV-4 illustre les graphiques obtenus. Encore une fois, un ajustement polynomial semble être la meilleure régression pour décrire les données. Il est clairement observé que la gamme dynamique de pH influe sur la qualité de la régression. L'amplitude des pH à la condition 50 °C pendant 3 mois est très faible : 0,7 de différence. Ce résultat, dû à la trop lente cinétique de modification du pH, induit une corrélation difficilement modélisable (Figure IV-4a).

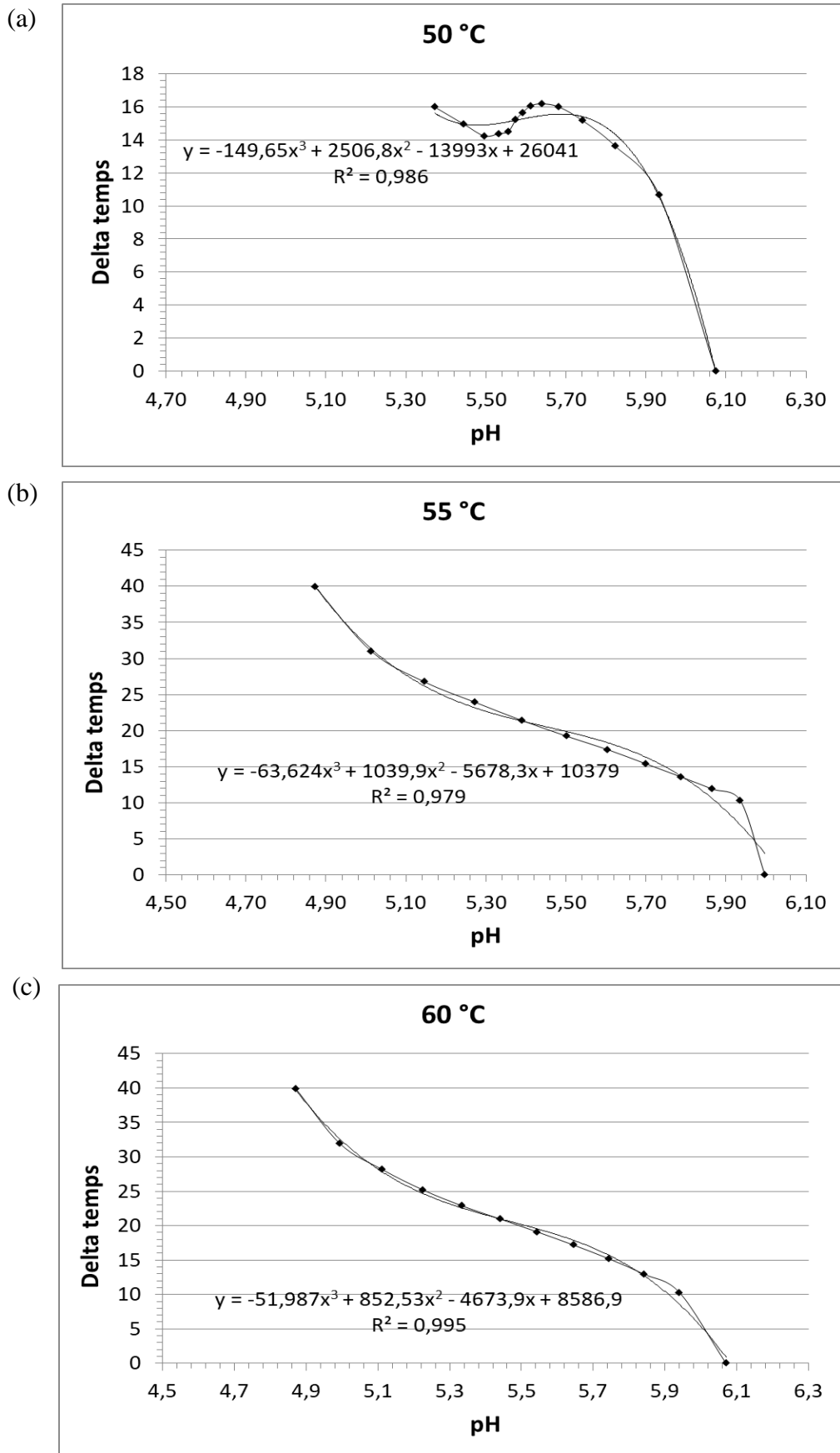


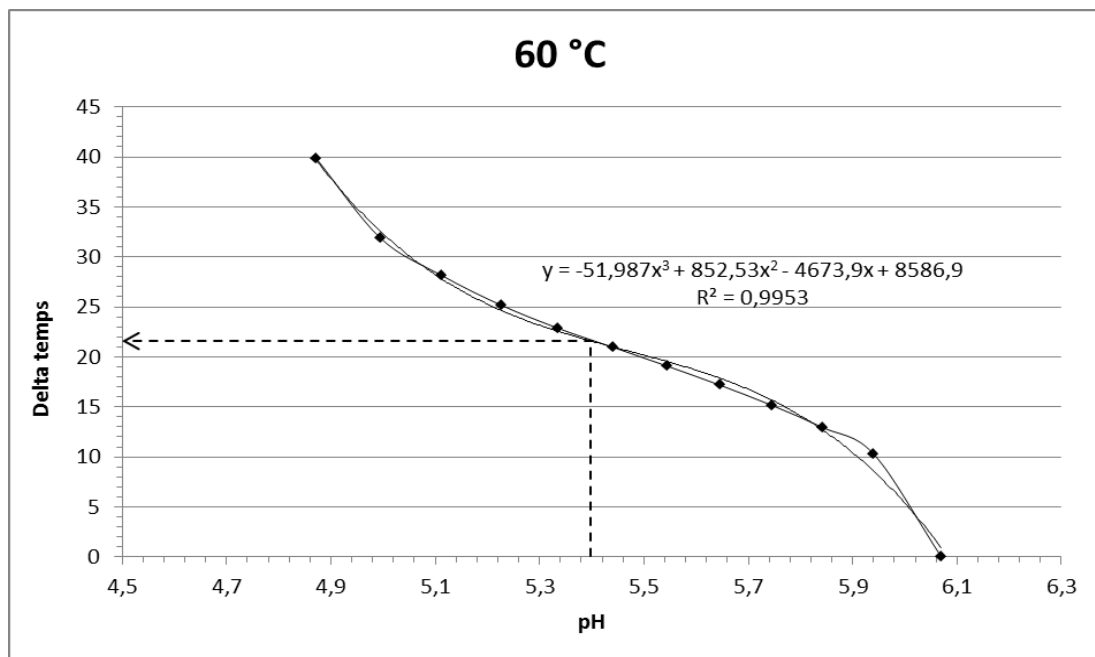
Figure IV-4 : Fonctions  $\Delta = f(\text{pH})$ , pour les conditions accélérées 50 °C (a), 55 °C (b) et 60 °C (c)



- Utilisation de la fonction  $\Delta = f(\text{pH})$

La dernière étape consiste à utiliser l'équation obtenue pour estimer le delta temps à appliquer pour une valeur de pH mesurée sur un échantillon stocké à 60 °C à un temps t donné compris entre 1 et 3 mois.

En choisissant un couple de valeurs (x;y) arbitraire : (7;5,35), l'estimation du delta temps par interpolation (Figure IV-5) au sein de la série est de 22,31. En appliquant ce delta au temps de 7 semaines, il est possible de retrouver le temps obtenu en condition réelle :  $22,31 + 7 = 29,31$  semaines. Afin de vérifier cette corrélation, la valeur peut être retrouvée grâce à l'équation correspondante :  $y = 2\text{E-}05x^3 - 0,0012x^2 - 0,0031x + 6,1098$ . Pour  $y = 5,35$ ,  $x = 29,57$  : résultat très proche de celui retrouvé avec l'utilisation de la fonction  $\Delta = f(\text{pH})$ .



**Figure IV-5 : Estimation du delta temps par interpolation**

## **IV.2 Séparation de phases avec et sans centrifugation**

L'application d'une force centrifuge permet de détecter des phénomènes de déstabilisation du produit (floculation, sédimentation ou crémage). Tout au long de l'étude de stabilité en temps réel de l'émulsion de référence, les tests de stabilité à la centrifugeuse n'ont engendré aucune modification, quel que soit le type de contenant. L'observation d'une phase unique et homogène a conduit à la conclusion qu'aucune évolution physique n'est apparue pendant 1 an de stockage en conditions réelles.

Les mêmes résultats ont été observés pour les échantillons stockés à 45 °C, 50 °C et 55 °C pendant 3 mois, quel que soit le type de contenant, mais les échantillons stockés après plus de 4 semaines à 60 °C ont montré des phénomènes de crémage.

Les résultats des tests de séparation de phase assistés par centrifugation n'apportent aucune information sur l'instabilité physique du produit par rapport au test sensoriel « classique ». En effet, les échantillons ayant subi un phénomène de déstabilisation (crémage) après application d'une force centrifuge, sont ceux ayant été qualifiés de déphasés lors de l'analyse sensorielle. Les paramètres « 3000 rpm » et « pendant 30 minutes », aujourd'hui intégrés aux protocoles des tests de stabilité et de compatibilité des laboratoires de tests, ne permettent pas d'observer une déstabilisation non visible à l'œil nu et donc d'anticiper un éventuel déphasage du produit.

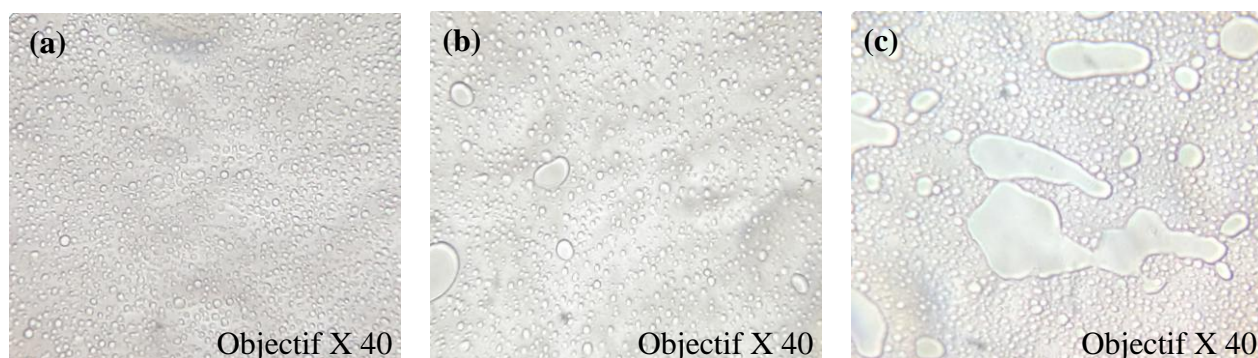
## **IV.3 Observation microscopique**

### **IV.3.1 Résultats du suivi du déphasage en conditions réelles de vieillissement**

Des mesures par microscopie optique complètent l'étude de séparation de phase par la possible mise en évidence de mécanismes de perte de stabilité physique: coagulation et coalescence. Ces mécanismes ont pour conséquence d'accélérer le crémage ou la sédimentation.

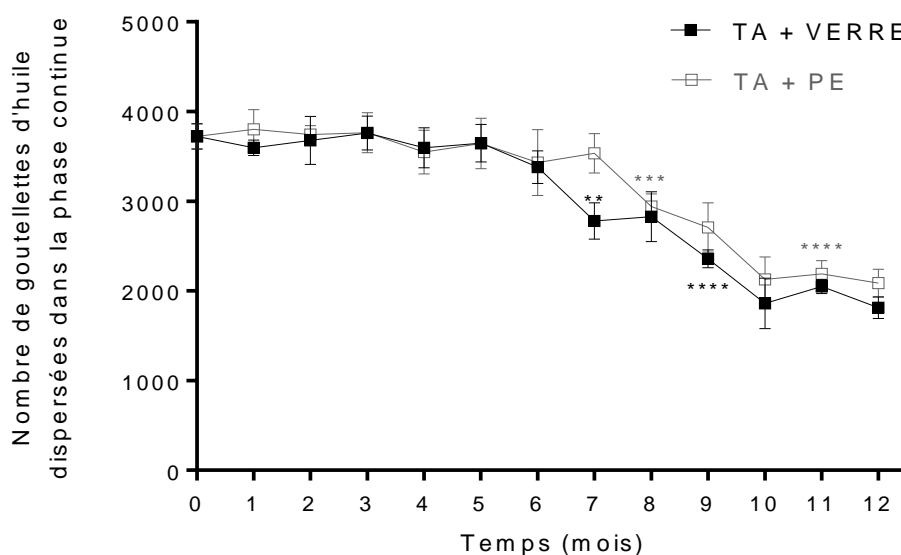
L'observation microscopique de l'émulsion stockée pendant 7 mois a montré une augmentation du diamètre des gouttelettes d'huile (Figure IV-6b) se traduisant par une diminution de leur nombre (Figure IV-7).

L'observation microscopique de l'émulsion stockée pendant plus de 10 mois a révélé un phénomène de coalescence (Figure IV-6c).



**Figure IV-6 : Evolution des gouttelettes d'huile par microscopie optique lors du vieillissement en conditions réelles aux temps T0 (a), T0 + 7 mois (b) et T0 + 12 mois (c)**

La Figure IV-7 représente l'évolution du nombre de gouttelettes d'huile de l'émulsion de référence après stockage en conditions normales et raisonnablement prévisibles dans un contenant en verre et dans un contenant en polyéthylène. Aucune différence significative n'a été observée durant les six premiers mois de stockage quel que soit la nature du contenant. Le nombre de gouttelettes devient significativement différent à partir du septième mois dans le contenant en verre ( $p < 0,05$  ; test de Dunnett) et à partir de huit mois pour le PE ( $p < 0,005$  ; test de Dunnett). Il ne cesse de diminuer jusqu'à la fin des mesures.



**Figure IV-7 : Nombre de gouttelettes d'huile dans l'émulsion de référence après stockage dans un emballage en verre et dans un emballage en polyéthylène. Les valeurs représentent la moyenne ± écart type à chacun des temps de mesures. Des différences significatives sont observées à partir du temps T0 + 7 mois (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; test de Dunnett).**

### IV.3.2 Résultats du suivi en conditions accélérées de vieillissement

Le Tableau IV-3 présente les résultats du dénombrement des gouttelettes d'huile de l'émulsion de référence après stockage en conditions accélérées.

Une diminution du nombre de gouttelettes est observée pour toutes les températures de stockage, quel que soit le type d'emballage. Après trois mois de stockage, le nombre de gouttelettes pour les conditions 50 °C, 55 °C et 60 °C est nettement inférieur à celui obtenu après 1 an de stockage en conditions normales. Les résultats obtenus pour la condition 60 °C montrent que le comptage des gouttelettes n'est plus possible après 4 semaines de stockage. Ceci est dû à la séparation de phases. Même après agitation, l'échantillon reste hétérogène, l'émulsion est « cassée » et la phase lipophile n'est plus dispersée dans la phase aqueuse. Une température égale ou supérieure à 50 °C semble accélérer le phénomène de coalescence par rapport à un vieillissement « normal » sur 1 an.

Enfin, le type d'emballage ne semble pas avoir d'influence sur ce paramètre.

**Tableau IV-3 : Suivi du nombre de gouttelettes d'huile dans une surface observée de 0,05 mm<sup>2</sup> de l'émulsion de référence en conditions accélérées de vieillissement**

Température de stockage (°C)	Temps (mois)	Nombre de gouttelettes d'huile * (emballage verre)	Nombre de gouttelettes d'huile * (emballage PE)
45	0	3724	3724
	1	2910	3118
	2	2868	2877
	3	2691	2955
50	0	3724	3724
	1	2671	2573
	2	2181	2006
	3	1816	1805
55	0	3724	3724
	1	2426	2351
	2	1991	1943
	3	1687	1703
60	0	3724	3724
	1	2624	2807
	2	NA	NA
	3	NA	NA

\* moyenne n = 6

NA = Non applicable

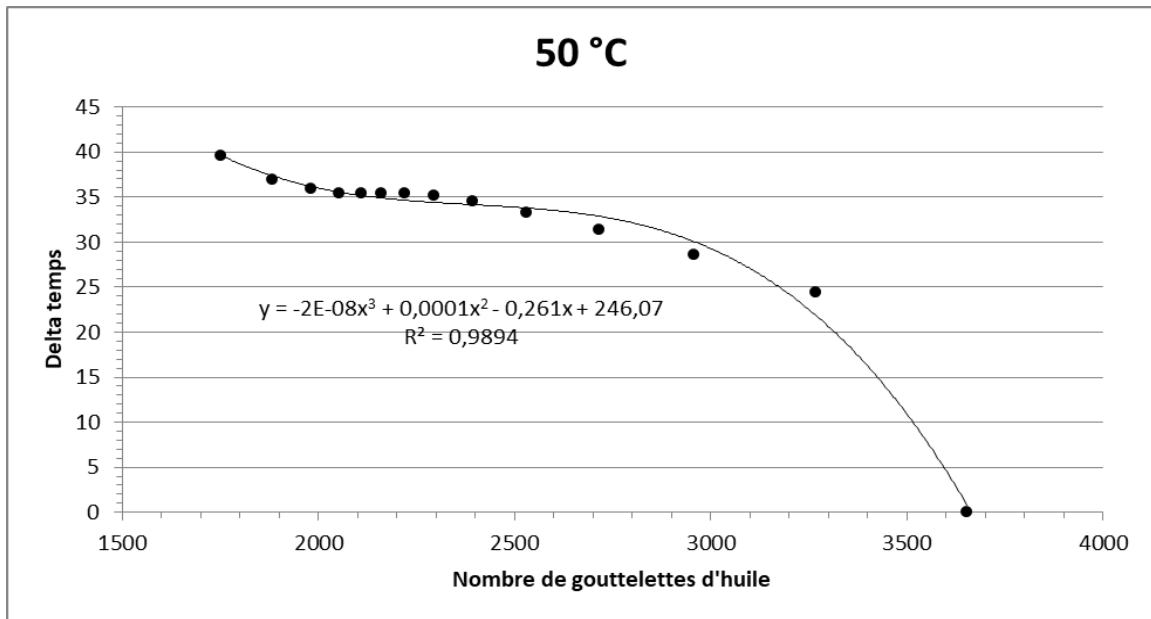
### **IV.3.3 Essais de corrélation entre les données du suivi en conditions normales et les données issues du vieillissement accéléré**

La démarche mathématique présentée en IV.1.3 a été appliquée au paramètre « déphasage de l'émulsion ». La condition accélérée à 60 °C ne peut pas être considérée étant donnée l'impossibilité des mesures après 4 semaines de stockage.

La Figure IV-8 représente les fonctions  $\Delta = f(\text{nombre de gouttelettes d'huile dans une surface observée de } 0,05 \text{ mm}^2 \text{ de l'émulsion})$ , pour les conditions accélérées 50 °C et 55 °C.

Afin de vérifier la pertinence de la démarche appliquée au suivi de ce paramètre, des simulations ont été réalisées aux deux températures. Les Tableaux IV-4 et IV-5 présentent respectivement les résultats des simulations pour les conditions 50 °C et 55 °C. Des valeurs de comptage de gouttelettes ont été choisies à différents domaines des courbes de tendance afin de vérifier si les applications des deltas obtenus coïncident avec les résultats en conditions réelles.

(a)



(b)

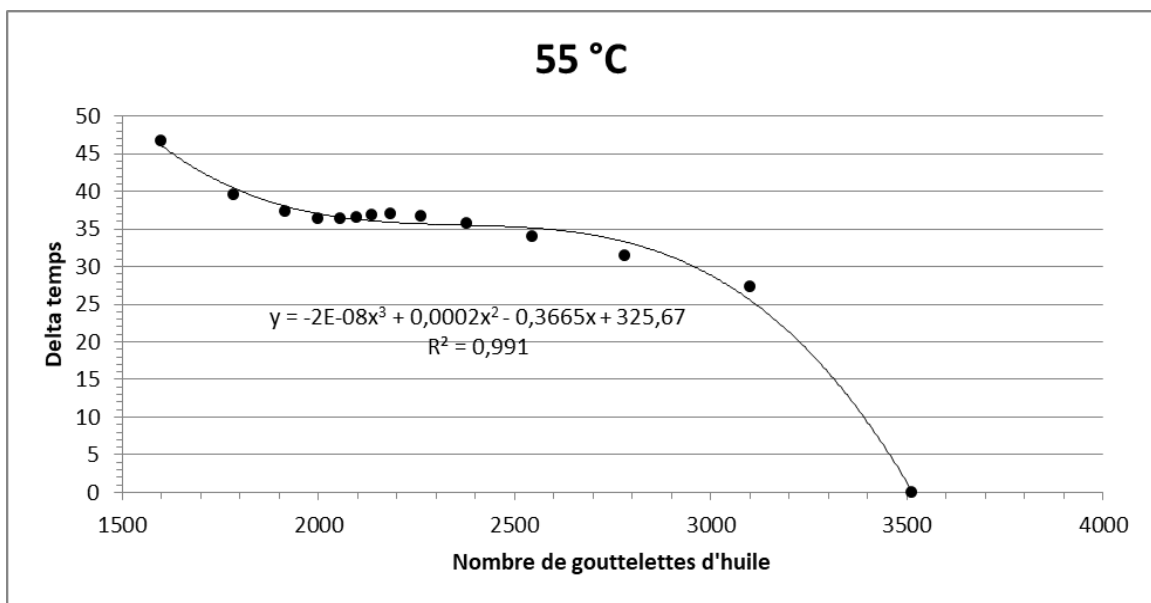


Figure IV-8 : Fonctions  $\Delta = f(\text{nombre de gouttelettes d'huile dans une surface observée de } 0,05 \text{ mm}^2 \text{ de l'émulsion})$ , pour les conditions accélérées 50 °C (a) et 55 °C (b)

**Tableau IV-4 : Simulation de l'utilisation de la corrélation entre la condition accélérée 50 °C et les conditions réelles**

Temps de mesure (en semaine)	1	4	9	13
Valeur arbitraire du nombre de gouttelettes à 50 °C	3200,00	2500,00	2100,00	1750,00
Détermination du delta à appliquer <sup>1</sup>	24,25	33,88	35,23	39,68
Application du delta (temps de mesure + delta)	25,25	37,88	44,23	52,68
Vérification <sup>2</sup>	3279,05	2493,91	2116,20	1746,28

$$^1 y = -2E-08x^3 + 0,0001x^2 - 0,261x + 246,07$$

$$^2 y = 0,0334x^3 - 3,4437x^2 + 54,073x + 3571,5$$

**Tableau IV-5 : Simulation de l'utilisation de la corrélation entre la condition accélérée 55 °C et les conditions réelles**

Temps de mesure (en semaine)	1	4	9	13
Valeur arbitraire du nombre de gouttelettes à 55 °C	3000,00	2400,00	2000,00	1600,00
Détermination du delta à appliquer <sup>1</sup>	28,84	35,46	37,01	46,08
Application du delta (temps de mesure + delta)	29,84	39,46	46,01	59,08
Vérification <sup>2</sup>	3005,90	2395,10	2022,47	1633,69

$$^1 y = -2E-08x^3 + 0,0002x^2 - 0,3665x + 325,67$$

$$^2 y = 0,0334x^3 - 3,4437x^2 + 54,073x + 3571,5$$

L'application des deltas retrouvés grâce à l'utilisation des fonctions  $\Delta = f(\text{nombre de gouttelettes d'huile dans une surface observée de } 0,05 \text{ mm}^2 \text{ de l'émulsion})$  semble coïncider avec le temps en conditions normales, correspondant à une valeur du nombre de gouttelettes évaluée en condition accélérée. Ces simulations permettent de valider mathématiquement le modèle proposé. Pour une validation expérimentale, des mesures réelles sur échantillons devront être effectuées.

## IV.4 Perte de poids (produit + emballage)

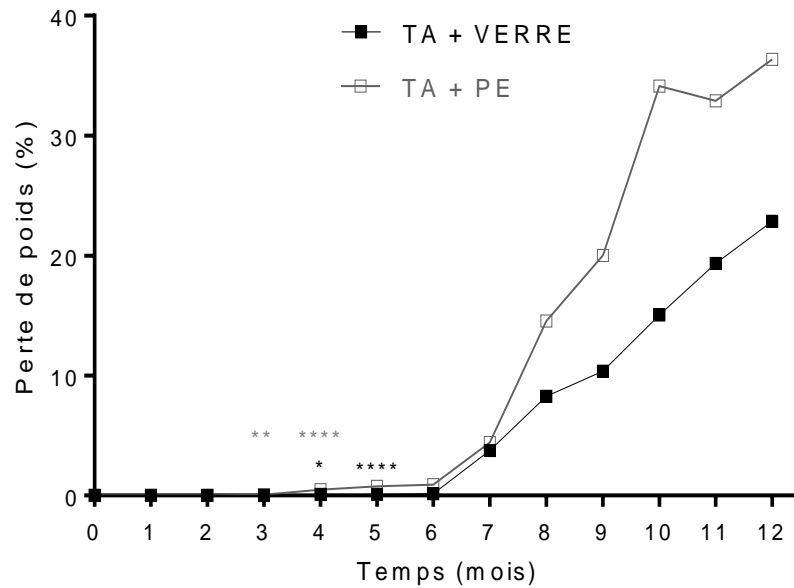
### IV.4.1 Résultats du suivi du poids de l'échantillon en conditions réelles de vieillissement

La qualité du produit dépend de sa conformité aux spécifications définies dans un cahier des charges par le metteur sur le marché. La quantité totale de produit fait partie des spécifications ; c'est pourquoi elle est évaluée lors des études de compatibilité des produits cosmétiques. Dans cette étude, le poids de l'échantillon a été contrôlé tout au long du vieillissement.

La Figure IV-9 représente l'évolution de la perte de poids du produit (émulsion + emballage) après stockage en conditions normales et raisonnablement prévisibles dans un contenant en verre et dans un contenant en polyéthylène. Aucune différence significative n'est observée pour les deux premiers mois de stockage, quelle que soit la nature du contenant. Le pourcentage de perte de poids devient significativement différent à partir du troisième mois dans les conditions de stockage PE ( $p < 0,05$  ; test de Dunnett) et à partir du quatrième mois pour le verre ( $p < 0,005$  ; test de Dunnett). Il ne cesse d'augmenter jusqu'à la fin des mesures.

Concernant les différences observées selon le type de contenant, les pourcentages de perte de poids sont significativement différents à partir du huitième mois de stockage. Cette différence s'accroît aux mesures suivantes, indiquant l'influence de l'emballage sur ce paramètre. Ce résultat est très probablement lié à la faible étanchéité du PE par rapport au verre, pouvant être préjudiciable à la qualité du produit (oxydation des corps gras, dessèchement...). Les pertes de poids des échantillons contenus dans le verre n'étaient cependant pas attendues. Elles pourraient s'expliquer par l'ouverture régulière des pots, qui favorise la déshydratation du produit.





**Figure IV-9 : Perte de poids relative de l'émulsion de référence (émulsion + emballage) après stockage dans un emballage en verre et dans un emballage en polyéthylène. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart type à chacun des temps de mesures. Des différences significatives sont observées à partir du temps T0 + 3 mois (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; test de Dunnett).**

#### IV.4.2 Résultats du suivi en conditions accélérées de vieillissement

Le Tableau IV-6 présente la perte de poids relative de l'émulsion de référence après stockage en conditions accélérées.

Le très faible pourcentage de perte de poids observée pour l'ensemble des conditions accélérées confirme la faible influence de la température sur ce paramètre. Ce résultat confirme l'hypothèse émise ci-dessus sur l'influence de l'ouverture régulière de l'emballage du produit, mimant l'utilisation prévisible du produit dans des conditions normales de vieillissement.

Enfin, comme en conditions normales, une différence significative est observée entre le pourcentage de perte de poids des échantillons en verre et en PE.

**Tableau IV-6 : Pourcentage de perte de poids (émulsion + emballage) en conditions accélérées de vieillissement**

Température de stockage (°C)	Temps (mois)	Pourcentage de perte de poids * (emballage verre)	Pourcentage de perte de poids * (emballage PE)
45	0	0,00	0,00
	1	0,16	2,41
	2	1,04	8,73
	3	1,16	11,34
50	0	0,00	0,00
	1	0,08	2,53
	2	1,45	4,35
	3	1,35	5,60
55	0	0,00	0,00
	1	0,28	4,97
	2	1,60	8,00
	3	1,66	10,24
60	0	0,00	0,00
	1	0,16	2,18
	2	1,29	9,32
	3	1,46	12,48

\* moyenne n = 6

Pour ce paramètre, la stratégie de corrélation entre les données en conditions normales et celles en conditions accélérées n'a pu être appliquée. En effet, la trop faible évolution du paramètre pour les conditions accélérées ne permet pas de comparer les tendances d'évolution de ce dernier avec la tendance d'évolution en conditions normales qui semble suivre une régression de type pseudo-exponentielle.

## IV.5 Conclusion

Cette étude a permis d'étudier la pertinence du suivi de certains paramètres physico-chimiques dans un protocole de stabilité/compatibilité d'émulsions cosmétiques.

Le test de séparation de phases par application d'une force centrifuge, aujourd'hui utilisé par les laboratoires de tests, aux conditions de 3000 rpm pendant 30 minutes, ne peut être considéré comme fiable et discriminant. Dans la présente étude, l'évaluation microscopique du déphasage, très peu intégrée dans les protocoles d'étude de stabilité classiques, semble être une bonne alternative à ce test. Alors que les tests de centrifugation concluent à l'homogénéité de l'émulsion tout au long de l'étude en temps réel, l'observation microscopique apporte des informations supplémentaires sur l'évolution physique de l'émulsion au cours du vieillissement. En effet, l'étude de la taille des gouttelettes d'huile au

sein de l'émulsion ainsi que la visualisation de leur distribution a permis de mettre en évidence des phénomènes de coalescence non visibles à l'œil nu. Rapide et facile à mettre en œuvre, l'observation microscopique est l'outil idéal pour anticiper des instabilités physiques. Ce test, connu de certains formulateurs et largement utilisé dans la phase de développement du produit, est d'un grand intérêt dans le suivi de la stabilité lors de l'établissement de la durée de vie du produit. De plus, le comptage des gouttelettes assisté par informatique rend l'évaluation robuste, ce qui a permis de proposer une corrélation entre le vieillissement en conditions réelles et celui en conditions accélérées. L'observation microscopique peut être complétée par des analyses granulométriques. Afin de mesurer la taille et d'accéder à la distribution statistique en nombre des particules, des techniques telles que la diffusion laser, la diffusion quasi élastique de la lumière ou encore la diffusion multiple de la lumière peuvent être utilisées<sup>[9,44]</sup>.

Cette étude a également permis de mettre en évidence l'effet de l'emballage sur certains paramètres : pH et perte de poids, et de conclure quant à l'effet anticipatoire de la température élevée par rapport aux conditions normales d'utilisation. Enfin, une stratégie de corrélation entre les résultats des études en conditions normales et ceux obtenus en conditions accélérées a pu être proposée pour les mesures de pH et le comptage des gouttelettes par microscopie.

## IV.6 Etude de suivi des molécules d'intérêt : alcool benzylique, acide déhydroacétique et alpha-tocophérol

Dans un premier temps, cette partie présente les résultats de la validation d'une méthode utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour la détection et la quantification des 3 molécules d'intérêt : l'alcool benzylique (AB), l'acide déhydroacétique (DHA) et l'alpha-tocophérol ( $\alpha$ -Toco). Dans un second temps sont présentés les résultats relatifs au suivi des concentrations des 3 composés en fonction des conditions de vieillissement et des temps de stockage.

### IV.6.1 Méthode analytique

#### IV.6.1.1 Séparation chromatographique

De nombreux essais ont permis d'optimiser les paramètres chromatographiques : température de l'injecteur, gradient(s) de température de colonne, débit de gaz vecteur... La détermination de certains de ces paramètres est décrite ci-dessous.

- Conditions d'injection

Au vu des différences de volatilités des 3 composés (Tableau IV-7) et considérant le risque de discrimination au niveau de la vanne de « *split* », le mode « *splitless* » a été sélectionné.

Il n'existe pas véritablement de règle pour fixer la température d'injection en chromatographie en phase gazeuse. Une première approche considère que cette température doit être supérieure de 20 °C à 40 °C à la température finale du four ; une seconde approche préconise une injection 50 °C au-dessus du point d'ébullition le plus élevé du mélange. Il ne s'agit que d'indications pour initier le développement analytique, ces dernières n'étant pas toujours adéquates pour l'ensemble des méthodes. Une règle de base doit cependant être impérativement respectée en injection de type *split/splitless* : la température de l'injecteur doit être assez élevée pour assurer la vaporisation instantanée de l'ensemble de l'échantillon. Considérant les températures d'ébullition des composés étudiés (Tableau IV-7), une température de 280 °C a été sélectionnée.

**Tableau IV-7 : Températures d'ébullition des trois analytes**

Analytes	Température d'ébullition (°C)
AB	205
DHA	270
$\alpha$ -Toco	235

- Programmation en température du four

Dans la présente étude, les trois molécules ayant des températures d'ébullition relativement différentes, la séparation des composés n'a pas posé problème. Un programme de température allant de 50 °C à 330 °C avec un gradient de 15 °C par minute a été choisi afin de doser les trois composés en une seule analyse. La température finale a été fixée à la température maximale tolérée par la colonne (CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS, 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m, Agilent, Waghäusel, Germany) et maintenue pendant 5 minutes, de manière à permettre l'élution d'un maximum d'interférents matriciels. L'analyse dure 25 minutes ; les temps de rétention des trois composés sont indiqués dans le Tableau IV-8.

**Tableau IV-8 : Paramètres de la méthode de dosage de AB, DHA et  $\alpha$ -Toco**

Composé	Tr	Segment	Formule brute	Ion précurseur (m/z)	Ion(s) fils (m/z)	Tension de collision (V)
Alcool benzylique	8,5	1	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	108	91 79	16
Alcool benzylique deutéré	8,4	1	C <sub>7</sub> D <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	113	96 83	16
Acide déhydroacétique	12,5	2	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	169	153 127	35
Alpha-tocophérol	23,0	3	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	431	165	30

#### IV.6.1.2 Détection par spectrométrie de masse

La méthode de dosage des 3 molécules alterne les modes d'ionisation : ionisation électronique (IE) et ionisation chimique (IC), comme permet de le faire la trappe ionique à ionisation interne. Les segments d'acquisition sont optimisés par le choix des ions quantitatifs et qualitatifs indiqués dans le Tableau IV-8. La détection et la quantification se font en mode MS/MS. La méthode est validée sur le milieu de type émulsion H/E. Elle est enfin validée par des tests statistiques pour les paramètres : linéarité ( $r^2$ ), limites de quantification, fidélité, justesse et rendement d'extraction.

- Modes d'ionisation

Le mode d'ionisation fournissant la meilleure sensibilité dépend de la molécule considérée. Les spectres de masse obtenus par ionisation électronique et ionisation chimique des trois molécules à doser sont présentés en Figure IV-10. L'ionisation électronique est réalisée à 70 eV. Le courant d'émission des électrons a été fixé à 20  $\mu\text{A}$  et le temps d'ionisation a été automatiquement ajusté grâce à un protocole « AGC » (*Automatic Gain Controller*). L'ionisation chimique a été réalisée avec du méthanol comme réactant.

#### **Alcool benzylique**

En ionisation électronique, le spectre de l'alcool benzylique présente l'ion moléculaire  $M^+$  de rapport  $m/z$  108, et les ions fils de rapports  $m/z$  91,  $m/z$  79,  $m/z$  77 et  $m/z$  51. Le spectre de l'alcool benzylique marqué (deutéié au niveau du cycle benzénique) présente l'ion moléculaire  $M^+$  à  $m/z$  113 et les ions fils de rapports  $m/z$  96,  $m/z$  84 et  $m/z$  83 puisque les atomes de deutérium sont conservés lors des différentes dissociations de l'ion moléculaire.

En ionisation chimique, seul l'ion de rapport  $m/z$  91 est observé, ce qui s'explique par la perte d'une molécule d'eau, fragmentation caractéristique des alcools protonés.

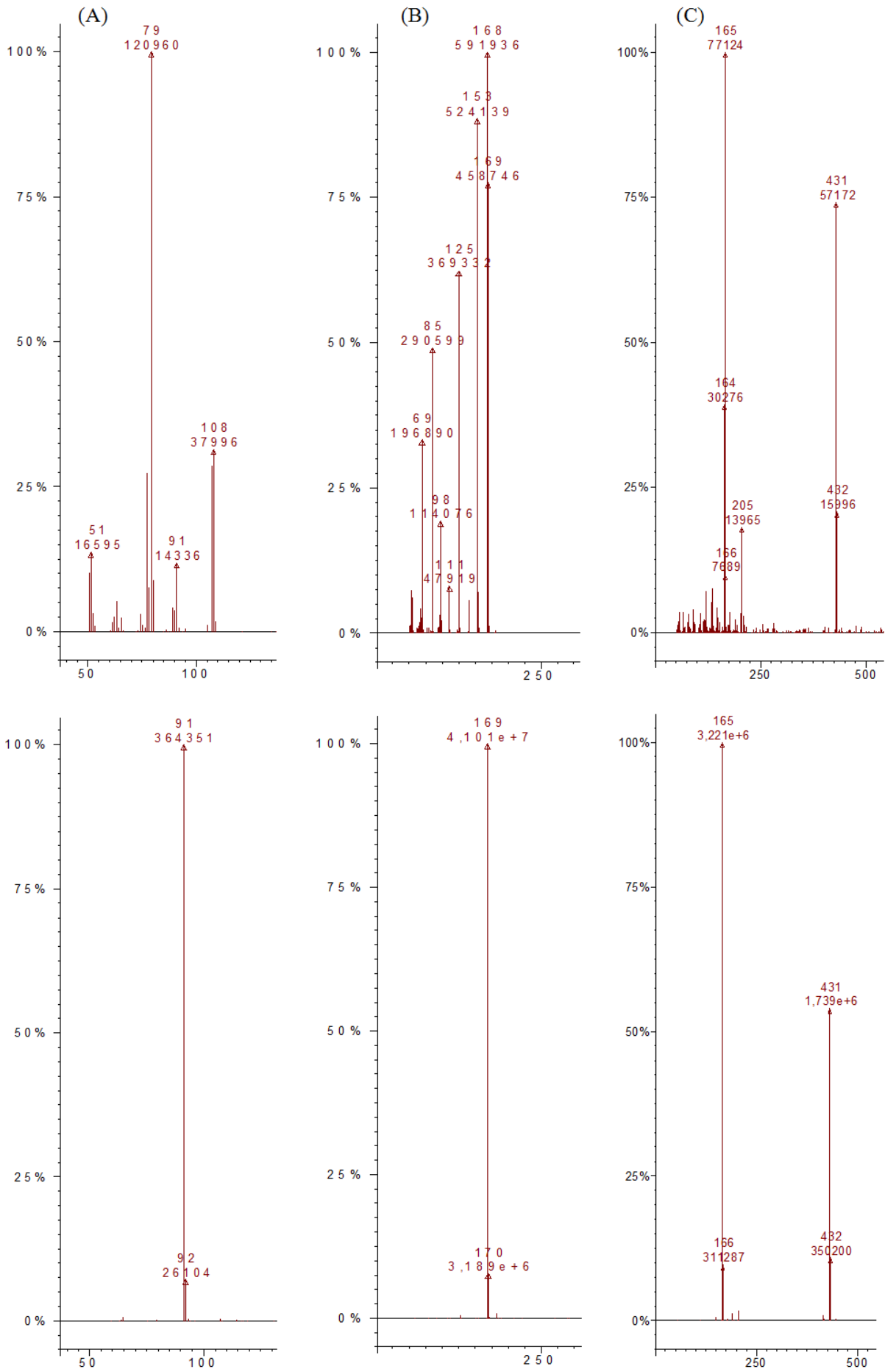
#### **Acide déhydroacétique**

Pour l'acide déhydroacétique, l'ionisation électronique conduit à l'observation sur le spectre de l'ion  $M^+$  de rapport  $m/z$  168 et des ions fils de rapports  $m/z$  153,  $m/z$  125,  $m/z$  111 et  $m/z$  85. En ionisation chimique, seul l'ion pseudomoléculaire  $MH^+$  à  $m/z$  169 est observé.

Il a été remarqué que l'ionisation chimique fournit un seuil de détection plus bas que celui de la méthode équivalente en ionisation électronique. Ceci s'explique par le fait que le courant ionique est moins « dilué » en ionisation chimique<sup>[10]</sup>. Lors du développement de la méthode de quantification, le pic chromatographique correspondant est intégré non pas sur le courant ionique total mais sur le courant correspondant à 1 à 3 ions au maximum. Dans ces conditions certains ions présents en IE deviennent inutiles et une large partie du signal est perdue dès lors que ces ions ne sont plus détectés. *A contrario*, l'ionisation chimique ne fournit que très peu d'ions de rapport  $m/z$  différents dans la source (1 à 10 le plus souvent). Ainsi, lorsque l'on utilise un protocole de détection sélectif, le courant d'ions détecté demeure presque aussi intense qu'en balayage<sup>[79]</sup>. L'ionisation chimique a donc été retenue pour l'acide déhydroacétique.

### **Alpha-tocophérol**

Pour l'alpha-tocophérol, l'ionisation électronique conduit à l'observation sur le spectre de l'ion de rapport  $m/z$  431 résultant de l'autoprotonation de la molécule, et les ions fils de rapport  $m/z$  205 et  $m/z$  165. L'ion de rapport  $m/z$  431 demeure présent aux faibles concentrations en raison de la forte réactivité de la molécule. Parce qu'elle permet d'obtenir très majoritairement l'ion moléculaire  $MH^+$  de rapport  $m/z$  431 quel que soit le niveau de concentration, l'ionisation chimique a été retenue pour cette molécule.

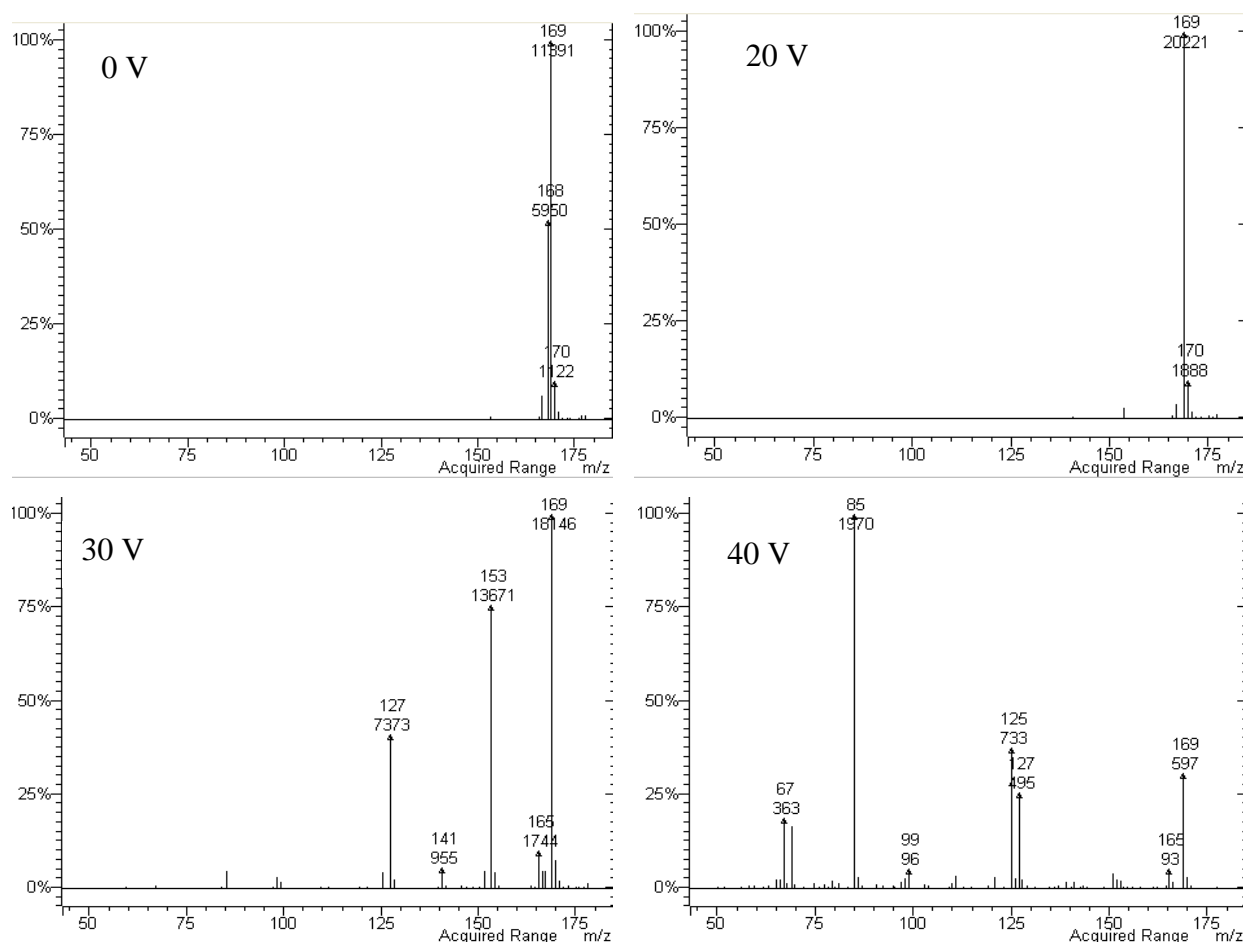


**Figure IV-10 : Spectres de masse de AB (A), DHA (B) et  $\alpha$ -Toco (C) ; obtenus en ionisation électronique (haut) et en ionisation chimique (bas)**



- Mode d'acquisition

Une méthode MS/MS a été développée pour améliorer la sélectivité et diminuer les seuils de détection des composés par rapport à la détection en balayage. Afin d'optimiser les conditions de MS/MS, le mode d'acquisition *Automated Method Development* (AMD) a été utilisé. L'AMD est un protocole d'acquisition facilitant l'optimisation des conditions de collision. Il consiste à appliquer successivement des tensions d'accélération croissantes afin d'établir celle qui induit le taux de fragmentation de l'ion précurseur le plus pertinent. La Figure IV-11 illustre l'exploitation de l'AMD pour obtenir la tension de collision idéale induisant la fragmentation de l'ion précurseur  $m/z$  169 en ion fils. Les tensions inférieures à 30 V ne fragmentent pas suffisamment l'ion précurseur alors que ce dernier est trop dissocié à partir de 40 V. Une expérience complémentaire, menée avec des tensions comprises entre 30 et 40 V a permis d'optimiser la valeur de la tension d'accélération (souvent abusivement appelée « énergie de collision ») à 35 V.



**Figure IV-11 : Spectres MS/MS de l'acide déhydroacétique obtenus en ionisation chimique à différentes valeurs de tension de collision**

La température des électrodes de la trappe d'ions et de l'enceinte ont été fixées respectivement à 230 °C et 70 °C. La pression partielle en hélium dans le spectromètre de masse a été estimée à 0,133 Pa. La calibration du spectromètre de masse a été effectuée grâce aux ions résultants de l'ionisation électronique de perfluorotributylamine. Ces ions ont également servi à l'optimisation de la modulation axiale permettant l'éjection des ions par résonance (3,3 V). L'activation par collisions a été réalisée en mode non-résonant, l'ion précurseur étant isolé avec une fenêtre de 3  $m/z$ .

Les caractéristiques de la méthode MS/MS sont données dans le Tableau 8. Pour chaque segment, la gamme de balayage débute 5 Th en dessous du  $m/z$  de l'ion fils et s'achève 5 Th au-dessus du  $m/z$  de l'ion précurseur. La fréquence d'enregistrement des spectres est de 0,3 spectres/seconde.

#### *IV.6.1.3 Validation de la méthode*

- Echantillons calibrateurs et contrôles qualité

Pour la préparation des calibrateurs, une solution mère à 100  $\mu\text{g/mL}$  a préalablement été préparée en dissolvant une quantité appropriée de chaque composé (AB, DHA, et  $\alpha$ -Toco) dans le méthanol. La solution mère a été stockée à -20 °C entre chaque utilisation. Les calibrateurs (1,5 ; 3,75 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 et 42,5  $\mu\text{g/mL}$  de AB, DHA et  $\alpha$ -Toco) ont été préparés avant chaque analyse dans un blanc d'émulsion H/E. Les contrôles qualité ont également été préparés avant chaque analyse dans des blancs d'émulsion H/E aux concentrations suivantes : 1,5 ; 25 et 42,5  $\mu\text{g/mL}$  pour le BA et l' $\alpha$ -Toco et 3,75 ; 25 et 42,5  $\mu\text{g/mL}$  pour le DHA.

Une solution mère d'étalon interne contenant 1000  $\mu\text{g/mL}$  d'alcool benzylique deutéré (AB- $d_5$ ) a été préparée dans le méthanol. Cinq microlitres de la solution d'étalon interne ont été ajoutés à chaque échantillon avant analyse, pour une concentration finale en AB- $d_5$  de 5  $\mu\text{g/mL}$ . La solution mère a été stockée à -20 °C entre chaque utilisation.

- Calibration, LOQ et fonction réponse

La bonne sélectivité de la méthode et les fonctions réponses ont été validées à l'aide de l'analyse des calibrateurs. Trois courbes de calibration ont été préparées et évaluées pour l'AB, le DHA et l' $\alpha$ -Toco. La limite de quantification (LOQ) a été évaluée en comparant les concentrations recalculées aux concentrations attendues pour le plus bas niveau de calibration. La tolérance (justesse) a été fixée à  $\pm 20\%$  de la concentration attendue.

Une LOQ de 1,5  $\mu\text{g/mL}$  a été validée pour l'AB et l' $\alpha$ -Toco. Une variation supérieure à 20% de la concentration attendue pour le DHA au niveau de concentration 1,5  $\mu\text{g/mL}$  a été observée. La LOQ pour le DHA a donc été estimée à 3,75  $\mu\text{g/mL}$ . Une bonne corrélation est montrée pour chaque composé avec un coefficient de corrélation ( $r^2$ ) supérieur à 0,99 avec une relation quadratique de 1,5  $\mu\text{g/mL}$  à 42,5  $\mu\text{g/mL}$  pour l'alcool benzylique et l'alpha-tocophérol et de 3,75  $\mu\text{g/mL}$  à 42,5  $\mu\text{g/mL}$  pour l'acide déhydroacétique. Les limites de quantification, les équations des fonctions réponses et les coefficients de corrélation sont présentés dans le Tableau IV-9.

**Tableau IV-9 : Paramètres de validation de la méthode de dosage par GC-MS de AB, DHA et  $\alpha$ -Toco dans une émulsion H/E**

Composé	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Domaine de calibration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Equation (moyenne) Courbes de calibration (n = 3)	$r^2$ (moyenne)
AB	1,50	1,50 - 42,50	$y = -0,0015x^2 + 0,4442x + 0,0807$	0.9999
DHA	3,75	3,75 - 42,50	$y = 0,0281x^2 + 2,8785x - 4,1417$	0.9992
$\alpha$ -Toco	1,50	1,50 - 42,50	$y = 0,0214x^2 + 0,0103x + 0,1339$	0.9995

- Validation de la fidélité et de la justesse à l'aide des contrôles qualité

Pour évaluer la fidélité (même jour), la fidélité intermédiaire (3 jours différents) et la justesse, trois échantillons correspondant à des domaines de calibration différents ont été analysés.

Les résultats sont résumés dans les Tableaux IV-10 et IV-11. Les coefficients de variation pour la fidélité et la fidélité intermédiaire sont tous inférieurs à 15%. Malgré des différences selon les composés, les données de validation sont acceptables pour toutes les molécules.

**Tableau IV-10: Fidélité même jour et justesse pour la détermination de AB, DHA et  $\alpha$ -Toco dans une émulsion H/E**

Composé	Concentration attendue ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentration mesurée* ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Justesse (%)
AB	1,50	1,34	1,13	89,55
	12,50	12,58	0,58	100,66
	42,50	42,96	0,85	100,61
DHA	3,75	3,71	10,55	98,90
	12,50	12,06	1,80	102,05
	42,50	42,41	6,95	99,78
$\alpha$ -Toco	1,50	1,35	6,90	96,12
	12,50	13,55	6,52	108,44
	42,50	42,59	6,71	100,22

\*moyenne (n = 3)

**Tableau IV-11 : Fidélité sur 3 jours et justesse pour la détermination de AB, DHA et  $\alpha$ -Toco dans une émulsion H/E**

Composé	Concentration attendue ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentration mesurée* ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Justesse (%)
AB	1,50	1,29	1,55	86,06
	12,50	11,22	1,61	89,79
	42,50	36,46	1,58	85,79
DHA	3,75	4,15	8,28	110,63
	12,50	14,11	8,95	112,89
	42,50	37,34	1,73	87,85
$\alpha$ -Toco	1,50	1,55	4,05	103,32
	12,5	12,36	4,12	98,90
	42,5	40,96	5,80	96,37

\*moyenne (n = 3)

- Extraction de l'émulsion de référence

Les composés ont été extraits de l'émulsion de référence d'après le protocole suivant, inspiré des protocoles classiques retrouvés dans la littérature pour l'extraction de conservateurs à partir de différents types de matrices cosmétiques :<sup>[53,54]</sup>

1 g d'émulsion est introduit dans un tube Falcon® de 10 mL. Dix millilitres de méthanol sont ajoutés. La solution est agitée au vortex avant d'être introduite dans un bain à ultrasons chauffé à 60 °C pendant 1 heure afin de faire fondre la phase lipidique et faciliter l'extraction. Le tube est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant est récupéré et

filtré à l'aide d'un filtre à seringue (0,45 µm). Un aliquot de la solution est dilué dans du méthanol. Les facteurs de dilution sont calculés en fonction de la gamme dynamique validée pour chaque composé. 5 µL de la solution d'étalon interne sont ajoutés avant injection.

Les rendements d'extraction estimés en utilisant le protocole décrit ci-dessus sont respectivement de 106% pour l'alcool benzylique, 64% pour l'acide déhydroacétique et 98% pour l'alpha-tocophérol.

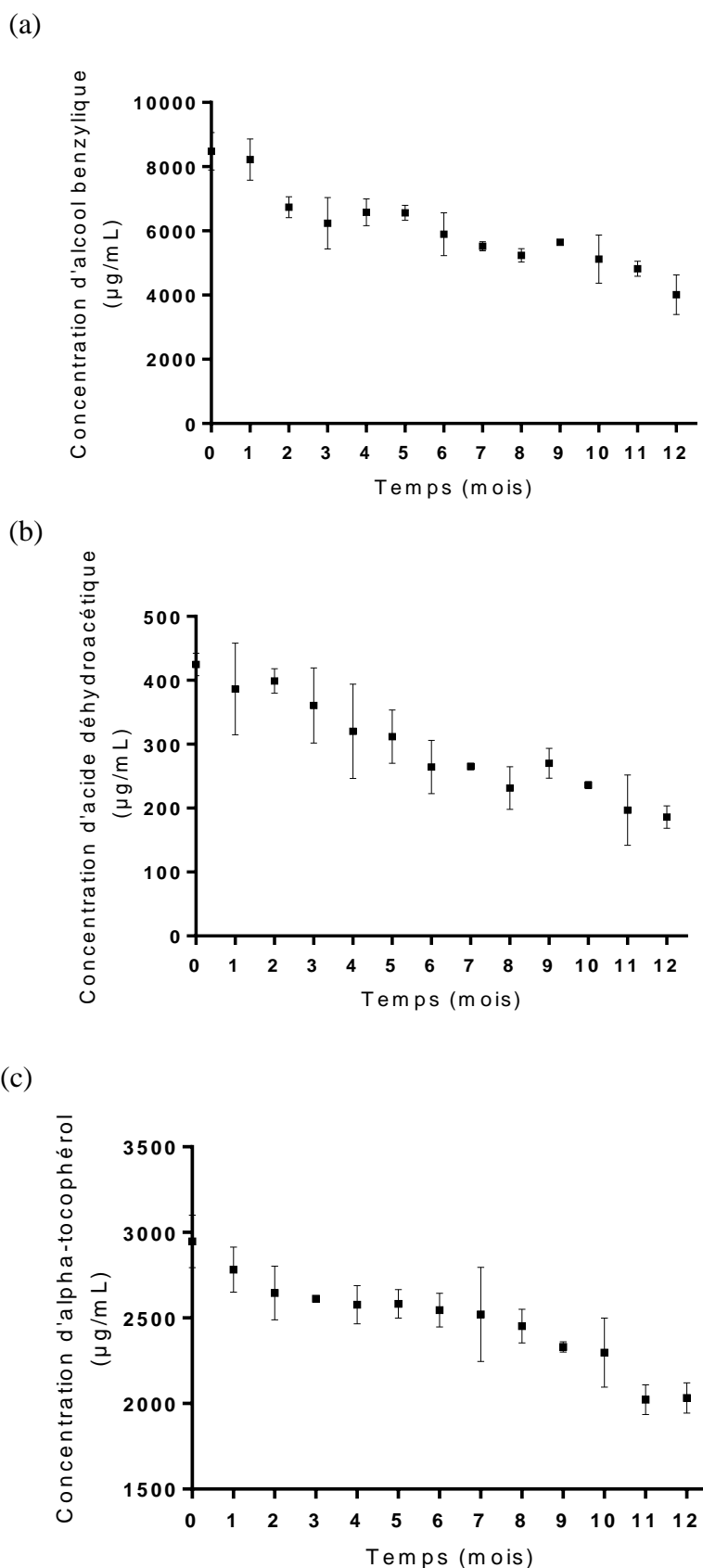
Cette étude de validation a montré la fiabilité de la méthode développée pour le dosage des deux conservateurs et de l'antioxydant de l'émulsion de référence.

#### **IV.6.2 Résultats des dosages de l'acide déhydroacétique, de l'alcool benzylique et de l'alpha-tocophérol dans les différentes conditions de stockage**

##### *IV.6.2.1 Conditions réelles*

La Figure IV-12 représente l'évolution des concentrations des conservateurs (alcool benzylique et acide déhydroacétique) et de l'antioxydant (alpha-tocophérol) contenus dans l'émulsion de référence après stockage en conditions réelles et normalement prévisibles.

La concentration en alcool benzylique diminue au long des 12 mois. La concentration initiale est réduite de 20% après 2 mois et divisée par 2 après 1 an de stockage. La concentration en acide déhydroacétique diminue au long des 12 mois. La concentration initiale est réduite de 20% après 4 mois et divisée par 2,3 après 1 an de stockage. La concentration en alpha-tocophérol diminue au long des 12 mois. La concentration initiale est réduite de 20% après 8 mois et divisée par 1,5 après 1 an de stockage.

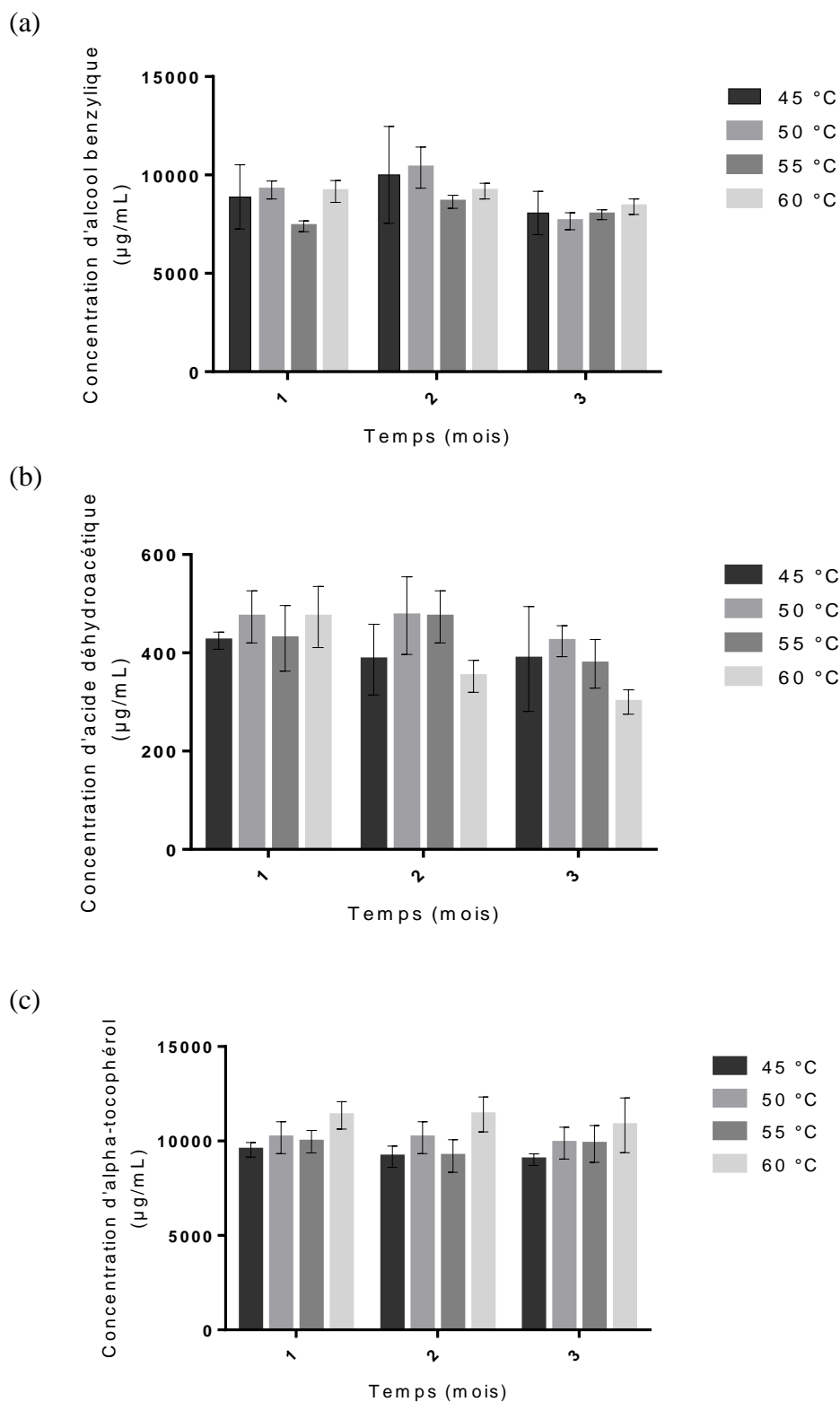


**Figure IV-12 : Concentrations en AB (a), DHA (b) et  $\alpha$ -Toco (c) en  $\mu\text{g/mL}$ , après stockage en conditions réelles et normalement prévisibles de l'émulsion de référence. Les valeurs représentent pour chaque extraction ( $n = 3$ ) la moyenne assortie de l'écart-type à chaque temps de mesure.**

#### *IV.6.2.2 Conditions accélérées*

Les concentrations en alcool benzylique, acide déhydroacétique et alpha-tocophérol dans l'émulsion de référence après stockage en conditions accélérées (45 °C, 50 °C, 55 °C et 60 °C) sont présentées sur la Figure IV-13.

Aucune différence significative de concentration n'est observée après 3 mois de stockage aux températures de 45 °C, 50 °C, 55 °C et 60 °C (tests T de Student ;  $p < 0,05$ ).



**Figure IV-13 : Concentrations en AB (a), DHA (b) et  $\alpha$ -Toco (c) en  $\mu\text{g/mL}$ , après stockage en conditions accélérées de l'émulsion de référence. Les valeurs représentent pour chaque extraction ( $n = 3$ ) la moyenne assortie de l'écart-type à chaque temps de mesure.**



### IV.6.3 Conclusion

Afin d'étudier la stabilité chimique de notre émulsion de référence, une méthode de dosage des 3 principaux ingrédients qui interviennent dans la conservation du produit a été développée, sur la base de données bibliographiques pour l'extraction des composés et de nombreux essais pour l'optimisation de l'analyse par couplage GC-MS. Les résultats analytiques obtenus répondent à tous les critères de validation, ce qui permet de garantir la performance, la fiabilité et la qualité des résultats finaux.

Les résultats obtenus pour l'étude de vieillissement en temps réel montrent une diminution de la concentration initiale des deux conservateurs et de l'antioxydant de l'émulsion de référence.

La température ne semble pas avoir d'effet sur la stabilité chimique de l'alcool benzylique, de l'acide déhydroacétique et de l'alpha-tocophérol. Outre la température, la différence de stockage entre les échantillons stockés dans les conditions réelles et ceux stockés en conditions accélérées (à l'étuve), concerne l'exposition à la lumière. Ce paramètre semble avoir un effet sur la dégradation des composés contenus dans l'émulsion stockée pendant 1 an.

La diminution de la concentration des conservateurs peut conduire à un risque microbiologique susceptible d'entraîner une modification de la formule (augmentation de la charge microbienne, de l'acidité due à la prolifération bactérienne...). Une telle dégradation peut avoir un impact sur la sécurité du consommateur ; dans un premier temps vis-à-vis de l'augmentation de la flore cutanée, dans un second temps vis-à-vis de produits de dégradation potentiellement toxiques.

La diminution de la concentration en alpha-tocophérol peut conduire à une réduction de son efficacité sur la protection des corps gras. Une dégradation organoleptique du produit peut alors se produire avec apparition d'une flaveur caractéristique « rance » qui modifie sa qualité marchande et impacte directement sa durée de vie.

Ces résultats suggèrent la réalisation d'études supplémentaires visant à compléter les suivis organoleptique et physico-chimique, il s'agit de :

- l'étude de la stabilité microbiologique du produit,
- les études de photostabilité des composés,
- l'estimation de la toxicité des photoproduits éventuellement formés.

La première aura pour but de s'assurer de l'efficacité des conservateurs tout au long de la durée de vie du produit. La seconde étude permettra de caractériser, le cas échéant, des mécanismes de dégradation photochimique des molécules d'intérêt. Enfin, l'estimation de la toxicité d'éventuels photoproduits aidera à l'évaluation de la sécurité.



---

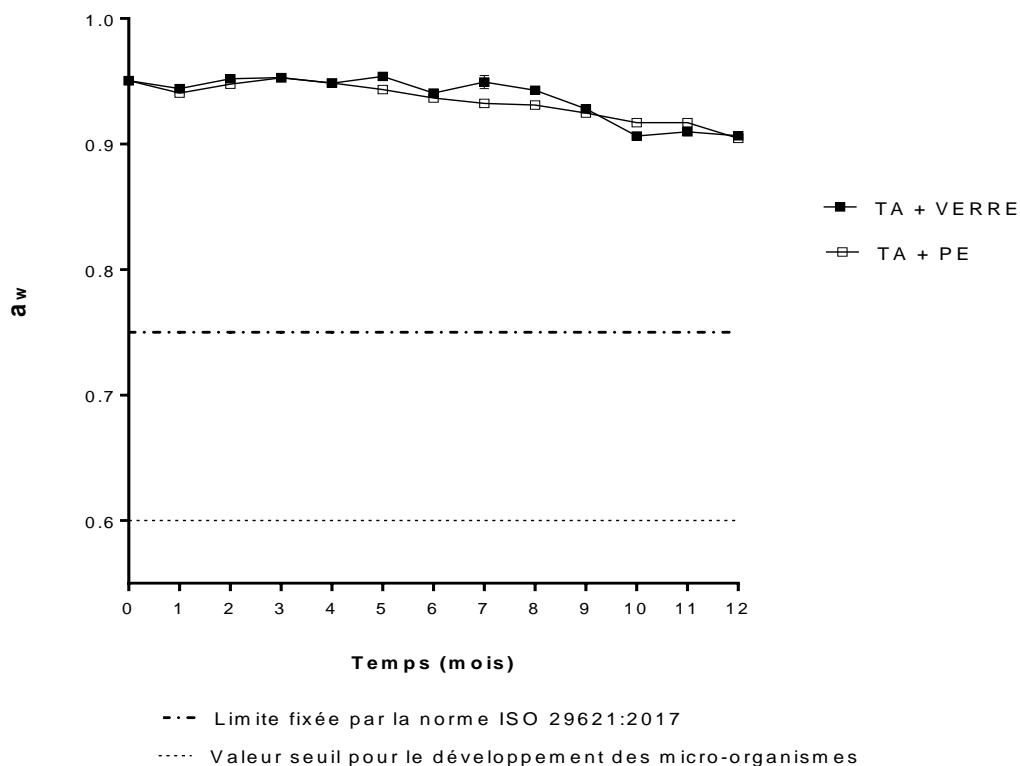
## **CHAPITRE V - Suivi des paramètres microbiologiques**

---

Dans ce chapitre sont présentés les résultats des différents contrôles microbiologiques réalisés sur l'émulsion de référence tout au long des études de vieillissement. La mesure de l'activité de l'eau a permis dans un premier temps de prévoir le comportement de l'émulsion vis-à-vis d'éventuelles contaminations microbiennes. Puis son niveau d'hygiène a été estimé par des dénombrements de germes : bactéries, levures et moisissures mésophiles se développant en aérobiose. Enfin, l'efficacité des conservateurs a été évaluée par des « *challenges tests* ».

## V.1 Mesure de l'activité de l'eau

La Figure V-1 représente l'évolution de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) de l'émulsion de référence après stockage en conditions réelles et raisonnablement prévisibles, dans un contenant en verre ou en polyéthylène. L' $a_w$  mesurée à  $T_0$  est de 0,951. Cette valeur est propice aux développements des bactéries mésophiles aérobies (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*), des levures et des moisissures. Une légère diminution de l' $a_w$  est observée pour l'émulsion stockée pendant 1 an quel que soit le type de contenant. Cependant les valeurs d' $a_w$  après 12 mois de stockage sont respectivement de 0,910 et 0,905 pour les contenants en verre et en polyéthylène. Ces valeurs sont très loin de la limite d' $a_w \leq 0,75$  fixée par la norme ISO 29621:2017 définissant les produits à faible risque microbiologique et de la condition défavorable à la croissance des micro-organismes ;  $a_w < 0,6$ <sup>[37]</sup>.



**Figure V-1 : Activité de l'eau de l'émulsion de référence après stockage à température ambiante (TA) dans un emballage en verre et dans un emballage en polyéthylène (PE). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart type à chacun des temps de mesures.**

Le Tableau V-1 présente les résultats des mesures de l'activité de l'eau de l'émulsion de référence après stockage dans des conditions accélérées. Les échantillons stockés à 45 °C, 50 °C et 55 °C présentent des valeurs d' $a_w$  supérieures à 0,75 et 0,60. Ils ne sont pas considérés « à faible risque microbiologique » et restent favorables au développement bactérien, à la prolifération des levures et des moisissures. Une diminution plus marquée de l' $a_w$  est observée pour les échantillons stockés dans un emballage en polyéthylène, probablement due à la plus forte perméabilité du plastique par rapport au verre. La perméation entraîne la perte d'eau du produit, phénomène mis en évidence par les tests organoleptiques (échantillon évalué comme plus « épais » par le panel (III-3)) et par le suivi de la masse de l'échantillon montrant un %age de perte de poids plus élevé pour les échantillons stockés dans le PE par rapport au verre (IV-3).

Enfin, les échantillons stockés à 60 °C présentent des valeurs d' $a_w < 0,80$  dès le premier mois de stockage, quel que soit le type de contenant. Ceci peut s'expliquer par la perte en eau de l'échantillon dû à l'étape de mélange (augmentation des contacts produit/atmosphère) avant l'incorporation du produit dans la capsule de mesure. Cette étape est nécessaire de façon à rendre le produit plus homogène. Malgré cette étape, l'échantillon reste toujours hétérogène. La formation d'une « barrière » lipidique peut empêcher la migration de l'eau et donc la réalisation d'un équilibre stable dans la chambre de mesure.

**Tableau V-1 : Activité de l'eau de l'émulsion de référence dans des conditions accélérées de stockage**

Température de stockage (°C)	Temps (mois)	$a_w^*$ (emballage verre)	$a_w^*$ (emballage PE)
45	0	0,897	0,897
	1	0,893	0,887
	2	0,847	0,840
	3	0,839	0,826
50	0	0,897	0,897
	1	0,878	0,869
	2	0,843	0,848
	3	0,834	0,820
55	0	0,897	0,897
	1	0,882	0,798
	2	0,864	0,764
	3	0,838	0,753
60	0	0,897	0,897
	1	0,770	0,773
	2	0,788	0,755
	3	0,755	0,742

\*moyenne n = 6

## V.2 Dénombrement des germes totaux

### V.2.1 Méthode de dénombrement des bactéries aérobies totales

#### V.2.1.1 Présentation générale des travaux publiés

Un prérequis indispensable à l'estimation de la PAO est l'analyse et la gestion du risque microbiologique pour tout metteur sur le marché de produits cosmétiques. Afin de garantir la qualité microbiologique de ses produits, le fabricant doit, entre autres, vérifier la propreté microbiologique des produits finis par un DGAT selon la norme ISO 21149:2006 Cosmétiques – Microbiologie – Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles (révisée en 2017). Enfin les résultats de ce contrôle doivent être conformes aux critères d'acceptation prévus par la norme NF EN ISO 17516 Cosmétiques – Microbiologie – Limites microbiologiques.

L'objectif de ce travail a été de valider une méthode alternative au DGAT. La méthode alternative développée par Nissui Pharmaceutical Co. (Tokyo, Japon) est commercialisée sous la forme de kits « *Compact Dry TC* » et présente l'avantage d'être simple, rapide d'utilisation et peu coûteuse. Ces kits présentent de nombreux avantages à l'heure où les metteurs sur le marché, pour faire face aux besoins croissants des consommateurs, cherchent à réduire le temps et les coûts liés à la commercialisation de leurs produits.

Les kits « *Compact Dry TC* » sont des milieux de culture standards contenant un agent gélifiant à froid et un sel de tetrazolium (2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride ou TTC) permettant de révéler les colonies bactériennes viables par coloration. Le TTC incolore est réduit en formazan, rouge, par l'activité des déshydrogénases du métabolisme de la respiration cellulaire des micro-organismes<sup>[70]</sup>.

Les kits « *Compact Dry TC* » ont été validés pour une application agroalimentaire<sup>[31]</sup> mais la validation de cette méthode pour une application cosmétique n'a encore jamais été menée et constituait une étape indispensable pour ces travaux de thèse. Une émulsion H/E a été utilisée pour déterminer la stabilité microbiologique de l'émulsion de référence.

Ces travaux ont été réalisés au LCM pour la manipulation sur kit, et en partenariat avec le laboratoire BioPreserv (Grasse, France) pour la contamination volontaire de l'émulsion et de la réalisation des DGAT selon la méthode normée.



Les paramètres de validation ont été choisis en s'inspirant des protocoles de validation existants pour les applications alimentaires et les eaux potables<sup>[72,52,5]</sup>. A travers 4 séries d'essais (étude comparative, étude de répétabilité, étude de fidélité intermédiaire, et étude de précision), les paramètres de validation qui ont été évalués sont les suivants :

- l'exactitude relative,
- la répétabilité,
- la fidélité intermédiaire,
- la précision.

En comparaison avec l'étude de Kodaka *et al.*, la robustesse et la stabilité du protocole d'exécution des kits n'ont pas été validées<sup>[3]</sup>. En effet, le protocole indiqué par le fournisseur a été suivi et les lots de kits ont été utilisés dans la limite de leur date d'expiration. La limite de détermination donnée par le fournisseur, à savoir 1 - 250 UFC/mL, a également été considérée. Cette étude a conduit à la publication de l'article présenté ci-après, publié en 2016 dans *International Journal of Cosmetic Science*.

# **Comparison of the compact dry TC method with the standard method ISO 21149:2006 for determining aerobic colony counts in cosmetic emulsion**

Ségolène De Vaugelade<sup>1,2</sup>, Magali Aime<sup>1</sup>, Nicolas Farcette<sup>3</sup>, Elodie Maurel<sup>3</sup>, Thierry Lacour<sup>3</sup>,  
Claire Thomas<sup>1</sup>, Stéphane Bouchonnet<sup>2</sup>, Stéphane Pirnay<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup> EXPERTOXY Laboratory, 75011 PARIS, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Moléculaire, École polytechnique, UMR-9168, 91128 Palaiseau Cedex, France

<sup>3</sup> BIOPRESERV, 06130 Grasse, France

\* Corresponding author, e-mail: [expertoxsp@gmail.com](mailto:expertoxsp@gmail.com)

*Int. J. Cosmet. Sci.* **2016**, 39, 17-24.

## **Synopsis**

### **OBJECTIVE**

Compact Dry TC, a rapid method kit for determining aerobic colony counts, has been developed by Nissui Pharmaceutical Co. for food application. These plates are presterilized and contain culture medium, a cold-soluble gelling agent and a colour redox indicator for rapid enumeration. In this study, the alternative method is compared with the standard method ISO 21149:2006 – Cosmetic – Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria, for cosmetic emulsions application.

### **METHODS**

An oil-in-water (o/w) cosmetic emulsion was contaminated with a pool of bacterial strains (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). One millilitre of samples was spread on agar as described in ISO 21149. The colonies were enumerated after 3 days of incubation. At the same time, 1.2 mL samples were spread on Compact Dry TC kits. The kit was incubated at 35 °C - 1 °C for 48 h, and the colonies were enumerated. Accuracy determination was carried out using six replicates at four levels of concentrations (10, 50, 100 and 250 CFU mL<sup>-1</sup>). The repeatability study was carried out using 12 replicates at four levels of concentrations (10, 50, 100 and 250 CFU mL<sup>-1</sup>). Variations relative to the analyst and to the batch of emulsion have been investigated.

### **RESULTS**

The linear correlation coefficients of Compact Dry TC Kit enumeration with standard method ISO 21149:2006 was 0.9999. In comparison study, no apparent differences were noted between the Compact Dry TC kit and the reference method ISO 21149, for the detection level of aerobic microorganisms. Relative accuracy, repeatability and intermediate precision studies were acceptable. In the repeatability study, the Shapiro-Wilk test has confirmed the normally distribution of the twelve assays. No significant variations in Compact Dry TC count results were observed with different analysts and different batches of emulsion.

## **CONCLUSION**

The results showed that the two compared methods 'Compact Dry TC' vs. 'conventional pour plate' performed equally well. Demonstration was achieved that the Compact Dry TC method may constitute a useful alternative tool for rapid enumeration of aerobic mesophilic bacteria in cosmetic emulsions.

**Keywords:** Dry culture media, Rapid detection, Aerobic bacteria, Cosmetics.

## INTRODUCTION

The ability of microorganisms to grow in cosmetic products is well known. Water-based product is an ideal matrix for microbial growth. Microbiological contamination can appear from raw materials, during production and filling, or from the environment when the product is being used. Many parameters such as composition, number and nature of preservatives, manufacturing hygiene, packaging, storage and use influence the product properties [1,2].

According to European Regulation (EU) 1223/2009, the safety of cosmetic products is the full responsibility of the manufacturer. The presence of microorganisms in cosmetics may modify the natural skin flora and generate allergies or dangerous risks of infection in consumers. Besides human health pre-occupation, microbiological contamination may cause chemical changes which alter the product and limit its shelf life. Preventing the growth of microorganisms in the product throughout its life is a real challenge for companies. In practice, several microbiological tests are conducted by manufacturers such as the estimation of water activity ( $a_w$ ) to identify low-risk products, the challenge test (CT) to guarantee preservative system efficiency and the determination/identification of germs [3].

The 21149 Cosmetics ISO – *Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria* provides guidelines for the determination of the total aerobic microbial count (TAMC). This international standard describes a procedure for enumeration and detection of mesophilic aerobic bacteria in cosmetics. Colonies are counted on agar medium after aerobic incubation, and the absence of bacterial growth is checked after enrichment [4].

An alternative method called ‘Compact Dry TC’ has been developed and validated by Nissui Pharmaceutical Co (Tokyo, Japan). The alternative method is a rapid method kit for determining aerobic colony counts in food and overcoming the disadvantages of existing commercial kits [5]. The plates bring many advantages for the manufacturers who have to face a dynamic market and very challenging economic conditions. Compact Dry TC kits are pre-sterilized, ready and easy to use, with a reduced incubation time, a range of detection between 1 and 250 CFU mL<sup>-1</sup> and a 24-month conservation time at room temperature. The medium is rehydrated by inoculating 1 mL diluted sample. The plate is then incubated, and colonies were counted without any additional step.

The aim of this study was to compare the alternative ‘Compact Dry TC’ method with the standard method ISO 21149:2006 for cosmetic emulsion application and for three bacterial

strains. The Compact Dry TC kits have been validated for food application and our objective was to validate a cosmetic application, using an O/W (oil/water) emulsion as a reference matrix.

## MATERIALS AND METHODS

### Raw material

Apricot kernel vegetable oil, glyceryl stearate self-emulsifying, the fragrance (Rosa damascena extract) and citric acid were purchased from AromaZone (Paris, France). Panthenol was purchased from BASF (Levallois-Perret, France). *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France).

### Formulation

Formulations were prepared in a Heidolph RZR 2020 (Schwabach, Germany) stirrer at 10 g. Two batches of O/W emulsion were formulated with the matrices referred as phases 1–3 in Table 1.

**Table 1 : O/W formula**

Phases	Ingredients			Quantities (%)
	(Commercial Name)	INCI name	Supplier	
Phase 1	/	Aqua	Expertox	QSP
Phase 2	Abricot oil	Apricot kernel vegetable oil	Aromazone	23
	Emulsifying wax	Glyceryl stearate SE	BASF	7
Phase 3	Provitamin B5	Panthenol		3
	Rosa Damascena Extract	Parfum	Aromazone	0.9

Both phases 1 and 2 were separately heated at 70 °C. The lipophilic phase (phase 2) was then incorporated into the hydrophilic phase (phase 1) by stirring in a beaker at 63 g for 3 min. The mixture turned white as it became homogeneous. Provitamin B5 was incorporated into the hot

mixture. The beaker was placed in a cold water crystallizer for about 3 min. The mixture thickened. This step was followed by stirring at 10 g until the temperature dropped below 35 °C. The fragrance was added at 25 °C. The emulsion pH was adjusted at 6.7 at room temperature with a solution of citric acid.

### **Stability studies**

The stability was evaluated to control the product before launching the microbiological tests. Formulations were stored in glass jars (30 mL) at 4 °C, 25 °C and 45 °C for up to 15 days. pH, viscosity,  $a_w$  and aspect measurements were evaluated at D0, D7 and D14. The pH was measured with a pH meter 3110 WTW from Thermo Fisher Scientific Brand (Illkirch, France).  $a_w$  was measured with a Novasina LabMaster-Aw® apparatus from Novasina AG (Lachen, Switzerland). The aspect after centrifugation was measured with Rotofix 32A from VWR™ (Fontenay-sous-Bois, France) at 1388 g for 30 min, and the viscosity (precision: 500 cP) was determined by a Brookfield model viscometer with spindle S-69 from VWR™ (Fontenay-sous-Bois, France).

### **Microbiological studies**

#### *Tests kit information [5] [6]*

Compact Dry TC kits were purchased from HyServe (Iffeldorf, Germany). The Compact Dry TC plates are a medium for total viable aerobic bacterial count. It is composed of:

- nutrients such as yeast extract,
- peptone,
- glucose,
- phosphate buffer,
- magnesium chloride,
- a redox indicator: 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC), to reveal viable bacterial colonies by red coloration.

The medium was solidified by algae polysaccharides.

## Apparatus

Enumeration of total aerobic microbiological contamination in a cosmetic sample was realized by counting of colonies on agar medium: TSA (Trypticase Soya Agar) for bacteria purchased from VWR™ and malt agar supplemented with chloramphenicol (0.1g.L<sup>-1</sup>) purchased from VWR™ for moulds and yeasts. An incubator, type BD115 serial 10-21225 from Binder (Tuttlingen, Germany), keeping the temperature at 30 °C ± 2 °C was used for the whole plate count testing method.

## Analysis

### Sample preparation

The initial level of contamination of the sample was evaluated before all experiments according to ISO 21149:2006. The emulsion sample was split into 5 parts in sterile containers. Each fraction was contaminated with a pool of bacterial strains suspension prepared in sterile water (Table 2). A suspension with a know concentration (see Table 3) was added to each fraction so that the added volume represented 1% of the total volume of the fraction.

**Table 2: Bacterial strain references**

Bacterial strain	Reference
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027

**Table 3: Inoculum concentration**

Theoretical inoculum concentration (CFU mL <sup>-1</sup> )	Inoculum concentration as measured on agar plates (CFU mL <sup>-1</sup> )
0	0 (sterile water)
10 <sup>2</sup>	1.03 x 10 <sup>2</sup>
5 x 10 <sup>2</sup>	5.06 x 10 <sup>2</sup>
10 <sup>3</sup>	1.03 x 10 <sup>3</sup>
2.5 x 10 <sup>3</sup>	2.523 x 10 <sup>3</sup>



After inoculation, samples were diluted to 1/10 with sterile water, homogenized and stored at +4 °C during experiments to avoid bacterial growth. Sterile water was used. A homogeneous solution was achieved without surfactant or any emulsifier addition. One millilitre of samples was spread on agar as described in ISO 21149, with replications to permit a statistical study. The colonies were enumerated after 3 days of incubation at 35 °C ± 1 °C. No neutralization was needed in the absence of biocidal protection in the sample tested. At the same time, 1.2 mL samples were spread on Compact Dry TC kits with the same statistic plan. The cap was removed from the plate, and 1.2 mL of solution was injected into the middle of the Compact Dry TC plate. The liquid including bacteria diffused spontaneously; the dried sheet (total medium of 20 cm<sup>2</sup>) was transformed into gel within seconds. The cap was replaced on the plate, and the kit was incubated at 35 °C ± 1 °C for 48 h. Kit rehydration was carried out using 1.2 mL instead of 1.0 mL (supplier recommendation) of the emulsion solution. Because of the high emulsion viscosity, 1 mL was not enough for the total rehydration. The volume of inoculation has been reported to a volume of 1mL for all results.

#### *Comparison study methodology*

The comparison study was carried out according to the ISO 21149:2006 standard devoted to Cosmetic – Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria. Comparison was made on bacterial strains. Yeast and fungi are not considered in our evaluation.

The level of contamination before picking has been controlled. Bacteria, yeast and mould concentrations were <10 CFU mL<sup>-1</sup>. This value has been considered as first level.

Relative accuracy has been achieved by determining the degree of concordance between the results obtained using the Compact Dry TC method and the reference method mentioned above. Means of all differences between the results of the reference method and those of the alternative method were calculated.

### *Microbiological method validation*

Previous validations of the Compact Dry TC method have been carried out for food and drinking water applications [7-10]. They evaluated the robustness of the protocol and kits stability. In this study, the protocol indicated by the supplier has been followed; the kits have been used within the limits of determination given by the producer: from 1 to 250 CFU mL<sup>-1</sup>.

### **Validation parameters**

#### *Accuracy*

The accuracy study was established by the addition of a known incremental quantity of *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 mixture to the emulsion. Accuracy determination was carried out using six replicates at four levels of concentrations (10, 50, 100 and 250 CFU mL<sup>-1</sup>); results are expressed as a percentage.

#### *Repeatability*

Repeatability expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time [8]. In this study, the repeatability has been determined from results of repeated measurements of the same homogenized sample in the same conditions (batch of emulsion, manipulator, laboratory, protocol and environmental conditions). The repeatability study was carried out using 12 replicates at four levels of concentrations (10, 50, 100 and 250 CFU mL<sup>-1</sup>). The normality of the distribution of results has been investigated by the Shapiro-Wilk test. The Shapiro-Wilk test is a powerful normality test that uses a variance analysis technique for detecting the deviation of a sample to normality. A repeatability value was calculated using  $r = 2.8 \cdot S_r$  where the factor 2.8, corresponding to  $2\sqrt{2}$  was obtained from the normal distribution with a confidence interval of 95%.  $r^2$  correlation coefficients were calculated for both methods [8].

The results of each series are displayed by means of box plots.

### *Precision*

Intermediate precision reflects within-laboratories variations. In this study, variations relative to the analyst and to the batch of emulsion have been investigated.

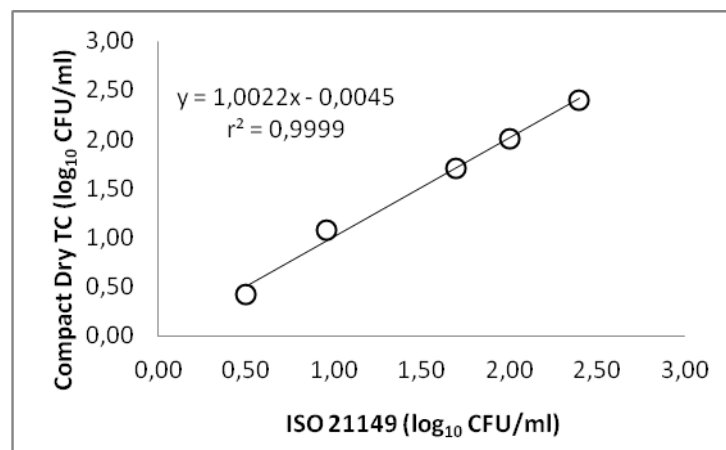
The intermediate precision studies were carried out with six replicates at four levels of concentration (10, 50, 100 and 250 CFU mL<sup>-1</sup>)

## **RESULTS**

### **Accuracy determination**

Means of differences between the results of the reference method and those of the alternative method were calculated and are reported in Table 4. Resulting values should not be significantly different from zero. As shown in Table 4, relative accuracy does not exceed 0.08 at any level of concentration.

The one-way analysis of variance (ANOVA) for data on five levels in emulsion shows equal results ( $P > 0.05$ ) for both methods; the correlation coefficient  $r^2$  is 0.9999 (Fig. 1) for both methods indicating good correlation.



**Figure 1 : Correlation between Compact Dry TC and ISO 21149 results for aerobic bacteria in emulsion**

**Table 4 : Results of ISO 21149 method comparison (emulsion)**

Level CFU mL <sup>-1</sup>	Spike CFU mL <sup>-1</sup>	Replicate	Compact Dry TC aerobic bacteria*		ISO 21149		Relative accuracy
			CFU mL <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup>	CFU mL <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup>	
<10	None	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		4	0.00	0.00	1.00	0.00	0.17
		5	1.67	0.00	2.00	0.30	0.33
		6	0.83	0.22	0.00	0.00	0.00
		Mean	<b>0.42</b>	<b>0.04</b>	<b>0.50</b>	<b>0.05</b>	<b>0.08</b>
		S <sub>D</sub>	<b>0.70</b>	<b>0.09</b>	<b>0.84</b>	<b>0.12</b>	
RSD	<b>167.46</b>	<b>244.95</b>	<b>167.33</b>	<b>244.95</b>			
10	10.00	1	10.00	1.00	9.00	0.95	0.05
		2	9.17	0.96	10.00	1.00	0.04
		3	10.83	1.03	11.00	1.04	0.01
		4	11.67	1.07	9.00	0.95	0.11
		5	8.33	0.92	10.00	1.00	0.08
		6	9.17	0.96	12.00	1.08	0.12
		Mean	<b>9.86</b>	<b>0.99</b>	<b>10.17</b>	<b>1.00</b>	<b>0.07</b>
		S <sub>D</sub>	<b>1.23</b>	<b>0.05</b>	<b>1.17</b>	<b>0.05</b>	
RSD	<b>12.44</b>	<b>5.40</b>	<b>11.50</b>	<b>4.88</b>			
50	50.00	1	50.83	1.71	50.00	1.70	0.01
		2	52.50	1.72	50.00	1.70	0.02
		3	48.33	1.68	51.00	1.71	0.02
		4	49.17	1.69	52.00	1.72	0.02
		5	50.83	1.71	48.00	1.68	0.02
		6	50.00	1.70	47.00	1.67	0.03
		Mean	<b>50.28</b>	<b>1.70</b>	<b>49.67</b>	<b>1.70</b>	<b>0.02</b>
		S <sub>D</sub>	<b>1.46</b>	<b>0.01</b>	<b>1.86</b>	<b>0.02</b>	
RSD	<b>2.90</b>	<b>0.74</b>	<b>3.75</b>	<b>0.97</b>			
100	100.00	1	103.33	2.01	100.00	2.00	0.01
		2	100.83	2.00	101.00	2.00	0.00
		3	98.33	1.99	100.00	2.00	0.01
		4	99.17	2.00	99.00	2.00	0.00
		5	103.33	2.01	98.00	1.99	0.02
		6	97.50	1.99	103.00	2.01	0.02
		Mean	<b>100.42</b>	<b>2.00</b>	<b>100.17</b>	<b>2.00</b>	<b>0.01</b>
		S <sub>D</sub>	<b>2.51</b>	<b>0.01</b>	<b>1.72</b>	<b>0.01</b>	
RSD	<b>2.50</b>	<b>0.54</b>	<b>1.72</b>	<b>0.37</b>			
250	250.00	1	250.00	2.40	258.00	2.41	0.01
		2	252.50	2.40	251.00	2.40	0.00
		3	255.00	2.41	245.00	2.39	0.02
		4	250.00	2.40	248.00	2.39	0.00
		5	248.33	2.40	255.00	2.41	0.01
		6	246.67	2.39	246.00	2.39	0.00
		Mean	<b>250.42</b>	<b>2.40</b>	<b>250.50</b>	<b>2.40</b>	<b>0.01</b>
		S <sub>D</sub>	<b>2.97</b>	<b>0.01</b>	<b>5.17</b>	<b>0.01</b>	
RSD	<b>1.19</b>	<b>0.21</b>	<b>2.06</b>	<b>0.37</b>			

Bold values corresponding to the mean results, standard deviation results, or relative standard results, for the five levels of concentration. \*Rehydration achieved with a volume kit of 1.2 mL; results have been related to a volume of 1 mL.

The percent recovery was calculated from colony-forming unit after addition of a known amount of *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 mixture in emulsion.

Percent mean recoveries are 99%, 100%, 100% and 100% for 10, 50, 100 and 250 CFU mL<sup>-1</sup>, respectively. The results are presented in Table 5.

**Table 5 : Accuracy results**

Level CFU mL <sup>-1</sup>	Replicate	Spike CFU mL <sup>-1</sup>	Amount recovered (CFU mL <sup>-1</sup> )*		% Mean recovery
			CFU mL <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup>	
10	1	10.00	10.00	1.00	99%
	2		9.17	0.96	
	3		10.83	1.03	
	4		11.67	1.07	
	5		8.33	0.92	
	6		9.17	0.96	
50	1	50.00	50.83	1.71	100%
	2		52.50	1.72	
	3		48.33	1.68	
	4		49.17	1.69	
	5		50.83	1.71	
	6		50.00	1.70	
100	1	100.00	103.33	2.01	100%
	2		100.83	2.00	
	3		98.33	1.99	
	4		99.17	2.00	
	5		103.33	2.01	
	6		97.50	1.99	
250	1	250.00	250.00	2.40	100%
	2		252.50	2.40	
	3		255.00	2.41	
	4		250.00	2.40	
	5		248.33	2.40	
	6		246.67	2.39	

\*Rehydration was achieved with a volume kit of 1.2 mL; results have been related to a volume of 1 mL.

## Repeatability determination

### *Shapiro-Wilk test*

The hypothesis (H0) that a sample is derived from a normally distributed population has been tested by the Shapiro-Wilk test; results are presented in Table 6.

**Table 6 : Shapiro-Wilk test results**

Level CFU mL <sup>-1</sup>	Spike CFU mL <sup>-1</sup>	Mean of 12 replicates (Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup> ) *	S <sub>D</sub>	RSD	Shapiro-Wilk test H0: Data are normally distributed HA: Data are not normally distributed			
					W Statistics	p-value	Level of significance	Conclusion
10	10.00	0.994	0.057	5.728	0.93153	0.39662	0.05	<b>Accept</b>
50	50.00	1.699	0.018	1.085	0.89736	0.14665	0.05	<b>Accept</b>
100	100.00	2.002	0.009	0.451	0.91476	0.24538	0.05	<b>Accept</b>
250	250.00	2.398	0.008	0.323	0.97771	0.97285	0.05	<b>Accept</b>

\* Rehydration was achieved with a volume kit of 1.2 ml; results have been related to a volume of 1 mL.

### *Limit of repeatability*

Repeatability standard deviation (Sr), repeatability relative standard deviation (RSDr) and repeatability value ( $r = 2.8 \times Sr$ ) were calculated for each method and are presented in Table 7 [9].

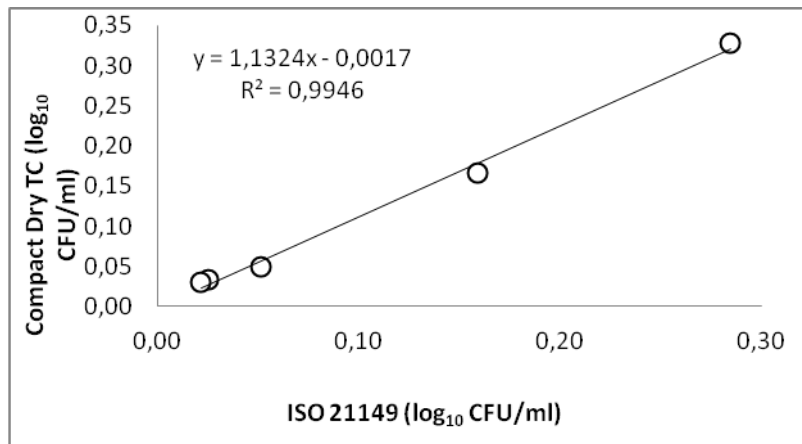
**Table 7 : Results of the repeatability study**

Level CFU mL <sup>-1</sup>	Spike CFU mL <sup>-1</sup>	Compact Dry Tc aerobic bacteria			TVC		
		Mean of 12 replicates (Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup> ) *	Mean Sr <sup>‡</sup>	r	Mean of 12 replicates (Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup> ) *	Mean Sr <sup>‡</sup>	r
10	10.00	0.99	0.06	<b>0.16</b>	1.00	0.06	<b>0.17</b>
50	50.00	1.70	0.02	<b>0.05</b>	1.70	0.02	<b>0.05</b>
100	100.00	2.00	0.01	<b>0.03</b>	2.00	0.01	<b>0.03</b>
250	250.00	2.40	0.01	<b>0.02</b>	2.40	0.01	<b>0.03</b>

\* Rehydration was achieved with a volume kit of 1.2 ml; results have been related to a volume of 1 ml.

‡S<sub>r</sub>: standard deviation of the results obtained in repeatable conditions.

The correlation coefficient  $r^2$  is 0.9946 (Fig. 2) for both methods, indicating good correlation.



**Figure 2 : Correlation between the limits of repeatability of both Compact Dry TC and ISO 21149 methods**

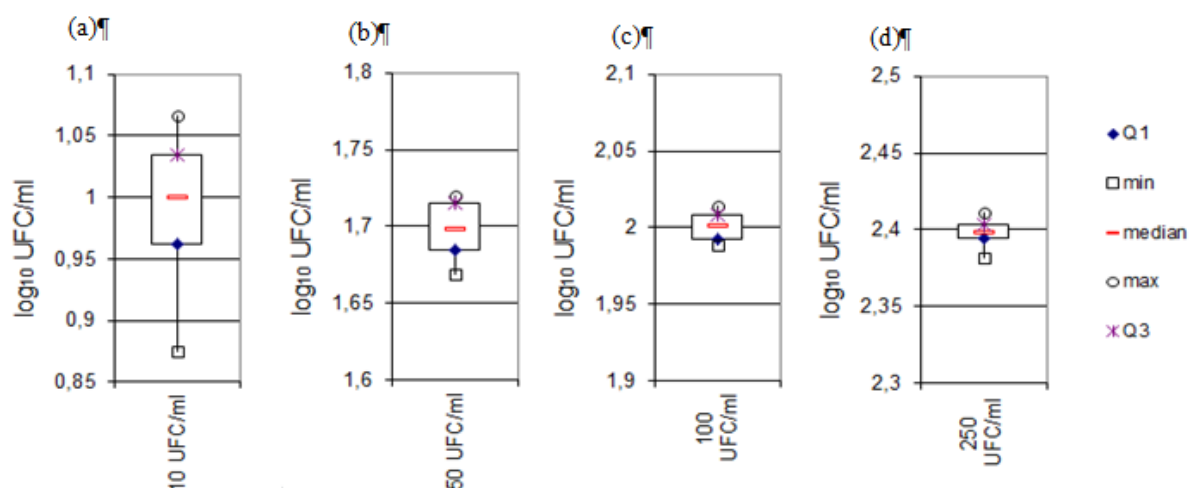
#### *Box plot representation*

Value distributions are displayed in a simplified box plot graphical representation in Fig. 3. Five values are given for each concentration level: minimum, first quartile, median, third quartile and maximum.

Minima of the concentration analysis are 0.875, 1.669, 1.989 and 2.382 for 10, 50, 100 and 250 CFU mL<sup>-1</sup>, respectively.

Maxima of the concentration analysis are 1.067, 1.720, 2.0142 and 2.411 for 10, 50, 100 and 250 CFU mL<sup>-1</sup>, respectively. Lower/upper limits represent the limit beyond which values are considered as outliers. For each concentration, both minimum and maximum values are equal to lower and upper limits, respectively. No outliers were determined.

The first quartile (Q1) is defined as the point between the lowest 25% of values and the highest 75% of values. The third quartile (Q3) is the point between the lowest 75% and highest 25% of values. Q1 and Q3 values converge towards the median when the concentration is increased.



**Figure 3 : Boxplot of the repeatability test results after 12 repetitions of the Kit Compact Dry enumeration. From left to right: a: 10 CFU mL<sup>-1</sup>, b: 50 CFU mL<sup>-1</sup>, c: 100 CFU mL<sup>-1</sup>, d: 250 CFU mL<sup>-1</sup>**

#### *Intermediate precision studies*

The accuracy of the results obtained by two different analysts reveals no significant difference for the Compact Dry TC method (Table 8). The accuracy of the analyst is validated with  $r^2 = 1$  (Fig. 4).

The accuracy of the results obtained with two different emulsion batches reveals no significant difference for the Compact Dry TC method (Table 9). The accuracy of the batches formulated matrix is validated with  $r^2 = 0.9998$  (Fig. 5).

**Table 8 : Intermediate precision study (analyst)**

Level CFU mL <sup>-1</sup>	Spike CFU mL <sup>-1</sup>	Analyst 1			Analyst 2			IP <sup>‡</sup>  Log <sub>10</sub> Manip2- Log <sub>10</sub> Manip1
		Mean of 6 replicates* (Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup> )	S <sub>D</sub>	RSD	Mean of 6 replicates* (Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup> )	S <sub>D</sub>	RSD	
10	10.00	0.99	0.05	5.40	0.98	0.04	4.06	0.01
50	50.00	1.70	0.01	0.74	1.70	0.01	0.57	0
100	100.00	2.00	0.01	0.54	2.00	0.01	0.49	0
250	250.00	2.40	0.01	0.21	2.40	0.01	0.26	0

\* Rehydration achieved with a volume kit of 1.2 mL; results have been related to a volume of 1 mL.

<sup>‡</sup> Intermediate precision.

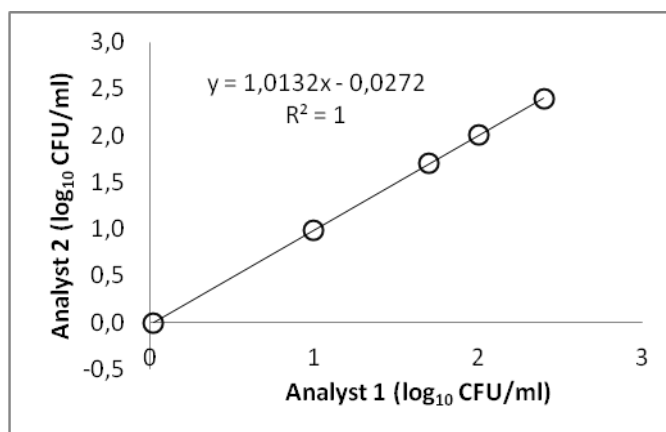


**Table 9 : Intermediate precision study (batch)**

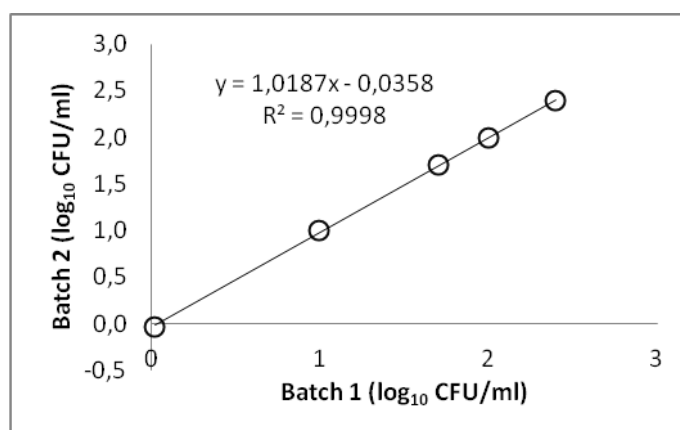
Level CFU mL <sup>-1</sup>	Spike CFU mL <sup>-1</sup>	Batch 1			Batch 2			IP ‡   Log <sub>10</sub> Manip2- Log <sub>10</sub> Manip1
		Mean of 6 replicates* (Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup> )	S <sub>D</sub>	RSD	Mean of 6 replicates* (Log <sub>10</sub> CFU mL <sup>-1</sup> )	S <sub>D</sub>	RSD	
10	10.00	0.99	0.05	5.40	1.00	0.05	5.18	0.01
50	50.00	1.70	0.01	0.74	1.70	0.01	0.74	0
100	100.00	2.00	0.01	0.54	2.00	0.01	0.43	0
250	250.00	2.40	0.01	0.21	2.40	0.01	0.21	0

\*Rehydration was achieved with a volume kit of 1.2 mL; results have been related to a volume of 1 mL.

‡ Intermediate precision.



**Figure 4 : Correlation between analyst 1 and analyst 2 for Compact Dry TC method**



**Figure 5 : Correlation between batch 1 and batch 2 for Compact Dry TC method**

## CONCLUSION

The representative O/W emulsion formulated in our laboratory is a convenient matrix for the microbiological studies as it has been shown to be physically and microbiologically stable at room temperature and at 45 °C for 2 weeks.

No significant differences were noted for the detection level of aerobic microorganisms between the Compact Dry TC kit and the reference method ISO 21149.

For each level of concentration, the relative accuracy was acceptable and the correlation factor showed a strong positive linear relationship ( $r^2 = 0.9999$ ) between both enumeration methods.

The observation of visible red colonies in Compact Dry TC medium in our study's range of concentrations (0 - 250 CFU mL<sup>-1</sup>) confirmed the possible kit rehydration with diluted cosmetic emulsion.

While the manufacturer guidelines recommend an operating volume of 1 mL for the Compact Dry TC method, a 1.2 mL volume was found more adapted for cosmetic emulsions with a viscosity between 120 000 mPa.s and 140 000 mPa.s [5].

In the present work, for oil/water emulsion, sterile water without material addition seemed to be a good diluent. Furthermore, for other galenic forms, particular attention should be paid on diluent to obtain a homogeneous solution. A validation phase of the diluent/neutralizer has to be performed before evaluation to avoid antimicrobial effect of some additional materials.

In the repeatability study, the Shapiro-Wilk test has confirmed the normally distribution of the twelve assays. The limit of repeatability was calculated for each concentration;  $r$  did not exceed 0.17.

For each concentration, no outlier was reported in the box plot representation. Repeatability has been validated.

No significant variations in Compact Dry TC count results were observed with different analysts and different batches of emulsion.

Compact Dry TC kits bring great advantages: reduced preparation time, storage space, incubation time and economical usage. The reading and counting are easier with the TTC indicator. Finally, the long shelf life of the Compact Dry TC plates constitutes an additional benefit compared to ready-prepared agar, which has a limited shelf life.

The results obtained on the comparison of the performance of the Compact Dry TC method with that of the conventional ISO 21149 method for estimation of total aerobic bacteria counts showed that these two methods performed equally well. To consider the total aerobic colony counts, additional evaluations should be performed on fungi and mould. Therefore, the Compact Dry TC plate may be considered as a convenient alternative method for routine microbiological testing of O/W emulsion cosmetic for the numeration and detection of aerobic mesophilic bacteria.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank EBI collaborators, especially Dr. Christine MIELCAREK for the microbiological part. There were neither external funds that were provided to our studies, nor any conflict of interests for all authors.

## REFERENCES

- [1] Lafosse, S. and Pirnay, S. Determination of significant factors in order to access the stability of cosmetic products in regards with the use/or not of challenge tests. *Toxicol. Lett.* **205**, 264–265 (2011).
- [2] Ghalleb, S., De Vaugelade, S., Sella, O., Lavarde, M., Mielcarek, C., Pense-Lheritier, A.M. and Pirnay, S. Predictive microbiology for cosmetics based on physicals, chemicals and concentration parameters. *Int. J. Cosmet. Sci.* **36**, 54–61 (2014).
- [3] European Commission. Regulation No 1223/2009 of the European parliament and of the council on cosmetic products (2009).
- [4] ISO 22149:2006 Cosmetics – Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria. 1st ed. 2006-03-01.
- [5] Kodaka, H., Mizuochi, S., Teramura, H. and Nirazuka, T. Comparison of the Compact Dry TC method with the standard pour plate method (AOAC Official Method 966.23) for determining aerobic colony count in food samples. *J. AOAC Int.* **88**, 1702 (2005).
- [6] Moussa, S.H., Tayel, A.A., Al-Hassan, A.A. and Farouk, A. Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *J. Mycol.* **2013**, 1–7 (2013).
- [7] Aycicek, H., Oguz, U. and Karci, K. Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **209**, 197–201 (2006).
- [8] Ellis, P. and Meldrum, R. Comparison of the Compact Dry TC and 3M Petrifilm ACP dry sheet media methods with the spiral plate method for the examination of randomly selected foods for aerobic colony counts. *J. Food Prot.* **65**, 423–425 (2002).
- [9] SAS: Swiss Accreditation Service. Guide for validation of microbiological test methods and evaluation of their uncertainty of measurement in the fields of food microbiology and environment, Revision No. 328, mars 03 2013.
- [10] AFNOR. Validation of analytical methods, application to the microbiology of water. Validation protocol a commercial alternative method compared to a reference method, Revision No. 2, adopted by AFNOR Certification, may 17 2013, NF148.

### V.2.1.2 Synthèse des travaux publiés

L'observation de colonies rouges sur le milieu de culture dans la plage de concentrations de la présente étude (0 à 250 UFC/mL) a confirmé la possibilité de réhydrater le kit avec une émulsion cosmétique diluée. Pour une émulsion huile/eau, l'eau stérile sans addition d'agent émulsifiant semble être un bon diluant. Cependant, alors que les recommandations du fabricant recommandent un volume opératoire de 1 mL pour la méthode « *Compact Dry TC* », un volume de 1,2 mL a été trouvé plus adapté aux émulsions cosmétiques ayant une viscosité comprise entre 120 000 mPa.s et 140 000 mPa.s.

Les données issues de l'étude comparative ont permis de calculer l'exactitude relative de la méthode alternative « *Compact Dry TC* » par rapport à la méthode de référence ISO 21149. L'exactitude des réponses obtenues ne révèle aucune différence significative pour la méthode « *Compact Dry TC* » et pour la méthode de référence. L'exactitude de chaque méthode par rapport à la force théorique de l'inoculum de départ est validée. Les pourcentages de récupération moyens sont de 99%, 100%, 100% et 100%; pour 10, 50, 100 et 250 UFC/mL, respectivement. L'exactitude relative de la méthode « *Compact Dry TC* » par rapport à la méthode de référence ISO 21149 est également validée ( $r^2 = 0,9999$ ).

Le traitement des résultats de l'étude de répétabilité montre que la manipulation des kits « *Compact Dry TC* » est répétable aux niveaux de concentrations testés. En effet, la représentation des distributions de valeurs (*Boxplot*) n'a montré aucune valeur aberrante pour chaque point de la gamme de concentrations en micro-organismes. Des résultats similaires ont été trouvés pour la méthode de référence, prouvant ainsi la bonne répétabilité de chacune des deux méthodes de dénombrement.

Le calcul de l'exactitude des réponses obtenues en faisant varier le paramètre « opérateur » ne révèle aucune différence significative pour la méthode « *Compact Dry TC* ». La fidélité intermédiaire de la méthode est donc validée ( $r^2 = 0,993$ ). Des résultats similaires ont été obtenus pour la méthode de référence ( $r^2 = 0,999$ ).

Le calcul de l'exactitude des réponses obtenues en faisant varier le paramètre « lot d'émulsion » ne révèle aucune différence significative pour la méthode « *Compact Dry TC* ». La précision des lots de matrice formulée est donc validée ( $r^2 = 1$ ). Des résultats similaires ont été obtenus pour la méthode de référence ( $r^2 = 1$ ).

Cette étude a permis de valider les paramètres exactitude, exactitude relative, répétabilité, et fidélité intermédiaire pour les kits « *Compact Dry TC* » pour une application cosmétique.

Pour tenir compte du nombre total de colonies aérobies, des évaluations supplémentaires devront être effectuées sur les champignons et les moisissures.

Le kit « *Compact Dry TC* » peut être considéré comme pertinent pour la numération et la détection des bactéries mésophiles aérobies ; il constitue une méthode alternative pratique pour les tests microbiologiques de routine sur émulsion cosmétique H/E. Il a permis des mesures de stabilité microbiologique tout au long des études menées dans le cadre de cette thèse, en temps réel et en conditions accélérées.

### V.2.2 Résultats des dénombrements de bactéries aérobies totales et de germes totaux

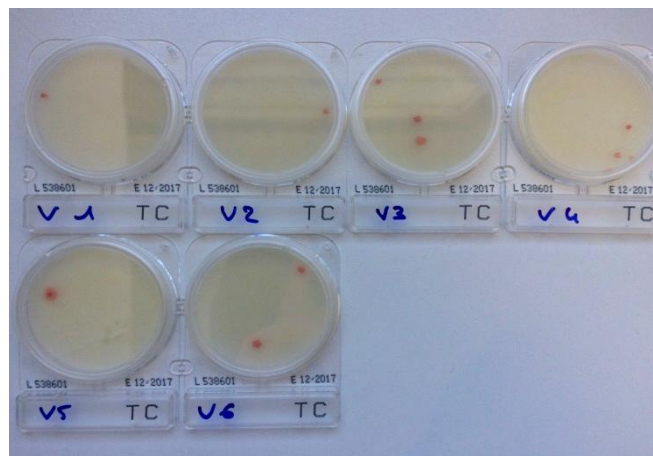
Le Tableau V-2 présente les résultats des dénombrements des bactéries mésophiles aérobies (BMA) réalisés sur l'émulsion de référence après stockage en conditions réelles et raisonnablement prévisibles dans un contenant en verre et un contenant en polyéthylène. Les dénombrements de germes totaux réalisés avant chaque « *challenge test* » sont également rapportés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau V-2 : Résultats des dénombrements de bactéries aérobies totales et de germes totaux**

Dates des mesures	Dénombrement des BMA par la méthode « <i>Compact Dry TC</i> »* (UFC/mL)	Dénombrement des germes totaux par la méthode ISO 11930 (UFC/mL)
T0	< 1	< 10
1 - 5 mois	< 1	/
6 mois	< 1	/
7 - 10 mois	< 1	/
10 et 11 mois	< 1,8	/
12 mois ouvert	< 1,5	< 10
12 mois non ouvert	< 1,5	< 10

\* n = 6, contenant verre et PE

Les premières colonies apparaissent après le dixième mois de stockage. Un exemple de croissance de colonies sur kits « *Compact Dry TC* » pour le dénombrement de BMA pour l'émulsion contenue dans du verre après 10 mois de stockage est illustré en Figure V-2.



**Figure V-2: Observation de colonies de BMA sur kits « *Compact Dry TC* » (échantillon stocké 10 mois, emballage en verre)**

Malgré l'observation de quelques colonies à partir du dixième mois de stockage, les résultats issus du dénombrement des BMA et des germes totaux sont inférieurs aux limites fixées par la norme ISO 17516, limites présentées dans le Tableau V-3.

**Tableau V-3 : Limites fixées par la norme ISO 17516**

Catégorie de produit	Flore mésophile aérobie totale
catégorie 1*	$\leq 10^2$ UFC / g (ou mL)
catégorie 2	$\leq 10^3$ UFC / g (ou mL)

\* produits destinés aux enfants de moins de 3 ans ou en contact avec les yeux et les muqueuses, recommandations du CSSC

L'ensemble des dénombrements effectués sur kit de l'émulsion de référence stockée dans les conditions de vieillissement accélérées (45 °C, 50 °C, 55 °C et 60 °C, pendant 3 mois) n'ont montré aucune croissance de BMA. Enfin, les dénombrements de germes totaux réalisés par Labexan (Cognac, France) après 3 mois de stockage sont inférieurs aux limites fixées par la norme ISO 17516.

### V.2.3 Résultats des « challenge tests »

Pour chaque temps (T<sub>0</sub>, T + 7 jours, T + 14 jours et T + 28 jours) et chaque souche (bactérie, levure et moisissure), le taux de réduction logarithmique est calculé et comparé aux valeurs minimales requises pour les critères d'évaluation A ou B. Les conservateurs sont considérés comme efficaces s'ils suivent les critères A ou les critères B. Les critères représentant la capacité de protection d'une formulation cosmétique sont les suivants :

- **critères A** : la formulation est protégée contre la prolifération microbienne pouvant présenter un risque potentiel pour l'utilisateur et aucun autre facteur n'est pris en compte ;
- **critères B** : le niveau de protection est acceptable si l'analyse du risque démontre l'existence de facteurs de maîtrise non liés à la formulation, indiquant que le risque microbiologique est acceptable pour le produit cosmétique.

Le Tableau V-4 présente le détail des résultats du « challenge test » réalisé au temps T<sub>0</sub>. Le Tableau V-5 présente les conclusions des challenges tests réalisés sur les échantillons soumis aux différentes conditions de vieillissement.

**Tableau V-4 : Résultats du « challenge test » réalisé sur l'émulsion de référence à T<sub>0</sub>**

Germes		T = 0 calculé	T = 7 jours	T = 14 jours	T = 28 jours
<b>Bactéries</b> Critères (red log)	<b>A</b>		≥ 3	≥ 3 et Pa	≥ 3 et Pa
	<b>B</b>		-	≥ 3	≥ 3 et Pa
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	UFC/g <b>red log</b>	4,6 E+05	< 25 > <b>4,3</b>	< 25 > <b>4,3</b>	< 25 > <b>4,3</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	UFC/g <b>red log</b>	4,8 E+05	< 25 > <b>4,3</b>	< 25 > <b>4,3</b>	< 25 > <b>4,3</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	UFC/g <b>red log</b>	3,1 E+05	< 25 > <b>4,1</b>	< 25 > <b>4,1</b>	< 25 > <b>4,1</b>
<b>Levures</b> Critères (red log)	<b>A</b>		≥ 1	≥ 1 et PA	≥ 1 et Pa
	<b>B</b>		-	≥ 1	≥ 1 et Pa
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	UFC/g <b>red log</b>	5,3 E+04	< 25 > <b>3,3</b>	< 25 > <b>3,3</b>	< 25 > <b>3,3</b>
<b>Moisissures</b> Critères (red log)	<b>A</b>		-	≥ 0	≥ 1 et Pa
	<b>B</b>		-	≥ 0	≥ 0 et Pa
<i>Aspergillus Brasiliensis</i> ATCC 16404	UFC/g <b>red log</b>	4,7 E+04	-	< 25 > <b>3,3</b>	< 25 > <b>3,3</b>

Pa : Pas d'augmentation par rapport au temps précédent  
 0 : Pas d'augmentation par rapport au temps initial  
 Dans cet essai, une plage d'écart de 0,5 log est acceptable.



**Tableau V-5 : Résultats des « challenges tests » réalisés sur les échantillons soumis aux différentes conditions de stockage**

<b>Echantillon (dates et conditions)</b>	<b>Conclusion « challenge test »</b>	<b>Interprétation</b>
T0	Conforme aux critères A	Risque microbiologique maîtrisé
12 mois ouvert	Conforme aux critères A	
12 mois non ouvert	Conforme aux critères A	
3 mois 45 °C	Conforme aux critères B	Risque microbiologique maîtrisé sous réserve d'éléments de maîtrise supplémentaires (ex : emballage de type <i>airless</i> )
3 mois 50 °C	Conforme aux critères B	
3 mois 55 °C	Conforme aux critères B	
3 mois 60 °C	Conforme aux critères A	Risque microbiologique maîtrisé

Les conclusions des « challenges tests » réalisés sur les échantillons soumis aux conditions normales de vieillissement (température ambiante, 12 mois, ouvert et température ambiante, 12 mois, non ouvert) et à la condition accélérée 60 °C pendant 3 mois, sont tous conformes aux critères A. Les échantillons 3 mois 45 °C, 3 mois 50 °C et 3 mois 55 °C satisfont aux exigences des critères B. La réduction logarithmique de la population bactérienne *Staphylococcus aureus* à T = 7 jours est inférieure à 3 et ne permet pas de répondre au critère A pour ce temps de mesure.

#### **V.2.4 Conclusion du suivi des paramètres microbiologiques**

La composition de l'émulsion de référence et sa forte teneur en eau en font un milieu favorable au développement des micro-organismes ; les résultats des mesures d'activité de l'eau ont montré que cela reste vrai après 1 an de stockage dans des conditions normales d'utilisation. De ce fait, il est justifiable de contrôler l'hygiène du produit pendant l'étude de stabilité, d'autant plus lorsqu'une diminution de la concentration en conservateurs a été montrée.

Les résultats des dénombrements de bactéries aérobies totales et de germes totaux ont montré que l'émulsion peut être considérée comme microbiologiquement propre tout au long de l'étude de stabilité en temps réel et en conditions accélérées, quel que soit le type de contenant. L'échantillon soumis à une ouverture régulière (contact avec l'air ambiant) n'a également pas été contaminé. Les conservateurs semblent être efficaces jusqu'à 1 an dans les conditions réelles de stockage malgré les diminutions de leurs concentrations, diminutions rapportées dans l'étude de dosage des actifs de l'émulsion (se reporter au paragraphe IV.6.2).

L'étude de l'efficacité de la conservation antimicrobienne, selon la norme NF EN ISO 11930, a donné des résultats conformes à 28 jours aux critères A pour les échantillons soumis aux conditions normales de vieillissement. Ces résultats confirment l'hypothèse précédemment émise selon laquelle la diminution en concentration des conservateurs n'altère pas l'efficacité de ces derniers vis-à-vis des micro-organismes susceptibles de contaminer le produit. Une autre hypothèse serait que les produits formés suite à la dégradation des conservateurs possèdent une activité antimicrobienne, empêchant à leur tour la prolifération des micro-organismes.

La non-conformité des échantillons soumis aux températures 45 °C, 50 °C et 55 °C aux critères A (persistance des *Staphylococcus aureus* à T = 7 jours) pourrait être due à la dégradation d'autres matières premières de la formule, sensibles aux températures élevées et pouvant avoir des propriétés antibactériennes (ex : acide citrique). Leur possible dégradation sous l'effet de la température peut altérer l'efficacité de la formule à répondre aux exigences d'un profil A. La différence avec l'échantillon 3 mois 60 °C peut être due aux possibles activités antimicrobiennes des produits de dégradation présents en plus forte concentration dans l'échantillon à 60 °C. Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant de suivre les matières premières, autres que les conservateurs, susceptibles de jouer un rôle dans la protection antimicrobienne de la formule. Il serait ensuite pertinent de caractériser les produits de dégradation, de les isoler et d'évaluer leurs activités antimicrobiennes.



---

**CHAPITRE VI - Dégradation sous irradiation UV-visible de l' $\alpha$ -tocophérol dans un système modèle et dans une émulsion cosmétique - Elucidation structurale des photoproduits et conséquences toxicologiques**

---



## Présentation générale des travaux publiés

La vitamine E est une vitamine liposoluble constituée d'un mélange de huit composés phénoliques, dont quatre tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) et quatre tocotriénols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Les tocophérols sont constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale isoprénoïde saturée à 16 atomes de carbone. Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale. L'alpha-tocophérol est la forme la plus abondante et la plus biologiquement active de ces composés, qui peut être trouvée en quantité significative dans les céréales, les légumes, les graines, les fruits et dans leurs huiles respectives. Ses fonctions principales sont de prévenir la peroxydation des membranes phospholipidiques et d'éviter la détérioration des membranes cellulaires grâce à son pouvoir antioxydant.

Son rôle important dans la prévention et la propagation des dommages oxydants, fait de l'alpha-tocophérol un ingrédient clé des produits riches en acides gras polyinsaturés (corps gras alimentaires, cosmétiques...). Ces derniers, susceptibles de subir des modifications organoleptiques (apparition d'un goût ou d'une odeur rance, acidification, modification de la couleur avec apparition de brunissements, etc.) sont protégés par l'utilisation d'antioxydants. Ainsi, l'alpha-tocophérol est largement utilisé comme additif dans les formulations pharmaceutiques et cosmétiques, particulièrement les préparations topiques, les préparations liquides orales ou les émulsions. La vitamine E est également souvent incluse dans les crèmes cosmétiques pour améliorer la cicatrisation de la peau.

Un grand nombre de vitamines sont connues pour se dégrader par des réactions photo-induites dans la gamme des longueurs d'onde UV. La lumière du jour pourrait ainsi être destructrice pour les vitamines. La photo-oxydation de la vitamine E dans des systèmes modèles et dans certaines huiles a déjà été rapportée dans la littérature mais une attention limitée a été accordée à l'élucidation structurale et à la toxicité des photoproduits formés (voir l'article à suivre).

L'objectif principal de ce travail était l'étude du comportement de l'alpha-tocophérol sous irradiation UV-visible. Il s'agissait de caractériser les structures des photoproduits formés et de tenter d'établir les mécanismes impliqués dans les processus de phototransformation. Du fait de la très faible solubilité de l'alpha-tocophérol dans l'eau ( $1,9 \times 10^{-6}$  mg/L à 25 °C), les

solutions destinées à l'identification des photoproduits ont été préparées dans l'acétonitrile. Afin d'étudier le rôle de l'oxygène dissous dans le processus de photolyse, une solution dégazée d'alpha-tocophérol a également été préparée. La photolyse a été menée avec une enceinte de vieillissement accélérée équipée d'une lampe à arc xénon et d'un filtre « lumière naturelle ». Les solutions ont été analysées par des méthodes de chromatographie en phase gazeuse et en phase liquide couplées à la spectrométrie de masse. Dans un premier temps, une étude cinétique de la photodégradation a été effectuée afin de déterminer le temps de photolyse optimal pour la détection des photoproduits ainsi que pour établir d'éventuelles filiations entre ces derniers. La caractérisation structurale des photoproduits a été réalisée grâce à la spectrométrie de masse en tandem (LC-HR-MS/MS et GC-MS/MS) et à l'interprétation des déplacements isotopiques observés suite à l'irradiation de l'analogue deutéré de l'alpha-tocophérol.

Les toxicités potentielles des photoproduits ont été évaluées *in silico* grâce à un logiciel basé sur l'approche QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship). En complément, des tests *in vitro* sur la bactérie marine *Vibrio Fischeri* ont permis de suivre l'évolution de la toxicité des solutions en fonction du temps d'irradiation.

Enfin, les photoproduits ont été caractérisés dans une matrice cosmétique (émulsion huile/eau) pour valider la pertinence du système modèle utilisé pour l'étude de la phototransformation.

# **UV-visible degradation of $\alpha$ -tocopherol in a model system and in a cosmetic emulsion - Structural elucidation of photoproducts and toxicological consequences**

Ségolène De Vaugelade<sup>1,2</sup>, Edith Nicol<sup>1</sup>, Svetlana Vujovic<sup>1</sup>, Sophie Bourcier<sup>1</sup>, Stéphane Pirnay<sup>2</sup>, Stéphane Bouchonnet<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Moléculaire, École polytechnique, UMR-9168, 91128 Palaiseau Cedex, France

<sup>2</sup> EXPERTOX Laboratory, 75011 PARIS, France

\* Corresponding author, e-mail: [stephane.bouchonnet@polytechnique.edu](mailto:stephane.bouchonnet@polytechnique.edu)

*Journal of Chromatography A* **2017**, 1517, 126-133.



## Abstract

The UV-vis photodegradation of  $\alpha$ -tocopherol was investigated in a model system and in a cosmetic emulsion. Both gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and high performance liquid chromatography coupled with ultrahigh resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (LC-UHR-MS) were used for photoproducts structural identification. Nine photoproduct families were detected and identified based on their mass spectra and additional experiments with  $\alpha$ -tocopherol- $d_9$ ; phototransformation mechanisms were postulated to rationalize their formation under irradiation. *In silico* QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) toxicity predictions were conducted with the Toxicity Estimation Software Tool (T.E.S.T.). Low oral rat LD50 values of 466.78 mg.kg<sup>-1</sup> and 467.9 mg.kg<sup>-1</sup> were predicted for some photoproducts, indicating a potential toxicity more than 10 times greater than that of  $\alpha$ -tocopherol (5742.54 mg.kg<sup>-1</sup>). *In vitro* assays on *Vibrio fischeri* bacteria showed that the global ecotoxicity of the  $\alpha$ -tocopherol solution significantly increases with irradiation time. One identified product should contribute to this ecotoxicity enhancement since *in silico* estimations for *D. magna* provide a LC50 value 4 times lower than that of the parent molecule.

## VI.1 INTRODUCTION

Vitamin E is a well-known fat-soluble organic compound with high antioxidative properties, which protects against lipid peroxidation [1]. Vitamin E is a mixture of eight phenolic compounds, including four tocopherols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) and four tocotrienols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) [2]. They all include an amphiphilic structure containing a hydrophobic isoprenoid side chain and a hydrophilic chromanol ring [3]. All vegetables contain tocopherols; significant amounts are especially found in wheat, rice, corn and other seed germs, lettuce, soya and cottonseed oil [1]. On a biological point of view, the most active component of vitamin E is  $\alpha$ -tocopherol [4], which is capable of capturing free radicals and quenching lipid peroxidation chain reactions.  $\alpha$ -Tocopherol is a colorless to brown yellow, viscous oil that is insoluble in water. Because of its antioxidant activity, it is widely used as oil preservative and in pharmaceutical and cosmetic formulations like topical preparation, oral liquid preparation or emulsion, to prevent them from becoming rancid [1]. Vitamin E is often included in cosmetic skin creams and lotions to improve skin healing and reduce scarring. The toxicity of UV-visible light-induced compounds with environmental issues have been investigated intensely and is still widely studied today. A large number of vitamins are known to degrade through reactions photo-induced in the UV wavelength range [5,6]. This suggests that daylight could be highly destructive while artificial light has minimal influence on photosensitive vitamins because it normally provides negligible irradiation in the UV range [7]. Several kinds of mechanisms may be responsible for the photodegradation of vitamins. The photo-oxydation of Vitamin E in model systems and typical oil has been already reported but limited attention has been paid to structural elucidation and toxicity of photoproducts [8-16]. Psomiadou and Tsimidou reported pseudo-first order kinetics for  $\alpha$ -tocopherol degradation in olive oil under fluorescent light [8-9]. First order kinetics were also described by Sabliov *et al.* as they studied the effects of temperature and UV light on the degradation of  $\alpha$ -tocopherol in methanol and hexane [10]. Pirisi *et al.* showed that a solution of olive oil in hexane degraded with a rate constant ( $k$ ) of  $1.86 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  and a half-life of 112 min when irradiated with artificial light, and with a rate constant ( $k$ ) of  $1.03 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  and a half-life of 62 min when irradiated with sunlight [11]. The photolysis in liposomes by UVB rays was reported by Kramer and Liebler [12] T. Miyazawa *et al.* reported a chemiluminescent product of  $\alpha$ -tocopherol in methanol with methylene blue as photosensitizer [13]. G. W. Grams *et al.* have shown that  $\alpha$ -tocopherol is susceptible to

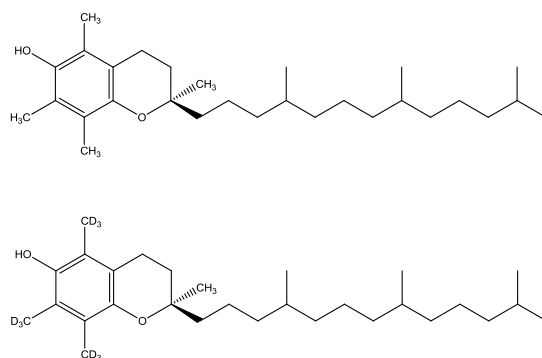
photooxidation in the presence of a dye sensitizer and that this oxidation in methanol leads to several compounds [14]. In an other study by Zhang *et al.*, irradiation of  $\alpha$ -tocopherol in acetonitrile led to the formation of the corresponding radical and cationic forms whereas only the radical species was observed after irradiation in methanol [15]. Finally, a study investigated the mechanisms of dimer and trimer formation from UVB-irradiated  $\alpha$ -tocopherol [16].

The main objective of the present work was to characterize the photoproducts issued from direct photolysis of  $\alpha$ -tocopherol. Solutions in acetonitrile were irradiated and analysed by liquid-chromatography coupled with ultrahigh resolution tandem mass spectrometry (LC-UHR-MS/MS) and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Twenty-seven photoproducts were detected. Ultra-high resolution measurements permitted direct assignement of exact formulae while tandem experiments allowed structural elucidation for the major part of photoproducts. The second aim of this work was to analyse a personal care emulsion initially containing  $\alpha$ -tocopherol as antioxydant, in order to investigate the presence of the photoproducts previously characterized in the model system. Finally, the potential toxicity of photoproducts was investigated *in silico* using QSAR calculations and *in vitro* using luminescence inhibition tests on *Vibrio fischeri* marine bacteria.

## VI.2 EXPERIMENTAL

### VI.2.1 Chemicals and reagents

DL- $\alpha$ -tocopherol (99.9% purity) was purchased from VWR (Fontenay sous Bois, France).  $\alpha$ -tocopherol- $d_9$  (hydrogen atoms of methyl groups attached to the benzene ring are replaced by deuterium atoms, see Figure 1), 99% purity) was purchased from Avivagen Inc. (Chemaphor Service, Ottawa, Canada). Chromatographic grade solvents (99.99% purity), acetonitrile (ACN) and formic acid (FA), were purchased from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). A personal care emulsion containing 3000 mg.L<sup>-1</sup> of  $\alpha$ -tocopherol as antioxidant agent was obtained from the cosmetic formulation laboratory Onyligne (La Neuville en Hez, France).



**Figure 1 : Chemical structures of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopherol- $d_9$**

### **VI.2.2 Sample preparation**

Considering the poor water solubility of  $\alpha$ -tocopherol in water ( $1.9 \times 10^{-6}$  mg.L<sup>-1</sup> at 25 °C),  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopherol- $d_9$  solutions at 200 mg.L<sup>-1</sup> were prepared in acetonitrile in quartz tubes (2 mL), the solution was irradiated as soon as it was prepared. For the study devoted to the role played by dissolved oxygen in the photolysis process, a degassed solution was prepared in an inert atmosphere glove box (Vacuum Atmospheres Corps.). Argon was used as the inert gas. Pure  $\alpha$ -tocopherol standard was kept under argon 24 h before preparation. O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O concentrations were less than 2 ppm. Air and water free acetonitrile was used for preparation. The quartz tube was filled and hermetically closed in a glove box before photolysis.

### **VI.2.3 Sample extraction**

The extraction process for cream samples of  $\alpha$ -tocopherol and its photoproducts was conducted as follows: 1 g of the cosmetic emulsion was weighed into a plastic falcon tube, 10 mL of acetonitrile were added and the mixture was vortexed and immersed for 30 minutes in an ultrasonic bath heated at 60 °C to melt the lipidic phase and to facilitate the extraction of active components into acetonitrile. The tube was then centrifuged for 20 minutes at 3000 rpm. The supernatant was filtered using a 0.45  $\mu$ m syringe filter (VWR, Fontenay sous Bois, France) before GC/MS and LC-MS analysis.

#### VI.2.4 Photolysis experiments

Photolysis tests simulating UV-visible ray irradiation were carried out with a Q-SUN test chamber (Xe-1-B/S, Q-Lab Saarbücken, Germany) equipped with a xenon arc lamp (X-7640, Q-Lab Saarbücken, Germany). A natural light filter (X-7640, Q-Lab Saarbücken, Germany) has been used for a realistic reproduction of the full sunlight spectrum. The lamp power was 1800 W and the irradiation  $0.68 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  at a black-standard temperature of  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Irradiation control was maintained between 300–800 nm. For each experiment, 2 mL of a solution of  $\alpha$ -tocopherol (see above) were used. To follow the evolution of photoproducts, experiments were carried out with 6 irradiation times ranging from 0 to 120 min: 0, 5, 10, 20, 30, 60 and 120 min.

#### VI.2.5 GC–MS operating conditions

Analyses of standard and irradiated solutions were performed on a Varian® CP-3800 gas chromatograph equipped with a CP8400 autosampler and coupled with a Varian® Saturn 2000 mass spectrometer operated in the internal ionization mode. A CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS capillary column, stationary phase composed of 5% diphenylsiloxane and 95% dimethylsiloxane (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness; Agilent, Waghäusel, Germany) was used. 1  $\mu\text{L}$  of sample was automatically injected at  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ , in the splitless mode at a rate of  $8 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ , with opening of the split valve after 1.5 minutes. High-purity helium (99.999%) was used as the carrier gas, and the flow was held constant at  $1.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The initial oven temperature was held at  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  for 0.5 min, then raised up to  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  at  $15 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  and hold at  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  for 15 min for a total acquisition time of 40.5 min. Ion-trap electrodes, manifold and transfer line were held at  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectively. Ionization was performed by chemical ionization (CI) with methanol as reactant. Spectra were recorded using the automatic gain control (AGC) function with a target value of 5000. The filament emission current was set at  $50 \mu\text{A}$ . The electron multiplier voltage was automatically optimized at 2200 V for a gain value of  $10^5$ . Full scan mass spectra were acquired recording ions from  $m/z$  50 to 500 at a frequency of  $3 \text{ spectra}\cdot\text{s}^{-1}$ . In multi-stage mass spectrometry ( $\text{MS}^n$ ) experiments, precursor ions were stored with a Paul stability parameter ( $qz$ ) of 0.30 and fragmented by collision-induced dissociation with activation energies ranging from 0.30 to 0.80 V in the resonant excitation mode.

## VI.2.6 LC-MS operating conditions

Chromatographic separation was carried out on a liquid chromatograph HPLC Alliance 2690 (Water Technologies, Saint-Quentin en Yvelines, France). For all experiments, 10  $\mu\text{L}$  of sample were injected and separated on a C18 Pursuit-XRs Ultra 2.8  $\mu\text{m}$  50 mm x 2.0 mm column (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Elution was performed using a 0.1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  solvent flow with a mixture of solvents A (water, formic acid 0.1%) and B (methanol, formic acid 0.1%). Percentage of solvent B was increased from an initial value of 60% to 100% in 30 min and kept at 100% for 20 min. The gradient was then set at 60% of B for the last 10 min. For structural elucidation experiments, the HPLC system was coupled with an ultrahigh-resolution SolarixXR FT-ICR 9.4 T mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Ionization was achieved using electrospray in positive mode. Capillary and end plate voltages were set at -4.5 kV and -0.5 kV, respectively. Nitrogen was used as nebulizer and drying gas at 1 bar and 5  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively, with a drying gas temperature of 300  $^{\circ}\text{C}$ . Ions were accumulated for 0.1 s in the collision cell. Time of flight was set up at 0.8 ms. Detection of ions in the ICR cell was set with a resolution of 4 Mpt ( $4 \times 10^6$  data points acquired) from  $m/z$  57.74 to  $m/z$  1000, with a 0.8389 transient duration in the broadband mode. One acquired scan was recorded for each spectrum, corresponding to MS or MS/MS duty cycles of approximately 1.03 s. In MS/MS experiments, the precursor ion was selected in the quadrupole with an isolation window of 1 to 2 Da and submitted to collision induced dissociation with collision energies of 0, 10 and 20 V. Elementary compositions of ions were determined using the DataAnalysis software with a 5 ppm tolerance.

## VI.2.7 In silico toxicity estimation

The Toxicity Estimation Software Tool (T.E.S.T.) has been developed by the U.S. Environmental Protection Agency to estimate toxicity using a variety of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) mathematical models. Toxicity evaluations are based on the physical characteristics of a chemical structure (molecular descriptors). For example, the simple linear function of molecular descriptors (1) can be used to estimate the toxicity of chemicals.

$$\text{Toxicity} = ax_1 + bx_2 + c \quad (1)$$

where  $x_1$  and  $x_2$  are independent descriptor variables and  $a$ ,  $b$ , and  $c$  are fitted parameters. The molecular weight and the octanol-water partition coefficient are examples of molecular descriptors [17]. For each endpoint, test set predictions showed that the so-called “consensus” method provided the best results. For example, in the *D. magna* module, consensus method achieved the best results in terms of both predictions accuracy and coverage; it has thus been retained for toxicity predictions. Toxicity values were estimated averaging the predicted toxicities from the above QSAR methods, in order to provide that the predictions were within the respective applicability domains.

### **VI.2.8 In vitro bioassays**

*V. fischeri* commercial *in vitro* test kits were used to evaluate the global ecotoxicity of the  $\alpha$ -tocopherol solutions before and after several times of irradiation (0, 25, 50, 75, and 120 min). The freeze-dried luminescent bacteria and the luminometer were purchased from Hach Lange (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany). The experimental method used in this study is based on the ISO 11348-3 protocol (1998) [18]. Analysis were carried out at 15 °C. Lyophilized bacteria, previously frozen, were reconstituted just before analysis. Reconstitution was achieved by adding 1.3 mL of a saline solution provided by the manufacturer. The reconstituted solution had to be equilibrated for at least 15 minutes at 4 °C before testing. A working solution was prepared by adding 12.5 mL of dilution reagent to the hydrated bacteria. pH of solutions before and after irradiation were adjusted between 6.5 and 7.0 with sodium hydroxide and salinity was adjusted at 2% sodium chloride. Series of dilutions of test solutions were carried out in a 2% sodium chloride solution. Each dilution was tested in duplicate. Luminescence was measured before addition of the test solution and then after 5, 15 and 30 min and compared to the measured value of the bacterial control. The effective nominal concentration leading to 50% inhibition of bioluminescence after exposure for 5, 15 or 30 min was designated as the EC<sub>50</sub> value. Two concentrations of  $\alpha$ -tocopherol were used for the tested solutions, 150 and 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , depending on the expected EC<sub>50</sub>.

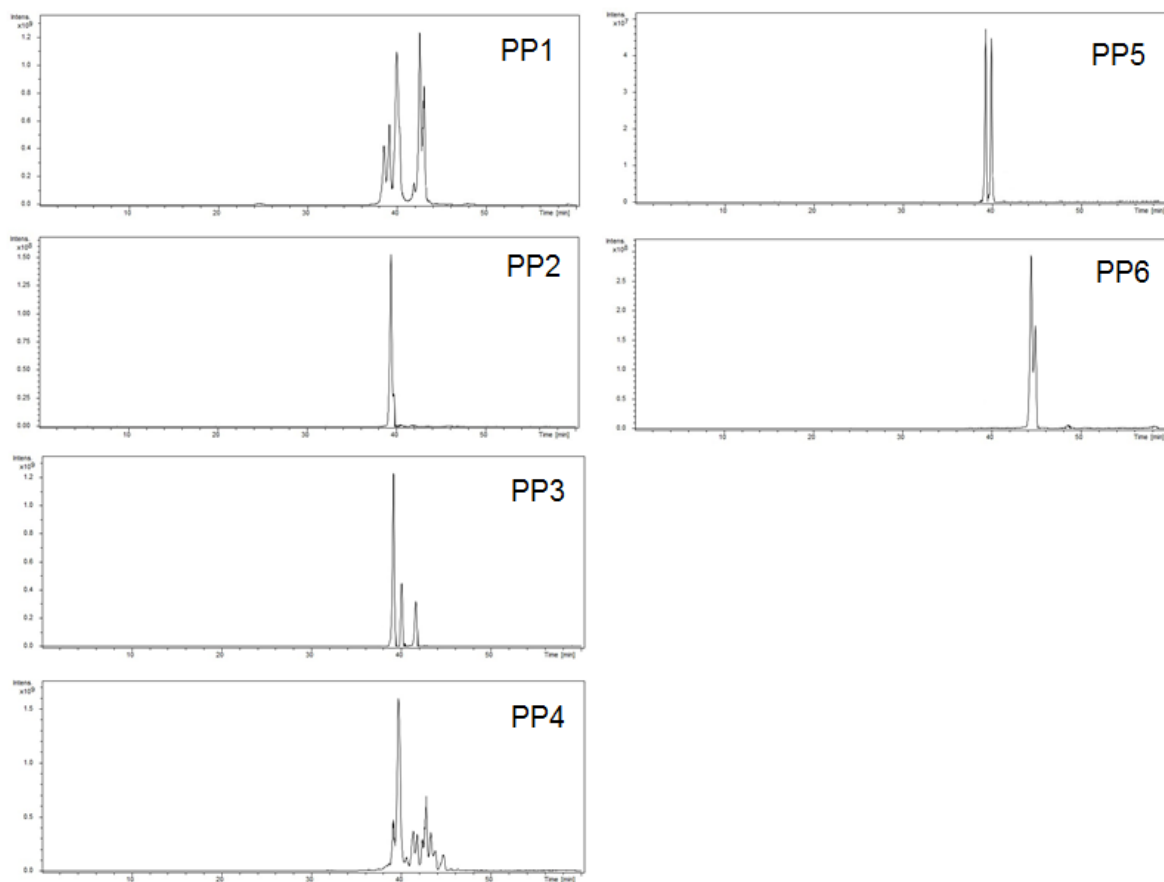
## VI.3 RESULTS AND DISCUSSION

### VI.3.1 Photoproducts characterization

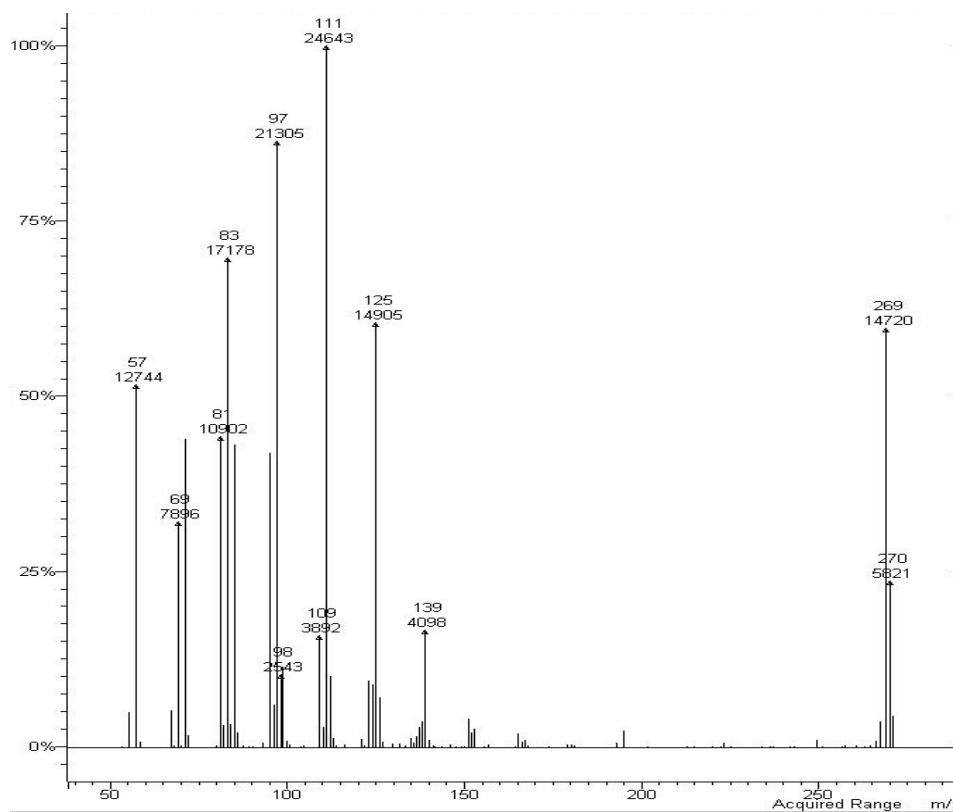
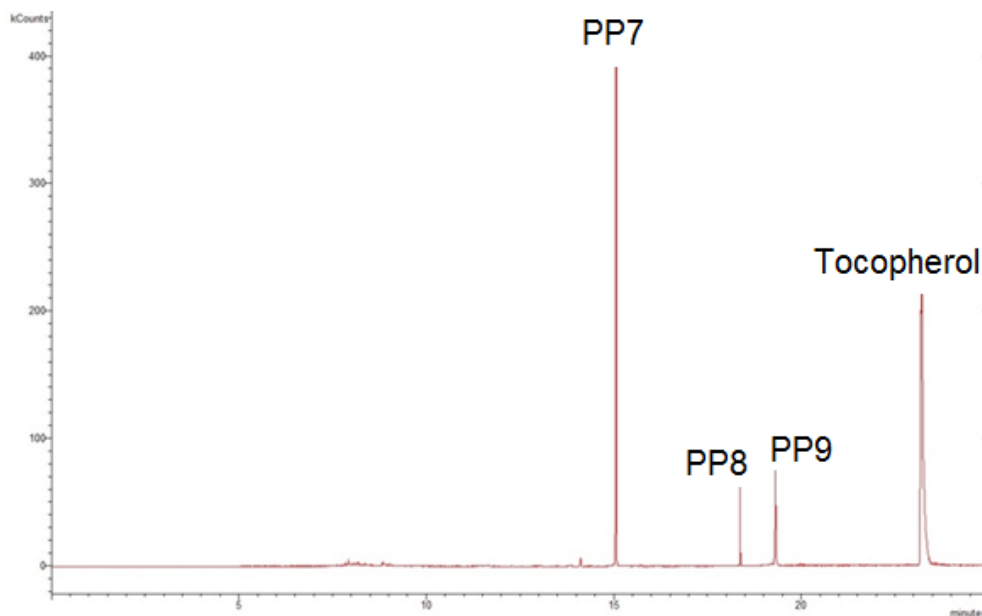
Irradiation of the acetonitrile solution of  $\alpha$ -tocopherol led to the detection of 9 families of photoproducts. Mass spectra are too numerous to be all provided. The CID (collision induced dissociation) mass spectra of the protonated molecules corresponding to the major photoproducts are given in supplementary data files: SD-2 for PP7, SD-5 for PP1 and PP4. To make sure that none of them was formed without UV-visible irradiation, a non-irradiated solution (sampled at  $t_0$ ) has been systematically analyzed in GC-MS and LC-MS. No by-product was detected. Five groups of photoproducts, referred as PP1 to PP6, were detected by LC-HRMS and three photoproducts, referred as PP7 to PP9, were detected by GC-MS. The GC-MS and LC-HRMS chromatograms recorded for an irradiation time of two hours are given in the supplementary data files SD-1 and SD-2; kinetic data are reported in SD-3. Table 1 reports the retention times, the  $m/z$  ratios of  $MH^+$  ions, the main transitions issued from CID experiments and the number of deuterium atoms present in each compound when irradiation is carried out on  $\alpha$ -tocopherol- $d_9$ . Elementary formulae were determined with a tolerance of 5 ppm. The results in Table 1 show that the photodegradation process begins via oxidation of  $\alpha$ -tocopherol through oxygen addition onto it. The solubility of oxygen in acetonitrile is high enough (8.1 versus 1.0 mM in water under standard temperature and pressure conditions) to permit such a mechanism [19]. According to literature results,  $O_2$  addition onto a 6-membered-ring – fully conjugated or including at least a double bond – may occur via three mechanisms: concerted 1,2-cycloaddition, concerted 1,4-cycloaddition and ene reaction of singlet oxygen onto a double bond. The predominant role of dissolved  $O_2$  was confirmed by analyzing a solution of  $\alpha$ -tocopherol previously degassed (see the experimental part), for which the initial amount of  $\alpha$ -tocopherol is still measured after two hours of irradiation.



**SD 1 - LC-MS chromatogram of an alpha-tocopherol solution irradiated for 60 minutes in acetonitrile (ESI+ mode, extracted ionic currents)**



**SD 2 - GC-MS chromatogram of an alpha-tocopherol solution irradiated for 60 minutes in acetonitrile (CI mode, full scan detection) and CID mass spectrum of PP7H<sup>+</sup>**



### SD 3 - Kinetic data

The relative amounts of  $\alpha$ -tocopherol and its photoproducts were estimated by integrating the chromatographic peaks on the  $MH^+$  ionic current. The relative amounts estimated by LC-MS are plotted as a function of the irradiation time in Figure 1. Figure 1a shows that about 76.5% of the initial amount of alpha-tocopherol was still detected after 30 min of irradiation and no more detected after 120 min of irradiation. Photoproducts PP1 and PP4 are globally much more abundant than all other (Figure 1b). All photoproducts are detected as soon as the solution is irradiated and display an increasing abundance until the end of the experiment (Figures 1b and 1c). The solution irradiated for 120 minutes was used for structural elucidation.

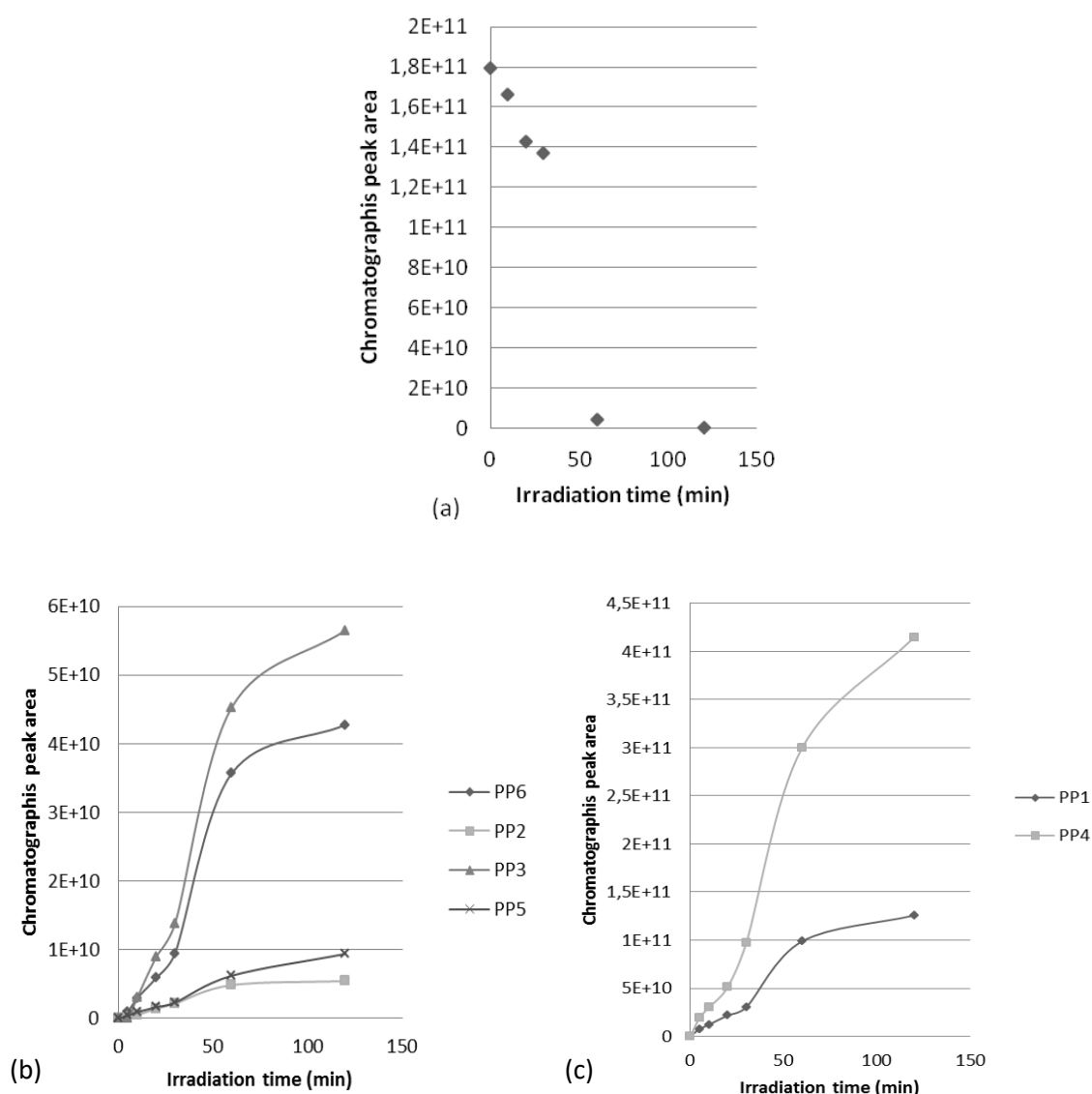


Figure 1: Relative amounts estimated by LC-MS of alpha-tocopherol and its photoproducts plotted as a function of the irradiation time

The relative amounts of tocopherol and PP7 to PP9 photoproducts estimated by GC-MS are plotted as a function of the irradiation time in Figure 2. Figure 2a shows that about 31.5% of the initial amount of alpha-tocopherol was still detected after 75 min of irradiation; it is no more detected after 120 min. Differences are observed between the abundance of the photoproducts detected by GC-MS (Fig.2b) and those detected by LC-MS. Photoproducts detected by GC-MS represent only 6,41% of the relative degradation amount of  $\alpha$ -tocopherol, they can be considered as minor photoproducts compared to the photoproducts detected by LC-MS, which constitute the major part of the degradation amount of tocopherol.

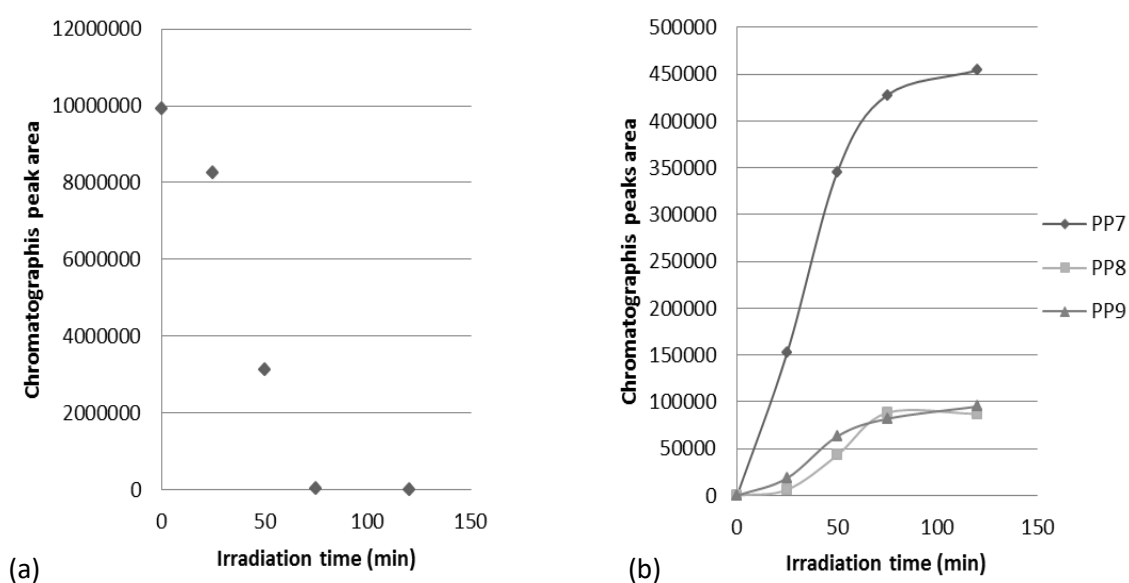


Figure 2: Relative amounts estimated by GC-MS of alpha-tocopherol and its photoproducts plotted as a function of the irradiation time

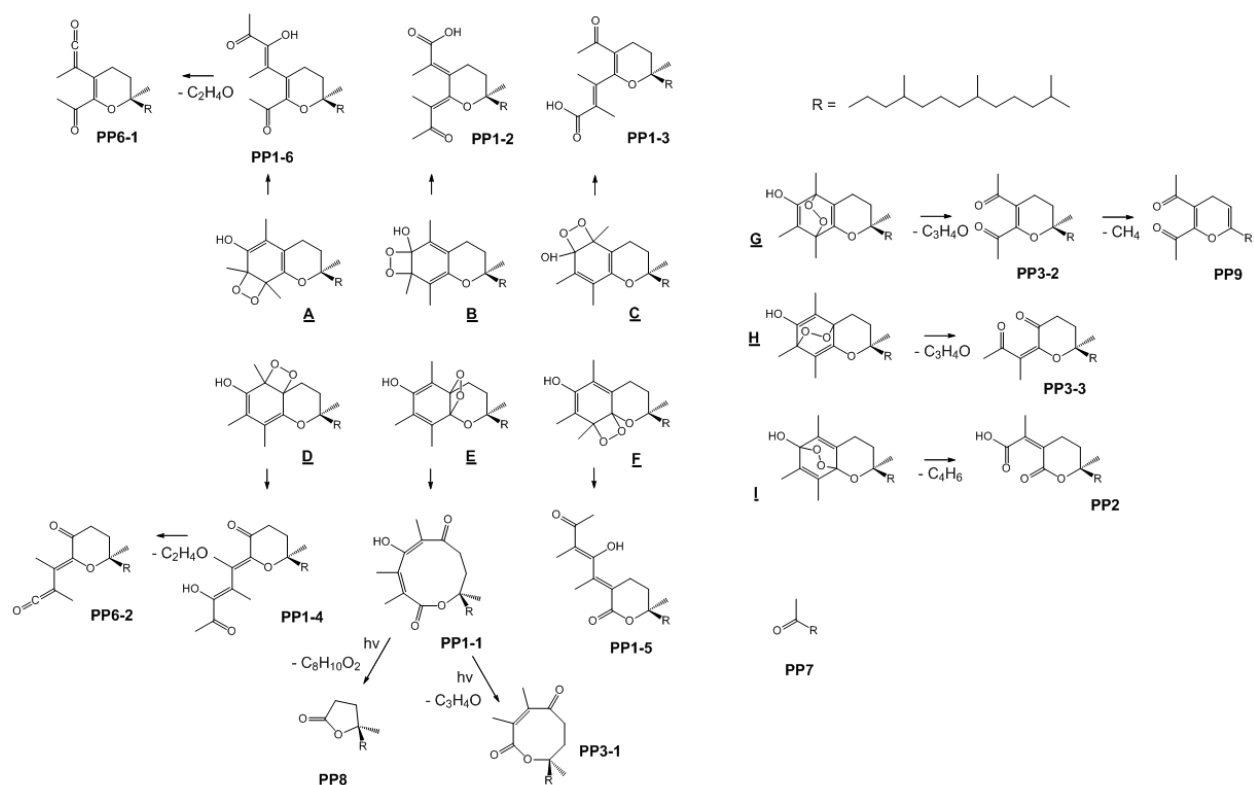
**Table 1: Analytical results related to the LC-MS and GC-MS detection of Tocopherol photoproducts**

Compound	Retention time (min)	m/z of MH <sup>+</sup>	Ion raw formula	m/z shift for Tocopherol-d <sub>9</sub>	Main transitions in MS/MS (m/z)	Chemical structure
LC-MS data (ESI+ high resolution)						
PP1-1 to PP1-6	38.49 to 43.85	463,37967	C <sub>29</sub> H <sub>51</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	+ 9	463.37675 → 445.36612 445.36612 → 417.37141 <sup>1</sup>	Tocopherol + O <sub>2</sub>
PP2	39.12	409.33197	C <sub>25</sub> H <sub>45</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	+ 3	409.33031 → 391.34074	Tocopherol + O <sub>2</sub>
PP3-1 to PP3-3	34.62 to 42.17	407.35291	C <sub>26</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	+ 6	407.31225 → 389.34076 389.34076 → 361.34598	Tocopherol + O <sub>2</sub> - C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O
PP4-1 to PP4-10	39.70 to 47.10	445.36931	C <sub>29</sub> H <sub>49</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	+ 9	445.36634 → 427.35631 445.36634 → 417.37110 427.35631 → 409.34528 427.35631 → 399.36067	Tocopherol + O - 2H
PP5-1 and PP5-2	42.21 to 47.11	427.35933	C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	+ 8	427.35933 → 409.32995 427.35933 → 399.36088 427.35933 → 385.17716	Tocopherol - 4H
PP6-1 and PP6-2	45.08 to 45.55	419.35363	C <sub>27</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	+ 6	419.35077 → 153.05429 153.05429 → 125.05352	Tocopherol + O <sub>2</sub> - C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O
GC-MS data (CI+ low resolution)						
PP7	15.05	269		0	269 → 139 269 → 125 269 → 111 111 → 83	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O
PP8	18.38	325		0	325 → 307 307 → 289 325 → 269	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
PP9	19.31	391		+ 6	391 → 125	C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>

<sup>1</sup> Not observed in the case of PP1-6

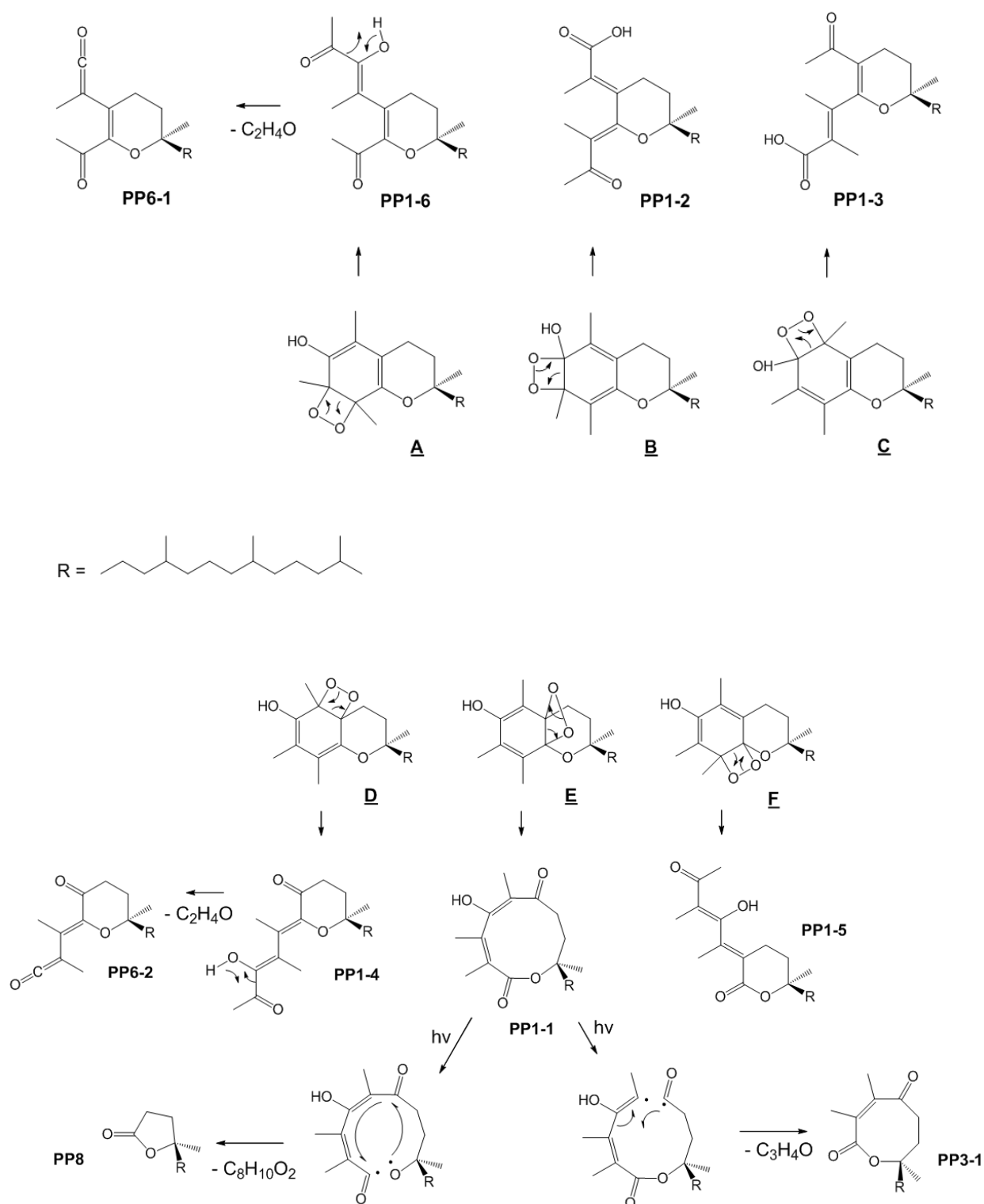
### PP-1-1 to PP1-6

1,2-cycloaddition on  $\alpha$ -tocopherol may lead to the six dioxetane structures referred as **A** to **F** in Figure 2. These structures are expected to be unstable: the dioxetane ring should open through a concerted mechanism, as shown by Barlett *et al.* for the photooxidation of dihydropyrene [20]. The six products corresponding to  $C_{29}H_{50}O_4$  ( $m/z$  463.3796 for  $MH^+$ ), eluted between 38.49 and 43.85 min, are assumed to result from 1,2-cycloaddition of  $O_2$  on  $\alpha$ -tocopherol, followed by opening of the four-membered ring, to lead to keto and carboxylic functions in all cases, at the exception of structure **E**, whose opening leads to a ten-membered ring. In MS/MS experiments, all the corresponding  $MH^+$  ions undergo successive losses of water and carbon monoxide (transitions  $m/z$  463.3767  $\rightarrow$   $m/z$  445.3661  $\rightarrow$   $m/z$  417.3714).  $H_2O$  is also eliminated from the deuterated analogues, meaning that water is eliminated after protonation of a hydroxyl group. Only water loss is observed in the case of PP1-6. This is in agreement with the suggested structures that may all lose water and carbon monoxide with the exception of PP1-6 for which only water elimination is possible. PP1-6 may thus be attributed to the last eluting isomer while PP1-1 could correspond to the first one based on its small cross section in comparison with other compounds. Other isomers cannot be attributed to chromatographic peaks on the basis on MS/MS results nor chromatographic considerations. Examples of the mechanism postulated for PP1 formation are supplied in supplementary data file SD-4.

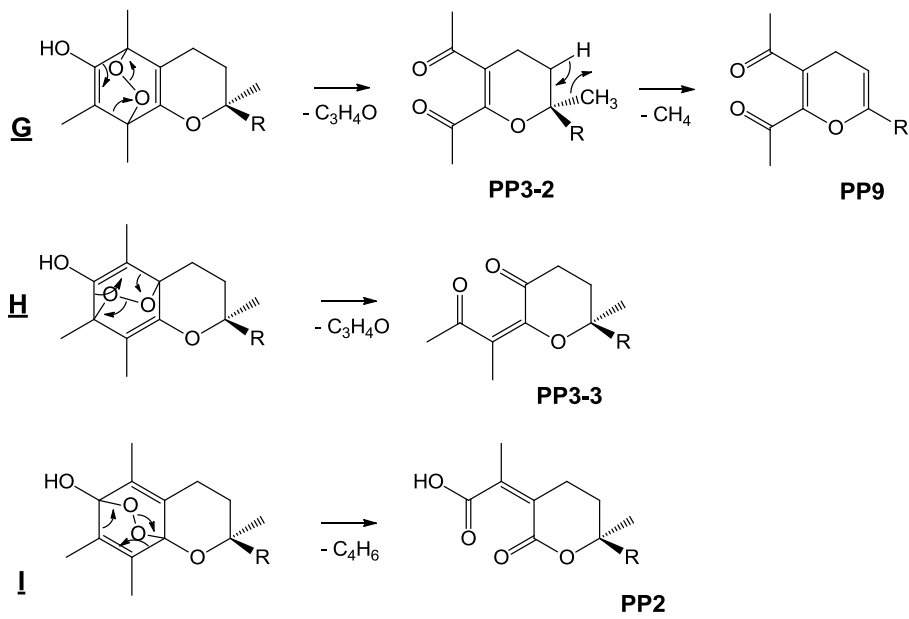


**Figure 2 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of photoproducts PP1-1 to PP1-6, PP2, PP3-1 to PP3-3, PP6-1, PP6-2, PP7, PP8 and PP9**

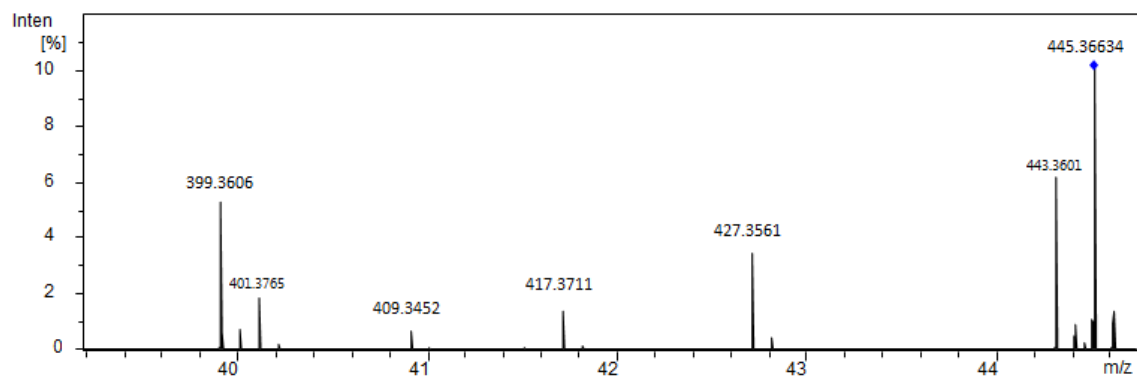
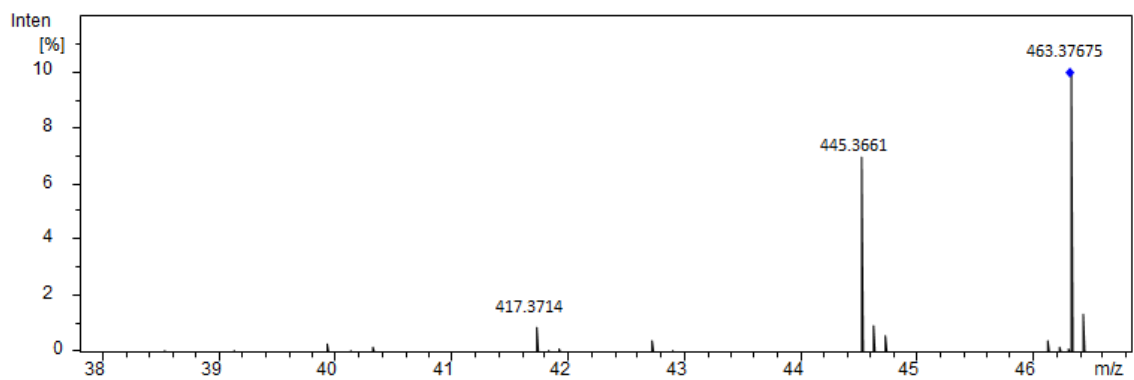
**SD 4 - Mechanisms suggested for the formation of PP1, PP2, PP3, PP6, PP8 and PP9 photoproducts after O<sub>2</sub> cycloaddition (1,2- and 1,4-) onto  $\alpha$ -tocopherol**







**SD 5 - CID mass spectra of PP1H<sup>+</sup> (above) and PP4H<sup>+</sup> (below) in ESI<sup>+</sup> - MS/MS**



## PP2

PP2 corresponds to  $C_{25}H_{44}O_4$  ( $m/z$  409.33199 for  $MH^+$ ); it elutes at 39.12 min. It is assumed to result from 1,4-addition of  $O_2$  onto  $\alpha$ -tocopherol (structure **I** in Figure 2), followed by  $C_4H_6$  elimination ( $C_4D_6$  with  $\alpha$ -tocopherol- $d_9$ ) according to the mechanism described in SD-4. The only transition observed in MS/MS experiments corresponds to the loss of water from  $PP2H^+$ , in agreement with the postulated structure.

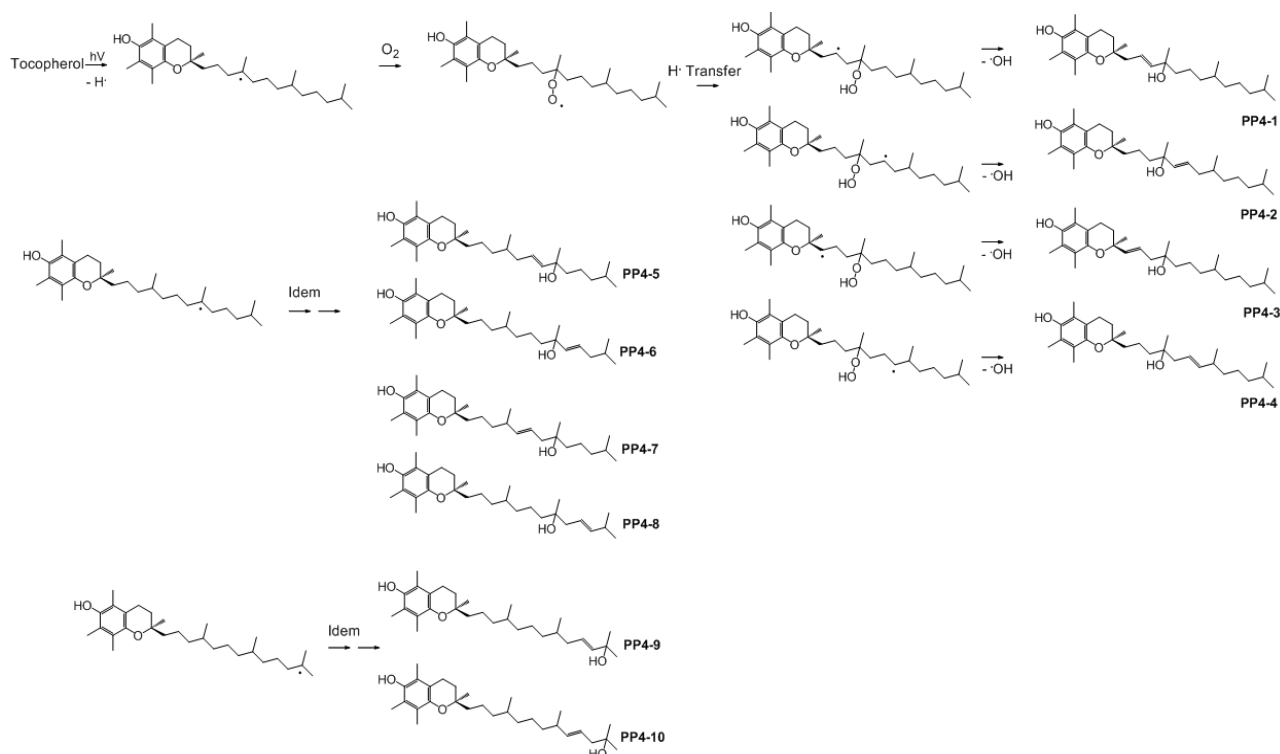
## PP3-1 to PP3-3

Three products corresponding to  $C_{26}H_{46}O_3$  ( $m/z$  407.35291 for  $MH^+$ ) are eluted between 39.62 and 42.17 min. Two of them are also assumed to result from 1,4-addition of  $O_2$  onto  $\alpha$ -tocopherol (structures **G** and **H** in Figure 2). By the same mechanism that for the opening of **I**, the dissociation pathways of **G** and **H** consist in  $CH_3CCOH$  eliminations ( $CD_3CCOH$ ) with  $\alpha$ -tocopherol- $d_9$ ) to provide PP3-2 and PP3-3. PP3-1 was assumed to result from  $CH_3CCOH$  elimination from PP1-1 after irradiation of the later (see Figure 2). The resulting cyclic structure is in agreement with a compound eluting before PP3-2 and PP3-3. In MS/MS experiments, the corresponding  $MH^+$  ions all undergo loss of water; carbon monoxide is also eliminated in the case of PP3-1 and PP3-2, in accordance with the proposed structures.

## PP4-1 to PP4-10

PP4-1 to PP4-10 isomers have a raw formula ( $C_{29}H_{48}O_3$ ) resulting from oxygen addition and elimination of two hydrogen atoms from  $\alpha$ -tocopherol. Their retention times – ranging from 39.70 to 47.10 min – are shorter than that of  $\alpha$ -tocopherol (50.16 min) and suggest that the six-membered ring has been kept during photolysis. Under collisional activation, the pseudomolecular ion undergoes loss of CO and successive elimination of two water molecules, indicating that a hydroxyl group was added to the initial structure. Water elimination after  $O_2$  addition was first postulated but none of the structures resulting from 1,2- or 1,4-addition on the aromatic ring (i.e. A to I in Figure 2) allows the elimination of water. Irradiation of  $\alpha$ -tocopherol- $d_9$  also led to elimination of two hydrogen atoms and creation of a new unsaturation, meaning that hydroxyl addition occurred on the aliphatic chain, as well as  $H_2$  elimination. The mechanisms postulated on Figure 3 all begin by photo removal of a hydrogen atom from a carbon atom bound to at least one methyl group, leading to a tertiary radical. After  $O_2$  addition, concerted hydrogen transfer and radical hydroxyl elimination lead

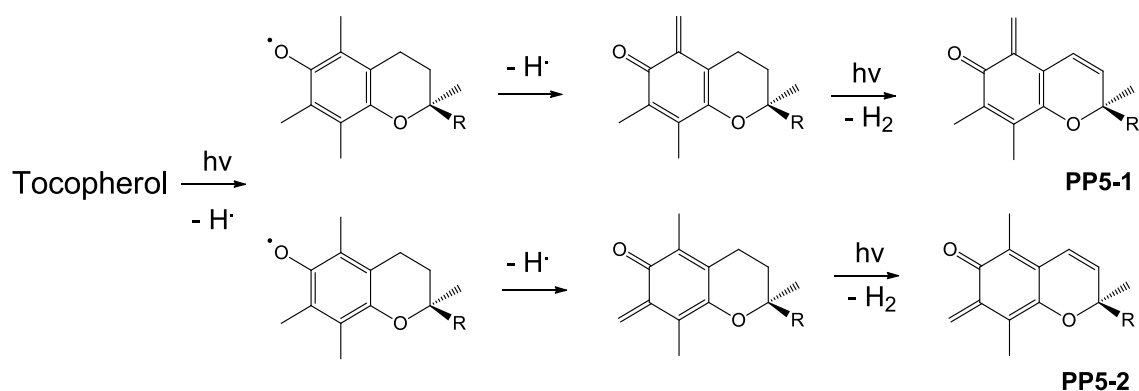
to ten structures, in agreement with the ten coeluted photoproducts detected on the chromatogram between 39 and 47 min (SD-1).



**Figure 3 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of photoproducts PP4-1 to PP4-10**

#### *PP5-1 and PP5-2*

Photoproducts PP5-1 and PP5-2, corresponding to  $C_{29}H_{47}O_2$  ( $m/z$  427.3593 for  $MH^+$ ) are eluted at 42.21 min and 47.11 min. They have lost four hydrogen atoms in comparison with  $\alpha$ -tocopherol. The deuterated analogue loses one deuterium atom and three hydrogen atoms under irradiation, suggesting the elimination of one hydrogen from one methyl group, one from the hydroxyl function and two from the six-membered ring. A mechanism beginning by hydrogen atom removal from the hydroxyl group has been postulated (see Figure 4). This  $H^\bullet$  elimination is followed by another one ( $D^\bullet$  in the case of deuterated analogue) and by a concerted  $H_2$  loss to increase conjugation of the system. Both losses of  $H_2O$  (after protonation of the ether function and hydride transfer from the aliphatic chain) and  $CO$  (following protonation on the ring carrying the keto group) under collisional activation are in agreement with the postulated structures. Elimination of  $CH_2C=CHCH_3$  ( $M = 42$ ) may be rationalized by the loss of the end of the aliphatic chain.



**Figure 4 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of photoproducts PP5-1 and PP5-2**

#### *PP-6-1 and PP6-2*

Two isomeric compounds, referred as PP6-1 and PP6-2, corresponding to  $C_{27}H_{46}O_3$  ( $m/z$  419.3536 for  $MH^+$ ) are eluted at 45.08 min and 45.55 min. They are assumed to result from acetaldehyde loss from PP1-6 and PP1-4 (they can also be rationalized in terms of simultaneous eliminations of methane and carbon monoxide). The loss of  $HCOCH_3$  was replaced by that of  $HCOCD_3$  in experiments with deuterated  $\alpha$ -tocopherol, indicating elimination of three hydrogen atoms from a methyl group and one hydrogen atom initially bound to the oxygen atom of the hydroxyl group or to a  $sp^3$  carbon of the six-membered ring. Based on these results, PP1-6 and PP1-4 are, among PP1-1 to PP1-6, the only structures for which  $HCOCD_3$  loss from the deuterated analogue is possible. This acetaldehyde elimination is assumed to occur through a concerted four-membered mechanism that is given in supplementary data SD-4. The structures proposed on Figure 2 for PP6-1 and PP6-2 are in agreement with the results of CID experiments performed on the protonated molecules that show consecutive eliminations of  $C_{19}H_{39}$  and carbon monoxide.

### PP7

In GC-MS coupling, one product corresponding to  $m/z$  269 for  $MH^+$  is eluted at 15.05 min. The absence of shift for the deuterated photoproduct means that all deuterium have been removed during the phototransformation process. In MS/MS experiments, the characteristic profile of an n-alkane spectrum, regularly-spaced of alkyl groups  $(C_nH_{2n+1})^+$  is an indication of the presence of the aliphatic chain ( $m/z$  225). The structure proposed for PP7 is the ketone resulting from opening of the tetrahydropyran. The transitions observed in CID experiments correspond to fragmentations of the alkyl chain.

### PP8

PP8 corresponding to  $m/z$  325 for  $MH^+$  is eluted at 18.38 min in GC-MS. It was assumed to result from opening of PP1-1 (see Figure 2) through a Norrish-type photoinduced reaction followed by cyclization into a five-membered ring. The lactone structure proposed is coherent with the loss of all the deuterated atoms for the deuterated analogue and with the MS/MS dissociation pathways displayed in the supplementary data file SD-6.

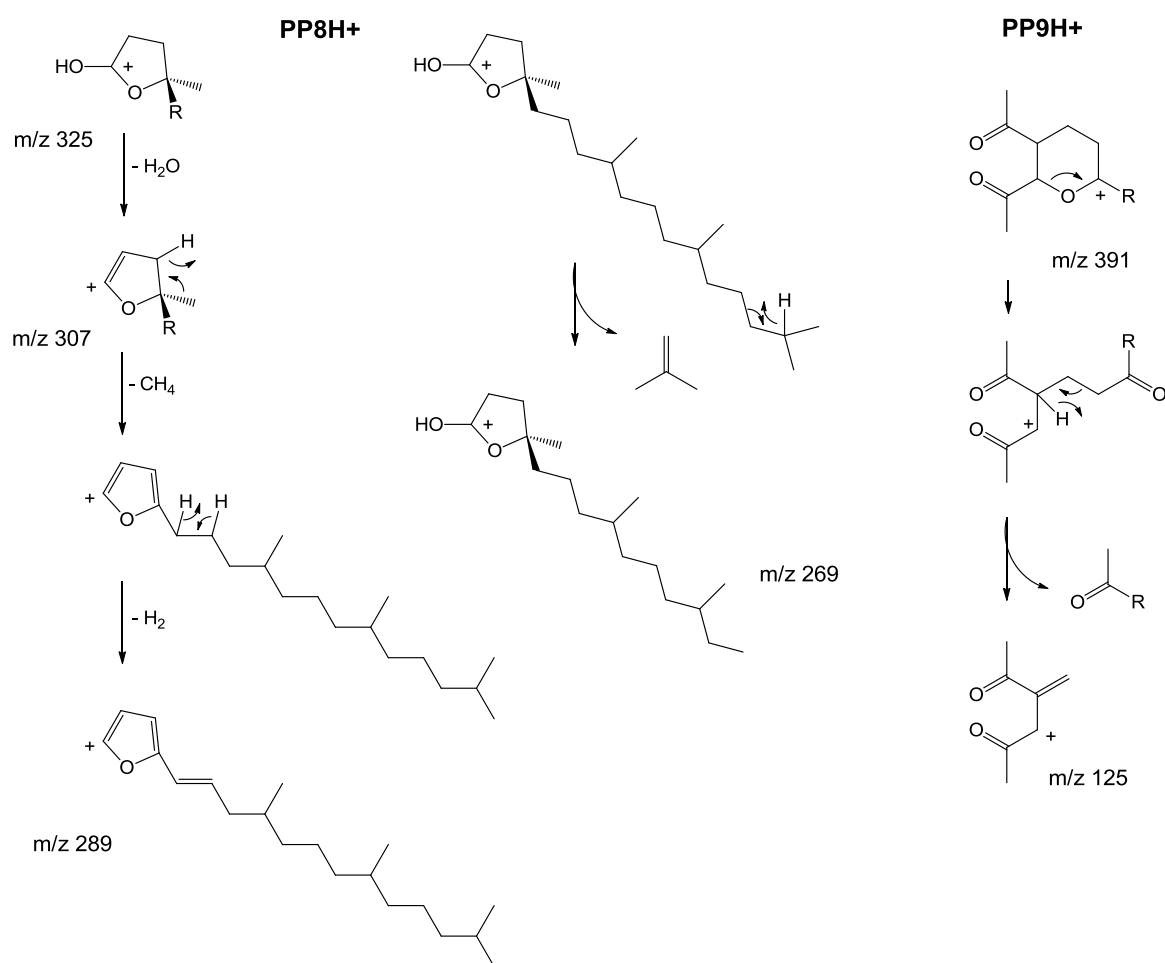
### PP9

One product corresponding to  $m/z$  391 for  $MH^+$  is eluted at 19.31 min in GC-MS. The deuterated analogue of PP9 has kept six deuterium atoms meaning that a methyl group was eliminated during photoformation of this compound. The PP9 structure displayed in Figure 2, postulated on the basis of the main MS/MS transition observed from  $PP9H^+$  (see the supplementary data file SD-6) is easy to form from PP3-2, through concerted methane elimination to provide a more conjugated thus more stable species.

F.Pirisi *et al.* studied the photodegradation of  $\alpha$ -tocopherol in olive oil, hexane, anhydrous n-hexane, and triolein. A main product identified by  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR and GC-MS as 5-formyl tocopherol produced by Michael addition of  $H_2O$  was found in the non-anhydrous hexane model system [11]. T. Miyazawa *et al.* reported the formation of 8a-hydroperoxy- $\alpha$ -tocopherone, which has been characterized by  $^1H$  NMR and FAB-MS [13]. G. W. Grams *et al.* showed that  $\alpha$ -tocopherol is susceptible to photooxidation in the presence of a dye sensitizer leading in methanol to several compounds including  $\alpha$ -tocoquinone 2,3-oxide [14]. Kramer *et al.* described the UVB induced photooxydation of  $\alpha$ -tocopherol in liposomes and in an acetonitrile/ $H_2O$  (4:1 v/v) solution. Oxidation products, including a quinone,

epoxyquinones, dimers and epoxytocopherones, were initially separated by HPLC; their UV spectra and retention times were compared to those of standards. In GC-MS, full-scan mass spectra and GC retention times were also used to confirm the formation of epoxyquinones. Dimers were analyzed by APCI-HPLC-MS. A more recent work reported the photochemical formation of  $\alpha$ -tocopherol dimers and trimers after UV-irradiation of  $\alpha$ -tocopherol in a thin film obtained by the solvent evaporation of a concentrated ( $2153 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )  $\alpha$ -tocopherol solution. After HPLC separation, dihydroxydimer, spiromer and trimers were analyzed by APCI-MS or ESI-MS and compared to MS-MS analysis of authentic standards [16]. None of these photoproducts were detected in the present study. Concerning dimers and trimers, it may be due to the low concentration used, which likely does not permit intermolecular reactions. Concerning other species, these differences may be attributed to the differences in irradiated media since photochemical reactions are known to be very matrix-dependent.

#### SD 6 - Collision induced dissociation pathways of protonated photoproducts PP8 and PP9



### VI.3.2 Real sample analysis

In recent years, the photostabilities of topical formulations were investigated, especially those of sunscreens, to assure their performance on human skin. Many formulations contain vitamins to ensure the hydration and anti-aging effects on the skin. Vitamin A, C and E are frequently added. According to Gaspar *et al.*, formulations containing combinations of vitamins are more suitable in deeper layers hydration and anti-aging effects. Addition of UV-filters is interesting in combination with vitamins for the reduction of skin irritation due to vitamin A conversion into tretinoin [21]. Guaratini *et al.* study has shown that addition of vitamins to the basic formulation affected the formulation physical integrity and concludes on the necessity to study both physical aspect and chemical degradation [22]. The light-induced transformation of  $\alpha$ -tocopherol in the real sample (initially containing 3000  $\mu\text{g/mL}$  of  $\alpha$ -tocopherol) was investigated with the photolysis conditions used for the standard solution. According to both GC-MS and LC-MS results, the initial amount of  $\alpha$ -tocopherol decreases by about 50% after 2 hours of irradiation. Only two isomers of PP1, five isomers of PP4 and PP7 were detected after 2 hours of irradiation. The photoproducts found in the reference emulsion correspond to the major ones detected by both GC-MS and LC-MS in the irradiated standard solution. Consequently, it is impossible to state if the other photoproducts were not detected because they had not been formed (or in trace amount) or because they are present at concentrations below the analytical detection thresholds, which are expected to be likely elevated due to matrix effects.

### VI.3.3 Toxicity predication

#### VI.3.3.1 *In silico* toxicity estimation

Table 2 reports the predictive values for oral rat LD50, *Daphnia magna* LC50 (48 hours), and the predictive conclusions on the developmental toxicity for the photoproducts of  $\alpha$ -tocopherol. Oral LD50 and *Daphnia magna* LC50 of PP6-1 and PP6-2, which contain a ketene functional group, were not calculated by the software T.E.S.T. since it had no sufficient parameters for the corresponding structures. Oral rat LD50 indicates the amount of chemical in  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  body weight (bw) that would cause 50% of a test population of rats to die after oral administration. As vitamin E is prescribed as a nutritional complement, the question of the safety of oral administration had been previously examined. The acute, subacute, subchronic and chronic toxicity, mutagenicity and reproductive toxicity of various derivatives of  $\alpha$ -tocopherol, e.g.  $\alpha$ -tocopheryl acetate, have been investigated using *in vivo*

approaches [23]. Wheldon *et al.* fed all-*rac*- $\alpha$ -tocopheryl acetate to rats in daily doses of 500, 1000 and 2000 mg.kg<sup>-1</sup> bw for 104 weeks. No significant effects on clinical-chemical parameters have been reported. Slight effects on liver weights and small increase of liver enzymes in serum have been observed. Hemorrhages were observed at the highest doses, in male rats only. The tumor rate also showed no difference from control animals, with the exception of decrease of mammary tumors. The acute oral rat LD<sub>50</sub> has not been determined but it has been reported that  $\alpha$ -tocopherol was tolerated at doses up to 5000 mg.kg<sup>-1</sup> bw in rats [24]. This is in accordance with the predicted value of 5742.54 mg.kg<sup>-1</sup> provided by the simulation program used in the present study.

The consensus method for oral rat LD<sub>50</sub> provided low predicted values of 466.78 mg.kg<sup>-1</sup> and 467.90 mg.kg<sup>-1</sup> for PP5-1 and PP5-2, respectively. According to the Hodge and Sterner toxicity classification scale, these values correspond to a moderate toxicity compared to a practically non-toxic class for parent compound and a slight toxicity class for all other photoproducts (between 1044.31 mg.kg<sup>-1</sup> for PP4-5 and 4120.22 mg.kg<sup>-1</sup> for PP7). This higher toxicity in comparison with that of the parent molecule was also observed with the *Daphnia magna* LC50 (48 hours) estimation in the cases of PP5-1 and PP5-2 with LC50 values of 0.055 mg.L<sup>-1</sup> and 0.15 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. The relationship between the ring number and the aquatic toxicity has been reported by Black *et al.* for three chemical aromatic hydrocarbon classes [25]. No mutagenicity effect has been reported in literature for  $\alpha$ -tocopherol. A negative mutagenicity has been predicted for  $\alpha$ -tocopherol in the present study. This is coherent with the absence of induction of chromosomal damage or the absence of increase in the sister chromatid exchange rates reported by Gebhart *et al.* who tested the mutagenicity in human lymphocytes *in vitro* [26]. No mutagenicity effect has been predicted for the photoproducts. The potential development toxicity of  $\alpha$ -tocopherol and its photoproducts has also been investigated. Results of simulation tests show that  $\alpha$ -tocopherol could be responsible for developmental toxicity. Some studies dedicated to the teratogenicity and reproductive toxicity of vitamin E reported a teratogenic effect while others studies disproved it. Studies on animal experiments have shown that vitamin E deficiency was responsible of teratogenic effects. A study on mice showed some malformations (exencephaly, open eye, and micrognathia) on a total of 91 offsprings from 7 litters from treated animals (daily doses of 591 mg  $\alpha$ -tocopherol by gavage on days 7 to 11 of pregnancy) [27]. In a study reported in the Catalog of Teratogenic Agents, vitamin E was administered in amounts of 150 or 300 mg.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> to pregnant mice on days 6, 8 and 10 of gestation [28].



Growth retardation and fetal survival were increased in the treated group. The incidence on cleft palate was also increased. Studies on rat ( $75 \text{ mg}\cdot\text{day}^{-1}$ ) were negative. Others studies have shown a higher rate of exencephaly, hydrocephalus, and cleft palate in the litters of rats and mice after administration of high doses of vitamin E [29,30]. However, other animal investigations did not find teratogenic effect of vitamin E [31]. According to the results of the present studies, all the photoproducts at the exception of PP7 and PP8 could be also responsible for development toxicity, but it is difficult to conclude on the potential development toxicity of  $\alpha$ -tocopherol considering the conclusions of previous published studies.

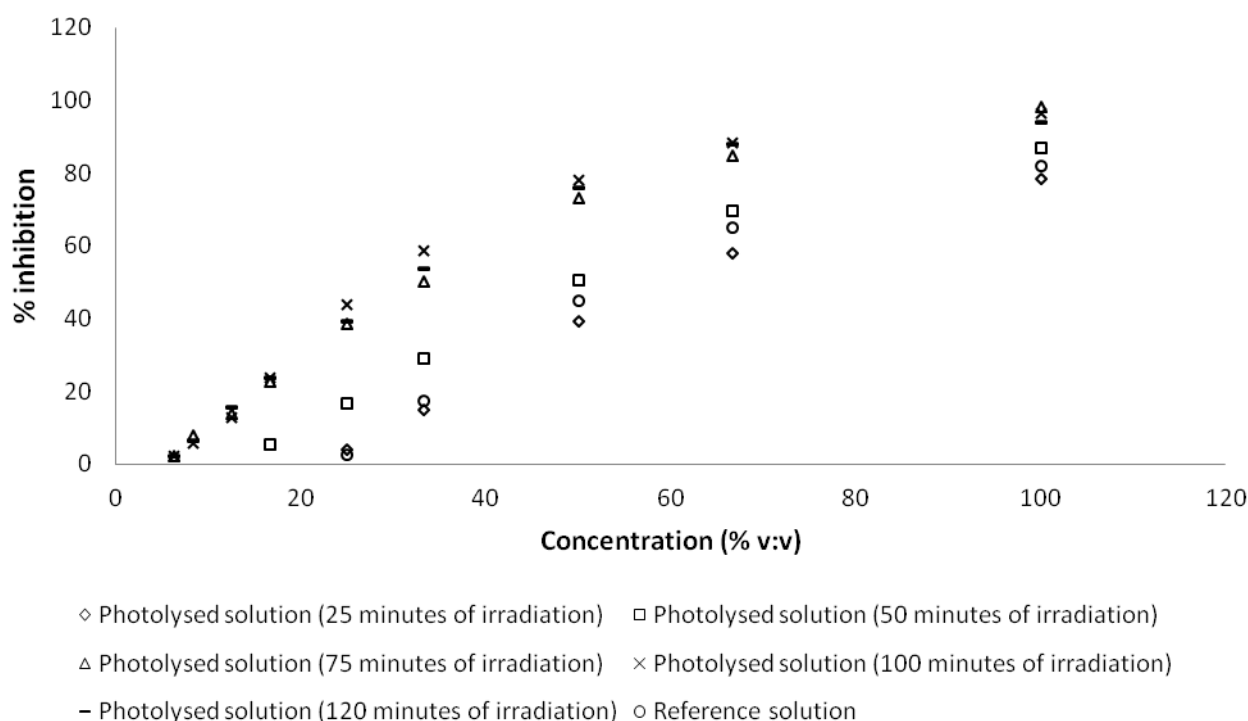
**Table 2 : *In silico* toxicity predictions provided by the software T.E.S.T. for the photoproducts of tocopherol**

ID	Oral rat LD50	Developmental toxicity	Daphnia magna LC50
	(mg/kg)		48 hours (mg/L)
<b><i>α</i>-tocopherol</b>	5742.54	Toxicant	0.22
<b>PP1-1</b>	1211.76	Toxicant	0.54
<b>PP1-2</b>	3695.21	Toxicant	0.27
<b>PP1-3</b>	1548.23	Toxicant	0.38
<b>PP1-4</b>	1344.37	Toxicant	0.56
<b>PP1-5</b>	2886.81	Toxicant	0.36
<b>PP1-6</b>	2341.34	Toxicant	0.71
<b>PP2</b>	1949.42	Toxicant	0.92
<b>PP3-1</b>	4383.53	Toxicant	0.46
<b>PP3-2</b>	1255.43	Toxicant	0.54
<b>PP3-3</b>	1869.90	Toxicant	0.42
<b>PP4-1</b>	2520.64	Toxicant	0.23
<b>PP4-2</b>	1558.59	Toxicant	0.22
<b>PP4-3</b>	1584.71	Toxicant	0.22
<b>PP4-4</b>	2039.75	Toxicant	0.33
<b>PP4-5</b>	1044.31	Toxicant	0.35
<b>PP4-6</b>	2692.95	Toxicant	0.79
<b>PP4-7</b>	1622.20	Toxicant	0.36
<b>PP4-8</b>	1519.56	Toxicant	0.41
<b>PP4-9</b>	1374.95	Toxicant	0.35
<b>PP4-10</b>	1290.38	Toxicant	0.83
<b>PP5-1</b>	466.78	Toxicant	0.06
<b>PP5-2</b>	467.90	Toxicant	0.15
<b>PP6-1</b>	NC <sup>a</sup>	Toxicant	NC
<b>PP6-2</b>	NC	Toxicant	NC
<b>PP7</b>	4120.22	Non-toxicant	1.54
<b>PP8</b>	3752.70	Non-toxicant	0.47
<b>PP9</b>	2549.10	Toxicant	0.43

<sup>a</sup> NC: Not calculated, because of insufficient parametrization of the software

### VI.3.3.2 *In vitro* bioassays

The objective of the ecotoxicity tests carried out on *Vibrio fischeri* was to evaluate the consequences of UV-Visible irradiation on the toxicity of reference solutions and irradiated solutions by comparing their EC<sub>50</sub>. A solution of  $\alpha$ -tocopherol at 3000 mg.L<sup>-1</sup> in acetonitrile was irradiated for 0 (reference solution), 25, 50, 75, 100 and 120 min. Samples were then diluted in water so that tests were conducted on aqueous mixtures with less than 20% acetonitrile. For each sampling time, two “final” concentrations were tested: 150 and 200 mg.L<sup>-1</sup>. Figure 5 displays the inhibition percentage of *Vibrio fischeri* bioluminescence after 5 min of incubation as a function of the ratio (v:v) of the tested solution in mixture with the bacteria solution. EC<sub>50</sub> on *Vibrio fischeri* were measured with three incubation times (5, 15 and 30 min) and are reported in the supplementary data file SD-7. Measurements carried out at 50% v:v in the bacteria solution show that the solution irradiated for 100 min leads to an inhibition percentage twice that of the reference solution. Toxicity increases up to 100 min of photolysis and remains stable after this time, which corresponds to total degradation of  $\alpha$ -tocopherol. A slight difference is noted between the EC<sub>50</sub> determined at 5, 15 and 30 min, which can be interpreted in terms of chronic toxicity.



**Figure 5: Response-dose curves for the reference and irradiated solutions of  $\alpha$ -tocopherol solutions with the *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition test**

**SD 7 - EC50 determined on *Vibrio fischeri* after 3 times of incubation (5 min, 15 min and 30 min)**

Concentration/Irradiation time	Vibrio Fischeri (EC <sub>50</sub> , ppm)		
	5 min	15 min	30 min
150 ppm, not irradiated	NM <sup>a</sup>	NM	NM
200 ppm, not irradiated	52.6	54.7	54.4
150 ppm, 25 minutes	45.6	43.7	42.3
150 ppm, 50 minutes	36.0	31.8	28.8
150 ppm, 75 minutes	23.1	18.7	17.9
150 ppm, 100 minutes	21.2	16.6	14.9
150 ppm, 120 minutes	21.7	17.7	14.9

<sup>a</sup> NM : Non measurable

## VI.4 CONCLUSION

In the present study, the photodegradation of  $\alpha$ -tocopherol under UV-Visible irradiation led to the formation of nine photoproduct families. Six main transformation products were separated and identified using LC-HR-MS/MS while three minor ones were characterized by GC-MS. Different photoreaction mechanisms had to be involved to rationalize the formation of all of them. In many cases, the photodegradation process of  $\alpha$ -tocopherol begins via oxidation of  $\alpha$ -tocopherol through oxygen addition onto the aromatic six-membered ring. PP1 and PP6 isomers result from O<sub>2</sub> 1,2-cycloaddition onto the aromatic ring followed by ring-opening, while PP2, PP3-2, PP3-3 result from 1,4-cycloaddition of O<sub>2</sub> onto the same ring, followed by C<sub>4</sub>H<sub>6</sub> and C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O eliminations. It has been shown that O<sub>2</sub> addition may also occur on the aliphatic chain. Concerted hydrogen transfer and radical hydroxyl elimination following this addition led to the formation of the ten PP4 isomers. PP5 formation begins by the elimination of the hydrogen atom carried by the hydroxyl group, leading to the well know  $\alpha$ -tocopheryl radical through photoinduced direct cleavage, and consecutive hydrogen eliminations from methyl groups, and from the non-aromatic six-membered ring. Finally, ketone PP7 results from opening of the tetrahydropyran and PP8 results from opening of PP1-1 through a Norrish-type photoinduced reaction. In the present work, a real cosmetic emulsion containing  $\alpha$ -tocopherol as antioxydant agent was submitted to irradiation under laboratory conditions.

Some PP6 and PP4 photoproducts were detected, demonstrating the suitability of the methodology to investigate the phototransformation of regulated cosmetic raw material, and detect their potentially hazardous by-products in complex matrices like personal care product. The results of *in vitro* assays on *Vibrio fischeri* bacteria showed that the global ecotoxicity of the  $\alpha$ -tocopherol solution significantly increases with irradiation time. PP5-1 should likely contribute to this ecotoxicity enhancement since *in silico* estimations for *D. magna* provide a LC50 value 4 times lower than that of the parent molecule.

## Synthèse des principaux résultats de cette étude

Neuf familles de photoproduits ont été caractérisées suite à l'analyse des solutions d'alpha-tocophérol et d'un analogue deutéré de l'antioxydant irradiées dans l'UV-visible. Six familles de produits de transformation ont été séparées et identifiées par LC-HR-MS/MS tandis que trois photoproduits, mineurs en abondance, ont été caractérisés par GC-MS. La connaissance des structures des différents photoproduits et la comparaison des résultats obtenus à partir de solutions dégazées et non dégazées ont permis de postuler des mécanismes de phototransformation selon la présence ou l'absence d'oxygène dissous.

Différents chemins réactionnels ont été proposés pour expliquer la formation des photoproduits. Dans la majorité des cas, le processus de photodégradation commence par l'oxydation de l'alpha-tocophérol sur le cycle aromatique à six centres. Deux types de cycloadditions impliqués dans les chemins réactionnels ont été observés : deux isomères résultent d'une 1,2-cycloaddition suivie de l'ouverture du cycle, tandis que trois autres résultent d'une 1,4-cycloaddition, suivie d'éliminations de  $C_4H_6$  et de  $C_3H_4O$ . Une élimination concertée de méthane et une réaction photoinduite de type Norrish ont été observés sur deux des photoproduits résultant d'une cycloaddition.

Cette étude a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'oxydation de la chaîne aliphatique de l'alpha-tocophérol. Le transfert d'hydrogène concerté et l'élimination radicalaire de l'hydroxyle après l'addition d' $O_2$  sur la chaîne aliphatique ont conduit à la formation de nombreux isomères.

D'autres mécanismes ne faisant pas intervenir l'addition d' $O_2$  ont également été observés. Les éliminations consécutives d'hydrogène à partir des groupes méthyles, et du cycle non aromatique à six centres conduisent à la formation de deux isomères. Deux autres isomères résultent de l'élimination photoinduite de l'atome d'hydrogène porté par le groupe hydroxyle, conduisant par clivage direct au radical  $\alpha$ -tocophéryle, souvent décrit dans la littérature. Enfin, la cétone photoformée résulte de l'ouverture du tétrahydropyrane.

La prédiction *in silico* par tests QSAR concernant la DL50 par voie orale chez le rat a indiqué que les photoproduits ont potentiellement un profil toxicologique différent de celui de la molécule mère. Les DL50 prédites indiquent que deux photoproduits se rapportent à un profil toxicologique modéré et les autres à un profil toxicologique considéré léger alors que l'alpha-tocophérol est classé « pratiquement non toxique ». De plus, une toxicité potentiellement

supérieure à celle de la molécule parente a également été calculée vis-à-vis de l'espèce *Daphnia magna* (daphnies) dans les cas des isomères classés modérément toxiques.

Les résultats des essais *in vitro* sur les bactéries *Vibrio fischeri* ont montré que l'écotoxicité globale de la solution d'alpha-tocophérol augmente significativement avec le temps d'irradiation.

Une émulsion H/E a été irradiée dans les mêmes conditions que la solution d'alpha-tocophérol ; l'analyse ciblée des photoproduits caractérisés dans l'acétonitrile a permis la détection de certains isomères. La méthodologie adoptée semble donc pertinente pour étudier la phototransformation d'une matière première cosmétique réglementée et détecter des sous-produits potentiellement toxiques dans des matrices aussi complexes que certains produits de soins personnels.

## Références bibliographiques

- [1] M. Waghmode, M. Kamble, A. Shruti, Pharmaceutical profile of alpha-tocopherol – A brief review, *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 1 (3) (2012) 1023-1039.
- [2] M.G. Traber, Utilization of Vitamin E, *Biofactors* 10 (1999) 115-120.
- [3] R. Ricciarelli, J.M. Zingg, A. Azzi, The 80<sup>th</sup> Anniversary of Vitamin E: beyond its antioxidant properties, *Biol. Chem.* 383 (3-4) (2002) 457-465.
- [4] G.W. Burton, K.U. Ingold, Vitamine E: Application of the Principles of Physical Organic Chemistry to the exploration of its Structure and Function, *Acc. Chem. Res.* 19 (7) (1986) 194-201.
- [5] M.C. Allwood, J.H. Plane, The wavelength-dependent degradation of Vitamin A exposed to ultraviolet radiation, *Int. J. Pharm.* 31 (1986) 1-7.
- [6] M.C. Allwood, J.H. Plane, The degradation of vitamin A exposed to ultraviolet radiation, *Int. J. Pharm.* 19 (1984) 207-213.
- [7] M.C. Allwood, The influence of light on vitamin A degradation during administration, *Clin. Nutr.* 1 (1982) 63-70.
- [8] E. Psomiadou, M. Tsimidou, Stability of virgin olive oil. 1. Autoxydation studies, *J. Agric. Food. Chem.* 50 (2002) 716-721.
- [9] E. Psomiadou, M. Tsimidou, Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxydation studies, *J. Agric. Food. Chem.* 50 (2002) 722-727.
- [10] C.M. Sabliov, C. Fronczek, C.E. Astete, M. Khachatryan, L. Khachatryan, C. Leonardi, Effect of temperature and UV light on degradation of  $\alpha$ -tocopherol in free and dissolved form, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (2009) 895-902.
- [11] F.M. Pirisi, A. Angioni, G. Bandino, P. Cabras, C. Guillou, E. Maccioni, F. Reniero, Photolysis of  $\alpha$ -tocopherol in olive oils and model systems, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4529-4533.
- [12] K.A. Kramer, D.C. Liebler, UVB induced photooxidation of vitamin E, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 219-224.
- [13] T. Miyazawa, T. Yamashita, K. Fujimoto, Chemiluminescence detection of 8a hydroperoxy-tocopherone in photooxidized  $\alpha$ -tocopherol, *Lipids* 27 (1992) 289-294.
- [14] G.W. Grams, K. Eskins, G.E. Inglett, Dye-sensitized photooxidation of  $\alpha$ -tocopherol, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 866-868.



- [15] Y. Zhang, Y.A. Yousef, H. Li, T.B. Melø, K. Razi Naqvi, Comparison of the photochemical behaviors of  $\alpha$ -tocopherol and its acetate in organic and aqueous micellar solutions, *J. Phys. Chem. A* 115 (2011) 8242-8247.
- [16] E.S. Krol, D.D. Escalante, D.C. Liebler, Mechanisms of dimer and trimer formation from ultraviolet-irradiated  $\alpha$ -tocopherol, *Lipids* 36 (2001) 49-55.
- [17] <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>, last accessed July 26 2017.
- [18] ISO. Water quality. Freshwater Algal Growth Inhibition Test with Unicellular Green Algae, International Organization for Standardization, Switzerland, 1998, pp. 11348-11353.
- [19] J.M. Achord, C.L. Hussey, Determination of dissolved oxygen in nonaqueous electrochemical solvents, *Anal. Chem.* 52 (1980) 601-602.
- [20] P.D. Bartlett, G.D. Mendenhall, A.P. Schaap, Competitive modes of reaction of singlet oxygen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 171 (1970) 79-88.
- [21] L.R. Gaspar, P.M. Campos, Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E, *Int. J. Pharm* 343 (2007) 181-189.
- [22] T. Guaratini, M.D. Gianeti, P.M. Campos, Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: Chemical and physical aspects, *Int. J. Pharm* 327 (2006) 12-16.
- [23] G.H. Wheldon, A. Bhatt, P. Keller, H. Hummler, d,1- $\alpha$ -Tocopheryl acetate (vitamin E): a long term toxicity and carcinogenicity study in rats, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 53 (1983) 287-296.
- [24] H. Kappus, A.T. Diplock, Tolerance and safety of Vitamin E: A toxicological position report, *Free Radic. Biol. Med.* 13 (1992) 55-74.
- [25] J.A. Black, W.J. Birge, A.G. Westerman, P.C. Francis, Comparative Aquatic Toxicology of aromatic hydrocarbons, *Fundam. Appl. Toxicol.* 3 (1983) 353-358.
- [26] E. Gebhart, H. Wagner, K. Grziwok, H. Behnsen, The action of anticlastogens in human lymphocyte cultures and their modification by rat-liver S9 mix. II. Studies with vitamins C and E, *Mutat Res* 149 (1985) 83-94.
- [27] E.B. Hook, K.M. Healy, A.M. Niles, R.G. Skalko, Vitamin E: Teratogen or Anti-Teratogen? *Lancet* 1 (1974) 809.
- [28] T.H. Shepard, *Catalog of Teratogenic Agents*. 13th ed. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press, (2010) 478.

- [29] D.W. Cheng, T.A. Bairnson, S.A.N. Rao, S. Subbammal, Effect of variations on the incidence of teratogenicity in vitamin E-deficient rats, *J. Nutr.* 71 (1960) 54-60.
- [30] C.E. Steele, E.H. Jeffery, A.T. Diplock, The effect of vitamin E and synthetic antioxidants on the growth in vitro of explanted rat embryos, *J. Reprod. Fertil.* 38 (1974) 115-123.
- [31] L.S. Hurley, D.D. Dungan, C.L. Keen, B. Lönnerdal, The effects of vitamin E on zinc deficiency teratogenesis in rats, *J. Nutr.* 113 (1983) 1875-1877.



---

**CHAPITRE VII - Phototransformation  
dans l'ultraviolet-visible de l'acide  
déhydroacétique - Elucidation structurale  
et estimation de l'écotoxicité globale des  
photoproduits**

---



## Présentation générale des travaux publiés

L'acide déhydroacétique (DHA) est un composé organique hétérocyclique dérivé de la 2-pyrone. Il se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche peu soluble dans l'eau (690 mg/L à 25 °C) et modérément soluble dans la plupart des solvants organiques. L'acide déhydroacétique est issu de sources naturelles, on le retrouve notamment dans les fleurs de *Solandra*. Cependant, du fait de son extraction très onéreuse à partir des végétaux, sa production est principalement industrielle.

L'acide déhydroacétique et son sel (déhydroacétate de sodium) sont utilisés comme conservateurs en raison de leurs activités antibactériennes et antifongiques. L'acide déhydroacétique est répertorié dans la norme internationale du *Codex Alimentarius* en tant que conservateur alimentaire. Il est également utilisé comme conservateur dans les produits cosmétiques. L'annexe V du Règlement (CE) 1223/2009 limite son utilisation à 0,6% dans les produits finis et l'interdit dans les aérosols.

L'action antimicrobienne de l'acide déhydroacétique est similaire à celle exercée par les acides faibles organiques. En solution, l'acide déhydroacétique se trouve dans un état d'équilibre entre la forme dissociée ( $A^-$ ) et la forme non dissociée (HA). À pH faible, la concentration élevée en protons pousse l'équilibre vers la forme non dissociée, qui traverse facilement la membrane cytoplasmique des micro-organismes. Une fois dans le cytoplasme, la forme dissociée et chargée  $A^-$  prédomine en raison du pH plus élevé du milieu. Le conservateur ne peut donc plus traverser la membrane cytoplasmique. Il se trouve piégé à l'intérieur du germe et applique son action antimicrobienne. Les Gram + ne possédant pas de membrane externe (contrairement aux Gram -), ils sont plus sensibles à l'action de l'acide déhydroacétique.

L'acide déhydroacétique et son sel sont largement utilisés dans ce que l'on appelle communément les « cosmétiques bio ». La cosmétique bio tente à limiter ou exclure l'utilisation de substances pouvant entraîner des effets nocifs pour l'utilisateur (allergies, cancer...) ou l'environnement (utilisation de procédés de fabrication polluants, effets nocifs sur les organismes vivants...). Cependant, le comportement et la dégradation du DHA sont peu étudiés dans la littérature. Sous exposition directe à une irradiation UV-visible, la photodégradation du conservateur peut se produire, en particulier lorsqu'il se trouve en

contact prolongé avec la peau. Son exposition peut entraîner une perte de son efficacité et produire des photoproduits potentiellement dangereux.

Cette étude est consacrée à l'élucidation structurale des sous-produits issus de l'irradiation UV-visible directe du DHA. Les expériences de photolyse ont été réalisées avec une enceinte de vieillissement accélérée. Des solutions de DHA préparées dans l'acétonitrile et dans un mélange eau/acétonitrile ont été irradiées. Une étude cinétique a été menée sur 48 h d'irradiation.

Les solutions ont été analysées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse à piège à ions et d'une chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse à ultra haute résolution (LC-UHRMS). La combinaison de la haute résolution et de la spectrométrie de masse en tandem a permis la caractérisation des principaux photoproduits.

Les toxicités potentielles des produits de transformation ont été estimées avec des méthodes *in silico* de type QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) et par des essais biologiques *in vitro* sur des bactéries marines *Vibrio fischeri*.

La dernière étape de cette étude a consisté en l'irradiation d'une émulsion H/E contenant l'acide déhydroacétique en tant que conservateur. Enfin, l'analyse ciblée des photoproduits caractérisés a été effectuée afin de confirmer la formation des photoproduits majoritaires en matrice cosmétique.

# **UV-visible phototransformation of dehydroacetic acid - Structural characterization of photoproducts and global ecotoxicity**

Ségolène De Vaugelade<sup>1,2</sup>, Edith Nicol<sup>1</sup>, Svetlana Vujovic<sup>1</sup>, Sophie Bourcier<sup>1</sup>, Stéphane Pirnay<sup>2</sup>, Stéphane Bouchonnet<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Moléculaire, École polytechnique, UMR-9168, 91128 Palaiseau Cedex, France

<sup>2</sup> EXPERTOX Laboratory, 14 rue Godefroy Cavaignac, 75011 PARIS, France

\* Corresponding author, e-mail: [stephane.bouchonnet@polytechnique.edu](mailto:stephane.bouchonnet@polytechnique.edu)

Soumis à *Rapid Communications in Mass Spectrometry*



## Abstract

**RATIONALE:** The present work is devoted to the structural elucidation of by-products issued from the direct UV-visible irradiation of dehydroacetic acid (DHA) in solution and in cosmetic emulsion.

**METHODS:** Analyses were carried out using a gas chromatography coupled with an ion trap mass spectrometer and by a high performance liquid chromatography coupled with ultrahigh resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (LC-UHRMS). The potential toxicities of by-products were estimated by *in silico* calculations based on a QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) approach and by *in vitro* bioassays conducted on *Vibrio fischeri* bacteria.

**RESULTS:** Three photoproducts were detected by LC-MS while one photoproduct was detected by GC-MS. The first photoproduct (PP1) corresponds to an isomer of DHA while two isomeric compounds, correspond to dimeric structures. The oral rat LD50 of PP1 was evaluated to be 4.5 times lower than that of the parent molecule which classes it in the category “moderately toxic” on the Hodge and Sterne toxicity classification. *In vitro* assays on *Vibrio fischeri* bacteria showed that the global ecotoxicity of the DHA solution increases with irradiation time.

**CONCLUSIONS:** At the exception of one photoproduct, the structures proposed for the photoproducts in the basis of mass spectra interpretation have not been reported in previous studies. All photoproducts, except of dimers, were detected after irradiation in the cosmetic emulsion. This result shows that personal care products containing DHA must be protected from direct sunlight to prevent photodegradation.

## VII.1 INTRODUCTION

Dehydroacetic acid is a heterocyclic compound (3-acetyl-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-one, DHA) largely used in organic synthesis and well known for its physiological properties, which offers many industrial applications. It is an odorless white powder obtained from both natural (Solandra flowers) and synthetic sources. DHA and its salt (sodium dehydroacetate) are widely used as preservatives to prevent alteration and degradation of a wide variety of products because of their antibacterial and antifungal activities.<sup>[1]</sup> Dehydroacetic acid is listed in the International Codex Alimentarius Standard as a preservative.<sup>[2]</sup> In the lack of general instructions, it seems to be used in preventing the growth of microbial and fungal infections on fruits and vegetables as mango, strawberries, raspberries, or in addition to the discoloration and decay treatments of shredded lettuce.<sup>[3-5]</sup> DHA is also used as a cosmetics preservative, listed in the Annex V of Regulation 1223/2009, limited at 0.6% in finished products, and forbidden in aerosols.<sup>[6]</sup> DHA is also used in some anti-enzyme toothpastes. It acts against microorganisms in a way similar to that of other weak organic acids. In solution, the equilibrium between the DHA dissociated form ( $A^-$ ) and the non-dissociated form (HA) is pH dependent. At low pH, the high proton concentration pushes the equilibrium toward the undissociated form, which easily crosses the cytoplasmic membrane of microorganisms. Once in the cytoplasm, the dissociated and charged form ( $A^-$ ) takes over because of the higher pH; it therefore can no longer cross the cytoplasmic membrane and the preservative trapped inside the germ applies its antimicrobial action.<sup>[7]</sup> DHA can be used in a mixture of preservatives to permit a wider profile of activity against microorganisms. The resulting toxicity of such a mixture may be lower than that provided by the use of a single-component solution, due to dilution effects. In cosmetic field, the most manufactured mixture is composed of water with 85-89% of benzyl alcohol and 7.7-8.3% of DHA.<sup>[8]</sup>

Today, following the growth of the global natural cosmetics market, DHA, which is permitted by ECOCERT, COSMOS, NaTrue and Soil associations, is largely used in skin care products.<sup>[9-12]</sup> However, the behavior and degradation of DHA incorporated in cosmetic systems are poorly studied in the literature. Under direct exposure to UV-vis irradiation, photodegradation of the preservative may occur, particularly when it intends to be in prolonged contact with the skin. Exposure to artificial or solar light can cause a loose in preservative efficiency; it may also produce potentially hazardous photoproducts. In 1971, Sugiyama *et al.* were interested in the photoreaction of DHA in the solid state in thin layers

irradiated for a week using a high-pressure mercury lamp. Results showed the formation of a dimeric structure. A head-to-tail form was proposed by the authors based on NMR analysis.<sup>[13]</sup> In 1995, Liu Hongfang *et al.* have studied the degradation of dehydroacetic acid in cheese samples at different storage times.<sup>[14]</sup> Benassi *et al.* studied the dehydroacetic acid sodium salt stability in presence of other cosmetic preservatives. A new molecule corresponding to 3,7-dimethyl-1H,9H,10H, dipyrano (4,3-b:3',4'-e) pyran-1,9-dione has been shown to be spontaneously formed by reaction between DHA and free or released formaldehyde.<sup>[15]</sup>

The present work is devoted to the structural elucidation of by-products issued from the direct UV-visible irradiation of DHA. Photolysis experiments were performed with a Q-SUN test chamber equipped with a xenon arc lamp and a natural light filter. A first approach was conducted on by-product identification in both acetonitrile and 50:50 acetonitrile/pure water solutions of DHA irradiated up to 48 hours. Then a targeted screening analysis of photoproducts was conducted in a UV-irradiated personal care product (oil-in-water emulsion). Analyses were carried out using gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and high-performance liquid chromatography coupled with ultrahigh resolution tandem mass spectrometry (LC-UHR-MS). The global *in vitro* ecotoxicity of the irradiated solution was investigated, using bioassays on *Vibrio fischeri* bacteria and the potential toxicities of transformation products were individually estimated *in silico*, with the Toxicity Estimation Software Tool (T.E.S.T.).

## VII.2 EXPERIMENTAL

### VII.2.1 Chemicals and reagents

Dehydroacetic acid ( $\geq 98.0\%$  purity) was purchased from Merck Chimie (Fontenay sous Bois, France). The molecular structure of DHA is provided in Fig. 1. 2,6-Dimethyl- $\gamma$ -pyrone (99% purity) was purchased from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). The chromatographic grade solvents used were: methanol (99.99% purity), formic acid (FA), dichloromethane (DCM, 99.99% purity) purchased from Sigma Aldrich, and water of Milli-Q quality (Millipore, Molsheim, France). A personal care emulsion containing 675 mg/L of DHA as preservative agent was obtained from the cosmetic formulation laboratory Onyline (La Neuville en Hez, France).

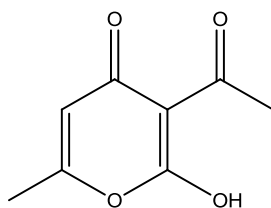


Figure 1 : Chemical structure of DHA

### VII.2.2 Sample preparation

50 mL DHA solutions were prepared in quartz tubes at the concentration used in the tested cosmetic cream: 675 mg/L. A first solution was prepared in acetonitrile, a second one in a H<sub>2</sub>O/acetonitrile (50:50 v:v) mixture. A volume of 1 mL was taken at different irradiation times for the kinetics approach. The collected samples were diluted in a methanol/H<sub>2</sub>O (80:20 v:v) mixture supplemented with 0.1% FA before LC-UHR-MS analysis. For GC-MS analysis, the collected samples from the second solution were dried under a gentle nitrogen stream before addition of dichloromethane. A degassed solution was prepared in an inert atmosphere glove box (Vacuum Atmospheres Corps) with Argon as the inert gas. The pure DHA standard was kept under argon 24 hours before preparation. O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O concentrations were less than 2 ppm. Air and water free acetonitrile was used for the preparation of the degassed solution. The quartz tube was filled and hermetically closed in a glove box before photolysis. For the study devoted to cosmetic cream irradiation, 10 g of cream were spread out in a crystallizer which was covered by a quartz lid to avoid evaporation.

### **VII.2.3 Sample extraction**

The extraction process of DHA and its photoproducts from cosmetic samples was conducted as follows: 1 g of cream was weighed into a plastic falcon tube, 10 mL of methanol were added and the mixture was vortexed and immersed for 1 hour in an ultrasonic bath heated at 60 °C, to melt the lipidic phase and to facilitate the extraction of active components into acetonitrile. The tube was then centrifuged for 20 minutes at 3000 rpm. The supernatant was filtered on a syringe filter with a polytetrafluoroethylene membrane (0.45 µm/13 mm) from VWR (Fontenay sous Bois, France) before GC/MS and LC-MS analysis.

### **VII.2.4 Photolysis experiments**

Photodegradation experiments were conducted using a Q-SUN test chamber (Xe-1-B/S, Q-Lab Saarbücken, Germany) equipped with a xenon arc lamp (X-7640, Q-Lab Saarbücken, Germany). A natural light filter (X-7640, Q-Lab Saarbücken, Germany) was used for a realistic reproduction of the full sunlight spectrum. The lamp power was 1800 W and the irradiation 0.68 W/m<sup>2</sup> at a black-standard temperature of 55 °C. Irradiation control was maintained between 300 and 800 nm. Samples were taken for analysis at ten irradiation times: 0 (reference), 5, 10, 30, 60, 120, 240, 720, 1440 and 2880 min.

### **VII.2.5 GC-MS operating conditions**

A 450-GC gas chromatograph equipped with a CP-8400 autosampler and coupled with a 240-MS mass spectrometer (Agilent technologies, Les Ulis - France) was used for GC-MS analysis. The system was operated in the internal ionization mode. Separation was carried out on a CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS capillary column, with a stationary phase made of 5% diphenylsiloxane and 95% dimethylsiloxane (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness; Agilent, Waghäusel, Germany). High-purity helium (99.999%) was used as the carrier gas, at a constant flow of 1.4 mL.min<sup>-1</sup>. The oven temperature was programmed from 50 °C (held for 0.5 min) to 300 °C at 15 °C/min, and hold at 300 °C for 5 min for a total acquisition time of 22.17 min. 1 µL of sample was automatically injected in the splitless mode (split valve closed for 1.5 min). The injector temperature was 280 °C. Ion-trap electrodes, manifold and transfer line were held at 200 °C, 100 °C and 280 °C, respectively. Ionization was operated in the chemical ionization (CI) mode with methanol as reactant. Spectra were recorded using the automatic gain control (AGC) function with a target value of 5000. The filament emission

current was set at 50  $\mu\text{A}$ . The multiplier voltage was set to 2200 V ( $10^5$  gain) by automatic tuning. The mass spectrometry detector was operated in the full scan acquisition mode, on a  $m/z$  range from 50 to 500 Th at a frequency of 3 spectra/s. In multi-stage mass spectrometry ( $\text{MS}^n$ ) experiments, precursor ions were stored with a Paul stability parameter ( $qz$ ) of 0.30 and fragmented by collision-induced dissociation in the resonant excitation mode with activation energies ranging from 0.30 to 0.80 V.

### VII.2.6 LC-MS operating conditions

Liquid chromatography-mass spectrometry analyses were performed with an ultrahigh-resolution SolarixXR FT-ICR 9.4 T mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), coupled with a HPLC Alliance 2690 (Water Technologies, Saint-Quentin en Yvelines, France). Separations were carried out using a C18 Pursuit-XRs Ultra 2.8  $\mu\text{m}$  50 mm x 2.0 mm column (Agilent Technologies, Les Ulis, France) in the gradient mode. The mobile phase was made of A ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , formic acid 0.1%) and B ( $\text{H}_2\text{O}$ , formic acid 0.1%). Percentage of solvent A was increased from an initial value of 80% to 100% in 20 min and kept at 100% for 20 min. The gradient was then set at 80% of B for the last 10 min. For all experiments, 10  $\mu\text{L}$  of sample were injected and the flow rate was set at 0.1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Electrospray ionization was operated in the positive ion mode. Capillary and end plate voltages were set at -4.5 kV and -0.5 kV, respectively. Nitrogen was used as nebulizer and drying gas at 1 bar and 5  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively, with a drying temperature of 300  $^\circ\text{C}$ . Ions were accumulated for 0.1 s in the collision cell. Time of flight was set at 0.8 ms. Detection of ions in the ICR cell was set with a resolution of 4 Mpt (4.106 data points acquired) from  $m/z$  57.74 to  $m/z$  1000, with a 0.8389 transient duration in the broadband mode. One acquired scan was recorded for each spectrum, corresponding to MS or MS/MS duty cycles of approximately 1.03 s. In CID experiments, the precursor ion was isolated in the quadrupole with a window of 1 to 2 Da and submitted to collision induced dissociation with collision energies of 0, 10 and 20 V. Elementary compositions of ions were determined using the DataAnalysis software with a 3 ppm tolerance.

### VII.2.7 **In silico toxicity estimations**

Computational methods included in the Toxicity Estimation Software Tool (T.E.S.T) were used to manage toxicity prediction. T.E.S.T. is an open-source application developed by the U.S. Environmental Protection Agency. It estimates the toxicity values and physical properties of compounds by applying a variety of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) mathematical models. The program provides a variety of toxicity endpoints from the physical properties of the molecular structure. For example, the simple linear function (1) of molecular descriptors such as the molecular weight and the octanol-water partition coefficient can be used to estimate the toxicity of chemicals.

$$\text{Toxicity} = ax_1 + bx_2 + c \quad (1)$$

where  $x_1$  and  $x_2$  are independent descriptor variables and  $a$ ,  $b$ , and  $c$  are fitted parameters. Prediction is based on each model's prediction, as well as a consensus average, which has been shown to achieve the best prediction results during external validation. For example, in the 96-hour fathead minnow LC50 test, the consensus approach achieved the best results in terms of all prediction statistics; it has thus been retained for toxicity predictions.

### VII.2.8 **Ecotoxicological assays**

The LUMIStox® test kit was used to evaluate the ecotoxicology of the dehydroacetic acid solutions before irradiation and after several irradiation times: 0, 8, 24, and 48 hours. Estimation is based on the inhibition of the luminescence induced by the marine bacteria *Vibrio fischeri*. The freeze-dried luminescent bacteria and specific equipments, including the LUMIStox measuring station and a Lumistherm thermostat were purchased from Hach Lange (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany). The experimental method used in this study is based on the ISO 11348-3 protocol (1998). Reactivation of freeze-dried bacteria was achieved by adding 1.3 mL of a saline solution provided by the manufacturer. The reconstituted solution had to be equilibrated for at least 30 minutes at 4 °C before testing. Ready bacterial suspension could be used for the next 4 hours. A working solution of luminescent bacteria was prepared by adding 500 µL of the reconstituted solution in 12.5 mL of the reagent diluent provided by the manufacturer and kept at 15 °C in the incubator block. pH of solutions before and after irradiation were adjusted between 5.5 and 7.0 with sodium hydroxide. Analyses were performed using a range of diluted aqueous solutions (from 0 to 100%) from a DHA

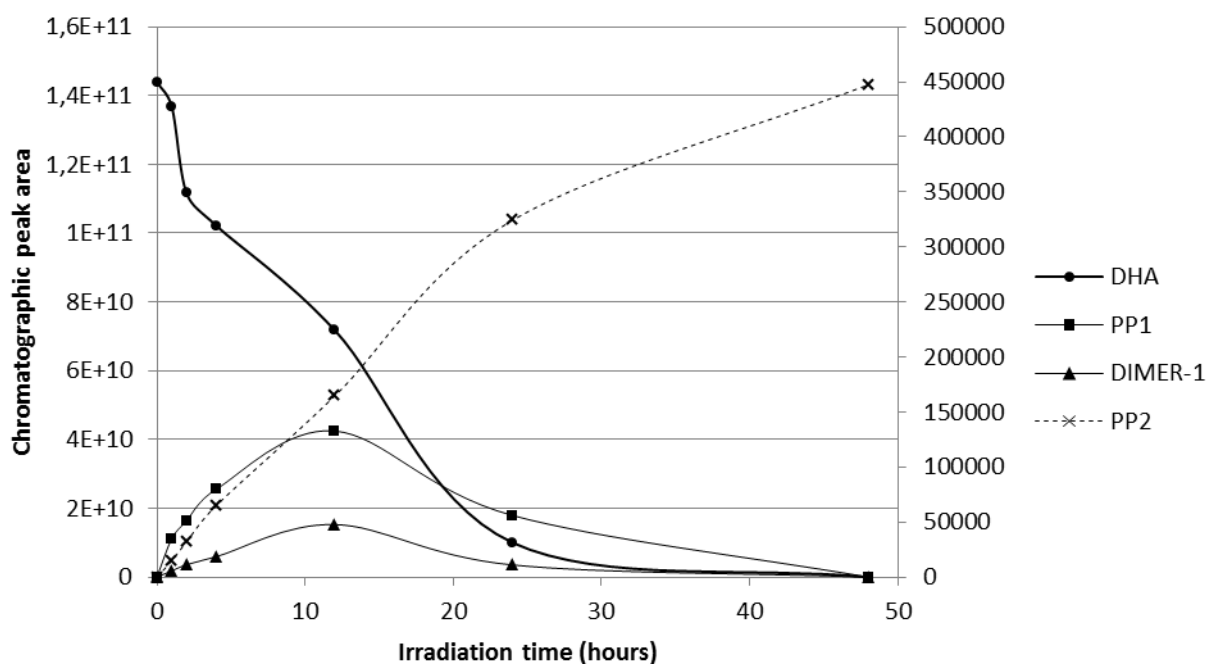
solution initially at 400 µg/mL. Each dilution was tested in duplicate. A fixed amount of the reconstituted bacteria suspension was added to the dilution vials. After 5, 15, and 30 min of exposure to the irradiated solution, the light output of the luminescent bacteria was measured and compared with a blank control sample. The effective nominal concentration leading to 50% inhibition of bioluminescence after exposure for 5, 15 or 30 min was designated as the EC<sub>50</sub> value.

## VII.3 RESULTS AND DISCUSSION

### VII.3.1 Relative amounts of photoproducts and kinetic data

Four photoproducts were detected in the ACN solution of DHA after UV-vis irradiation. Three photoproducts, referred as PP1, DIMER-1 and DIMER-2, were detected by LC-HRMS while another photoproduct, referred as PP2 was detected by GC-MS. The relative amounts of DHA and its photoproducts were estimated by integrating the chromatographic peaks on the MH<sup>+</sup> ionic current on GC-MS and LC-MS chromatograms. The relative amounts are plotted as a function of the irradiation time in Fig. 2, except for DIMER-2 because of its too low concentration compared with the other species; its kinetics follow that of DIMER-1. It shows that about 70% of the initial amount of DHA was still detected after 4 hours of irradiation and that DHA was no more detected after 48 hours of irradiation. Photoproduct PP1 is globally much more abundant than the dimers. PP1 and dimers are detected after 10 minutes of irradiation and their relative amounts steadily increase to reach a maximum after 12 hours of irradiation and decrease until the end of the experiment. PP2 is a minor photoproduct, which represents only 2% of the degraded amount of DHA. PP2 is more persistent than PP1; it is still present at its maximum concentration after 48 hours of irradiation. The solution irradiated for 4 hours was used for structural elucidation.





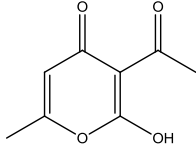
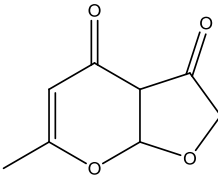
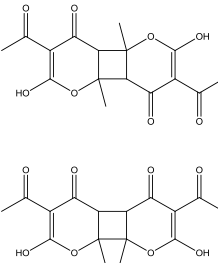
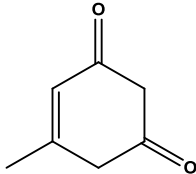
**Figure 2 :** Relative amounts estimated by LC-MS (plain curves, left scale) and GC-MS (dashed curve, right scale) of DHA, PP1, PP2 and DIMER-1 plotted as a function of the irradiation time

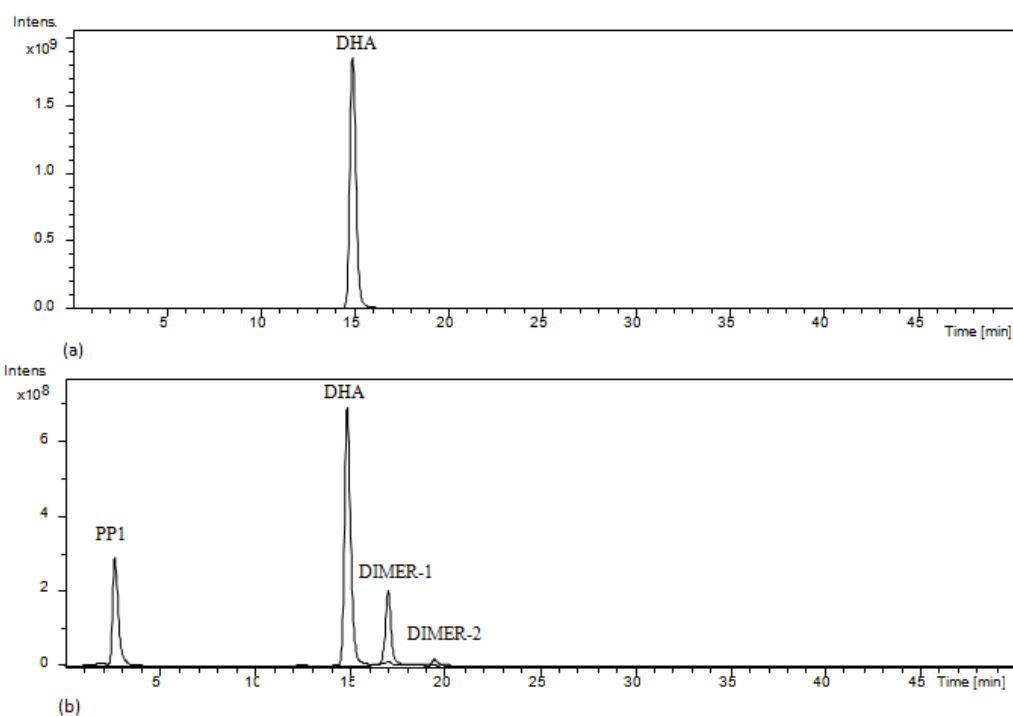
### VII.3.2 Photoproducts characterization

The retention times, the  $m/z$  ratios of  $MH^+$  ions, the main transitions observed in CID experiments and the proposed structures are given in Table 1. In LC-MS, elementary formulae were determined with a tolerance of 3 ppm. The LC-MS and GC-MS chromatograms recorded for the non-irradiated solution and after 8 hours of irradiation are displayed in Fig. 3 and Fig. 4. Formation of dimers has been already reported by N. Sugiyama *et al.*<sup>[13]</sup> The two others photoproducts have never been reported in the literature.

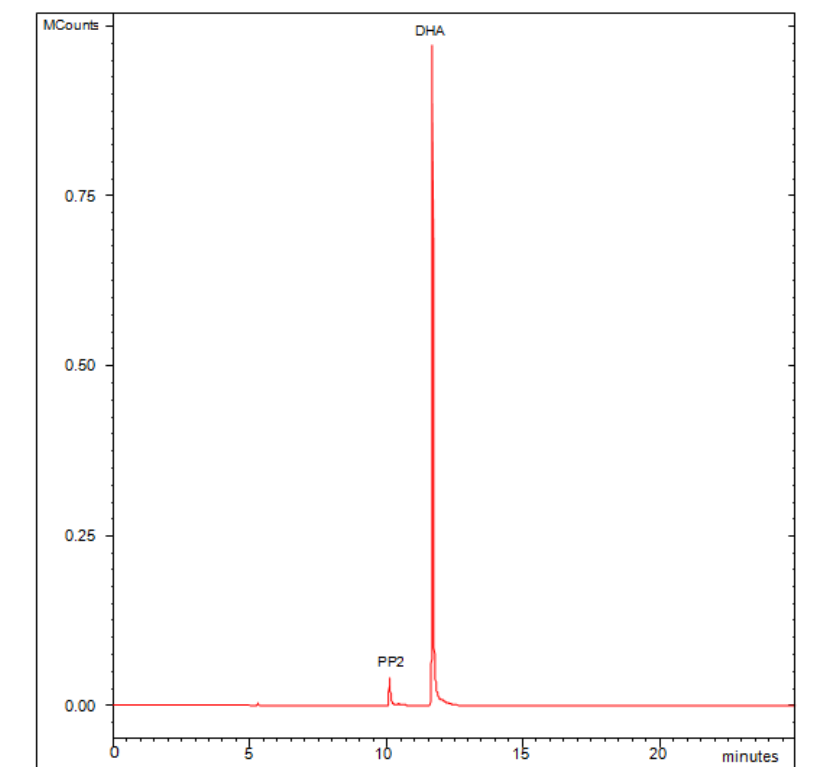
Two other solutions were concomitantly irradiated under the same conditions: DHA in a acetonitrile/water mixture (50:50 v:v) and an ACN solution of DHA previously degassed (see experimental part, section 2.2). In both cases, the same photoproducts were detected in the same amounts.

**Table 1 : Analytical results related to the LC-MS and GC-MS detection of DHA photoproducts**

Compound	Retention time (min)	m/z of MH <sup>+</sup>	Ion raw formula	Main transitions in MS/MS (m/z)	Chemical structure
LC-MS data (ESI+ high resolution)					
DHA	14.95	169.04914	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	169.04921 → 151.03873 169.04921 → 127.03870 127.03870 → 85.02826	
PP1	2.79	169.04954	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	169.04954 → 151.03882 151.03882 → 123.04396 151.03882 → 109.02823 123.04396 → 95.04894	
DIMER-1 and DIMER-2	17.10 and 19.55	337.19116	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> <sup>+</sup>	337.09100 → 319.08055 337.09100 → 253.07008 319.08055 → 301.07007 319.08055 → 277.07009 301.07007 → 235.05957 301.07007 → 259.05610 259.0561 → 193.04923	
GC-MS data (CI+ low resolution)					
PP2	10.07	125	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	125 → 107 125 → 97 107 → 79	



**Figure 3 : LC-MS chromatograms of the dehydroacetic acid solution in acetonitrile, not irradiated (Fig.1a) and irradiated for 4 hours (Fig.1b) (ESI+ mode, extracted ionic currents)**

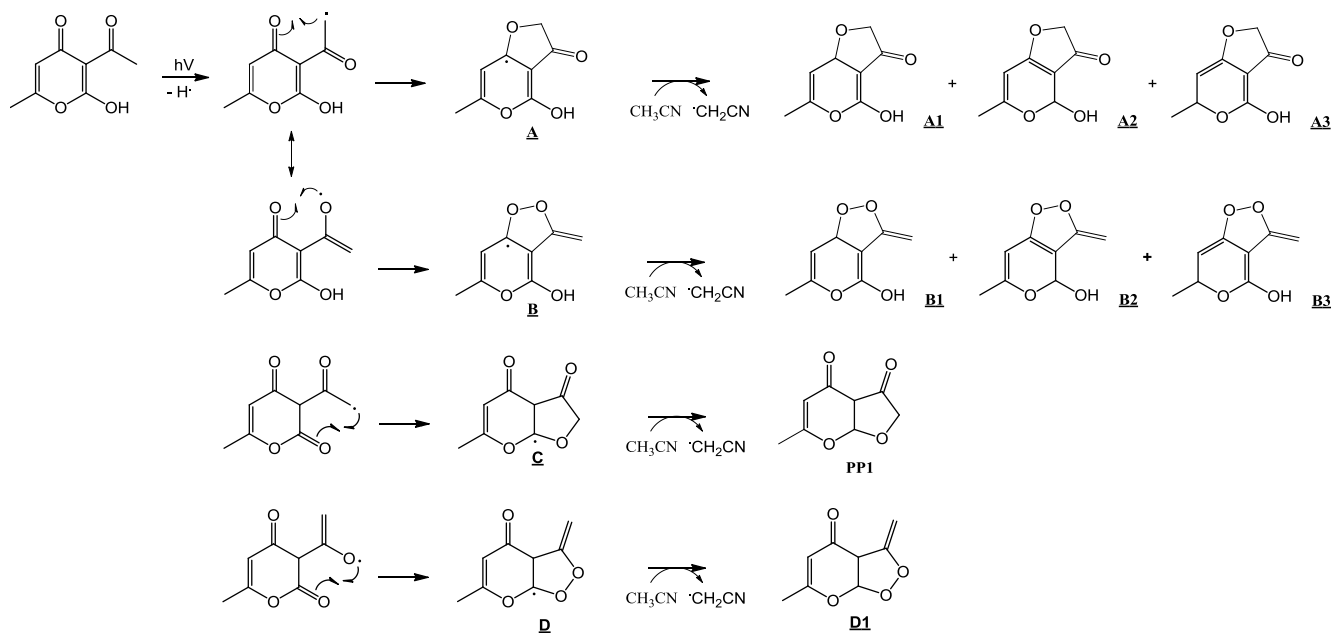


**Figure 4 : GC-MS chromatogram of the dehydroacetic acid solution irradiated for 4 hours in acetonitrile (CI mode, full scan detection)**

## PP1

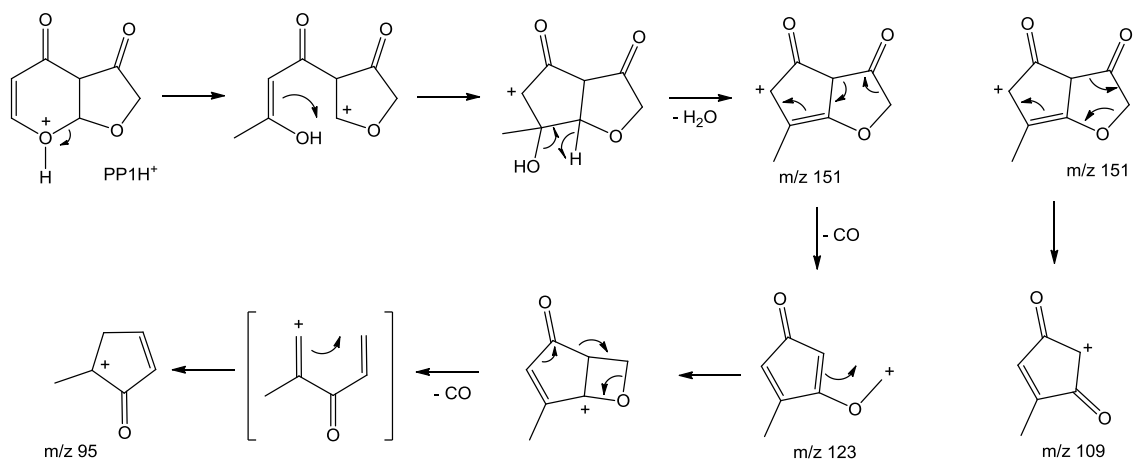
PP1 corresponds to  $C_8H_9O_4$  ( $m/z$  169.04954 for  $MH^+$ ) and is thus an isomer of DHA. According to the Hamilton rule, its short retention time (2.79 min) compared to that of DHA (14.95 min) led us to assume PP1 as a cyclic isomer of DHA.<sup>[16]</sup> As demonstrated in a recent work conducted with deuterated analogues, the phototransformation process can be initiated by hydrogen removal from a hydroxyl group or from a methyl group, provided that the resulting radical is strongly stabilized by inductive and/or mesomeric effects.<sup>[17]</sup> The mechanism postulated in Fig. 5 begins by photoremoval of a hydrogen atom from the methyl group of the keto function. The hypothesis of photoremoval of a hydrogen atom from the other methyl group has been rejected because the resulting radical cannot evolve to a cyclic structure. Cyclization could result from the formation of a five member ring implying both keto functions of DHA, leading to the intermediate radical structures referred as **A** and **B** in Fig. 5. Delocalization of the radical should thus lead, after hydrogen addition ( $H^{\cdot}$  captured from ACN), to the three isomeric structures referred as **A1** to **A3** when issued from intermediate **A**, and to the structures **B1** to **B3** when issued from intermediate **B**. This is not in accordance with the detection of a unique chromatographic peak around 2.8 min. Furthermore, in MS/MS experiments, the corresponding  $MH^+$  ions undergo two successive losses of carbon monoxide (transitions  $m/z$  151.03882  $\rightarrow$   $m/z$  123.04396  $\rightarrow$   $m/z$  95.04894), which are not possible with the mentioned structures.

Cyclisation may also involve the lactone function, to lead to the tertiary radicals referred as **C** and **D** in Fig. 5. Hydrogen atom transfer from the solvent onto **C** and **D** lead to structures **C1** and **D1**, respectively. CID experiments on  $PP1H^+$  show elimination of water, followed by consecutive eliminations of carbon monoxide and  $C_2H_2O$ . Such dissociations are not possible from **D1H**<sup>+</sup>; they are easily rationalized from **C1H**<sup>+</sup>, leading to the conclusion that **C1** corresponds to PP1. Dissociation mechanisms of  $PP1H^+$  in mass spectrometry are provided in the supplementary data file SD1.



**Figure 5 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of PP1**

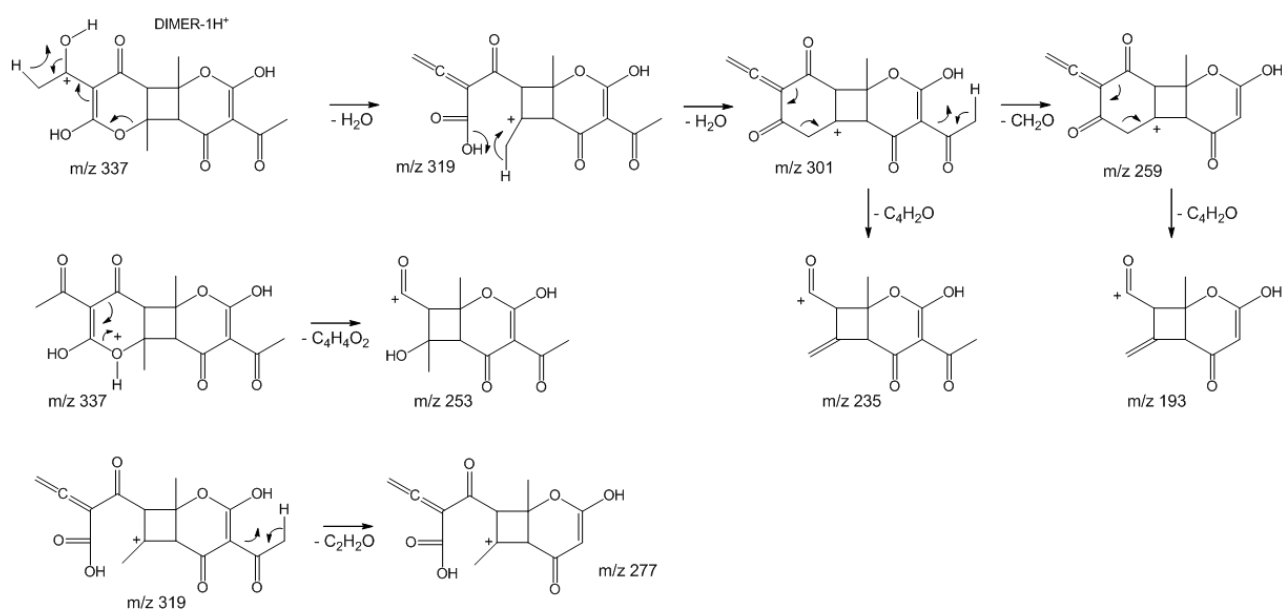
**SD 1 - Collision induced dissociation pathways of protonated photoproducts PP1**



## DIMER-1 and DIMER-2

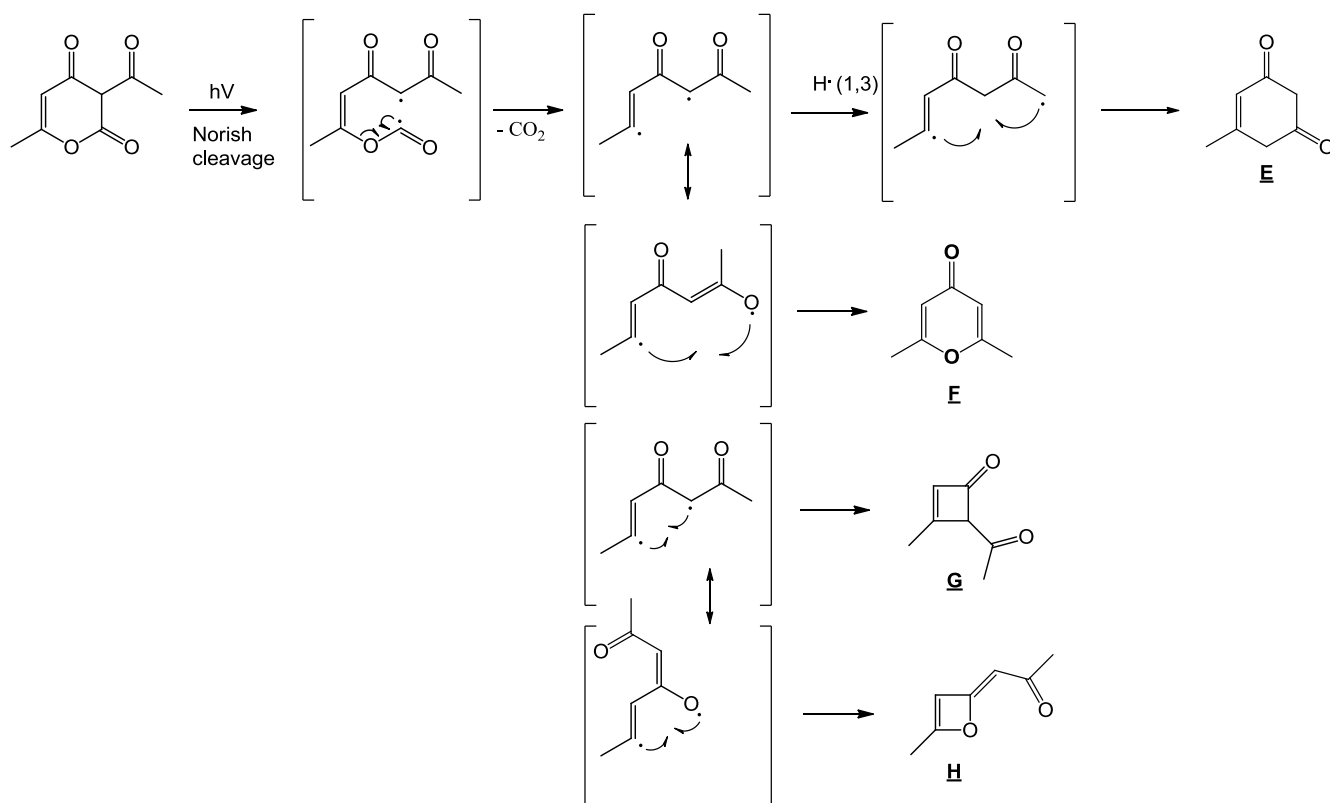
DIMER-1 and DIMER-2 chemical formulae correspond to  $C_{16}H_{17}O_8$  ( $m/z$  337.19116 for  $MH^+$ ); they elute at 17.10 and 19.55 min, respectively. According to its very low amount (see part 3.1) DIMER-2 is negligible compared to PP1 and DIMER-1. Many structures of dimers are possible depending on the way monomers are linked. Differentiation of both dimeric structures is impossible on the basis of their MS/MS spectra which display the same product ions. A dimer of DHA has been previously reported by Sugiyama *et al.* in their study devoted to the photodegradation of dehydroacetic acid in the solid phase, using a high-pressure mercury lamp. The dimeric structure was proposed based on NMR spectrum interpretation. Furthermore, hydrolysis of the dimer provided two structures: 2-acetyl-3,5-xylenol and 2,6-diacetyl-3,5-xylenol, which are in good agreement with the intermediates postulated by Yates for the hydrolysis of cage dimer.<sup>[13;18]</sup> In the present study, the observed transitions for Dimer-1  $H^+$  are in good agreement with the structure postulated by N. Sugiyama *et al.*, as shown in the supplementary data file SD2. The very low amount of DIMER-2, compared to that of DIMER-1, could be the reason why it has not been reported before. A possible structure for DIMER-2 is the corresponding head-to-head configuration (see Table 1) for which all MS/MS transitions can be explained.

### SD 2 - Collision induced dissociation pathways of protonated DIMER-1



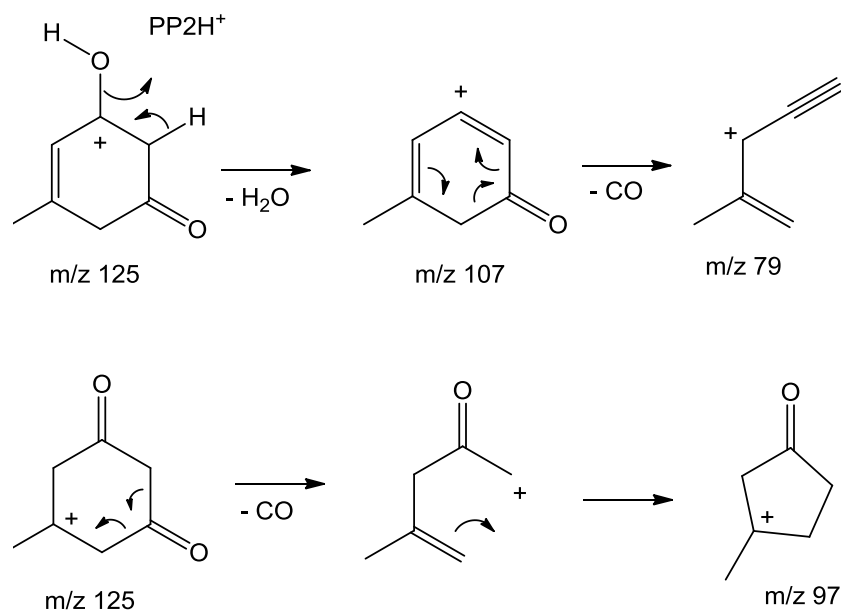
## PP2

PP2 corresponds to  $C_7H_9O_2$  ( $m/z$  125 for  $MH^+$ ); it elutes at 10.1 min in GC-MS. PP2 is assumed to result from the opening of DHA through a Norrish-type photoinduced reaction followed by carbon dioxide elimination and cyclisation. The postulated phototransformation pathways are illustrated in Fig. 6. Cyclisation into a six-membered ring was first postulated to result in 2,6-dimethyl- $\gamma$ -pyrone (structure **E** in Fig. 6). GC-MS analysis of the corresponding standard solution has shown a retention time greater than that of PP2 (10.40 vs 10.07 min) and different MS/MS fragmentation pathways ( $m/z$  87 is the most representative peak in the mass spectra). Cyclisation into a four-membered ring could also occur (structures **G** and **H** in Fig. 6), but the close retention times of the photoproduct and 2,6-dimethyl- $\gamma$ -pyrone rather suggests a six-membered ring structure such as **E**. Furthermore, the CID mass spectrum of PP2 is mainly characterized by the ions  $m/z$  107  $[M-H_2O]^+$ ,  $m/z$  97  $[M-CO]^+$ , and  $m/z$  79  $[107-CO]^+$ , in agreement with the structure **E** retained for PP2, as displayed in the supplementary data file SD3



**Figure 6 : Chemical structures and postulated mechanisms for the formation of PP2**

### SD 3 - Collision induced dissociation pathways of protonated photoproduct PP2



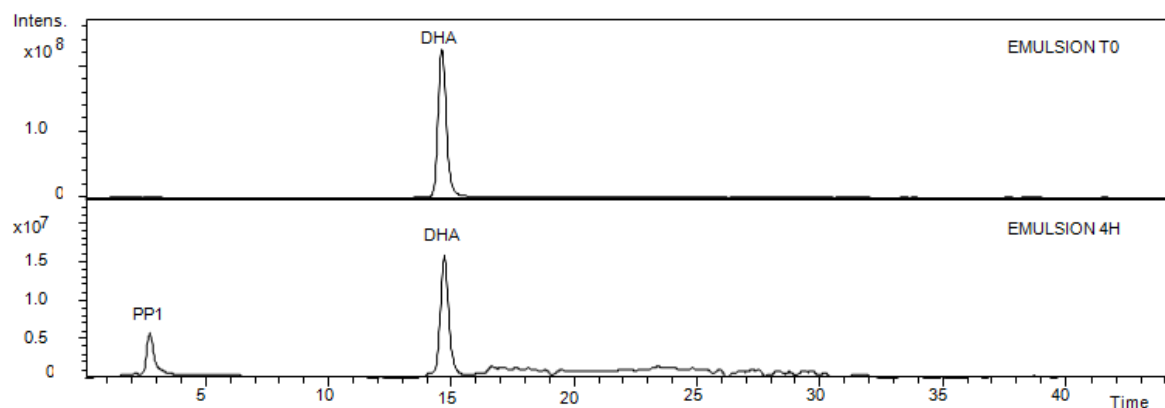
### VII.3.3 Real sample analysis

Investigations on the long term stability of preservative compounds in cosmetic formulations have been reported in a few publications. The stability of such preservatives is essential to maintain the integrity of the product and protect consumers against the potential effects of their degradation products. M. Gmurek *et al.* investigated the photodegradation of parabens, alone and in mixture, using an ultraviolet C lamp in the presence and absence of hydrogen peroxide.<sup>[19]</sup> Another study, conducted by G. Alvarez-Rivera *et al.* on the identification of unwanted photoproducts in cosmetic preservatives for personal care, investigated the photochemical transformation of benzoates, parabens, BHA, BHT and triclosan.<sup>[20]</sup> In the present study, the light-induced transformation of DHA in the reference emulsion (initially containing 675 µg/mL of DHA) was investigated after 4 and 24 hours of irradiation using the same photolysis conditions than for the standard solution. The initial amount of DHA decreases by about 36% after 4 hours of irradiation (see supplementary data file SD4). Only PP1 and PP2 have been detected in the cosmetic emulsion. PP1 is formed after one hour of irradiation and is still detected after 24 hours. Dimers have not been detected, even after 24 hours of irradiation. It can likely be imputed to a matrix effect: the medium would favor



hydrogen transfers onto radical intermediates thus limiting their lifetime and disfavoring intermolecular reactions. In such a way, dimers would not be formed or at concentrations below our analytical detection thresholds.

#### **SD 4 - LC-MS chromatograms of the cosmetic emulsion, not irradiated and irradiated for 4 hours (ESI+ mode, extracted ionic currents)**



### **VII.3.4 Toxicity prediction**

#### *VII.3.4.1 In silico toxicity estimation*

Table 2 reports the predictive values for oral rat LD<sub>50</sub>, *Daphnia magna* LC<sub>50</sub> (48 hours) and Fathead minnow LC<sub>50</sub> (96 hours) for DHA and its photoproducts. Oral LD<sub>50</sub> indicates the amount of chemical in mg/kg body weight (bw) that would cause 50% of a test population of rats to die after oral administration. Additionally, LC<sub>50</sub> indicates the lethal concentration of a chemical in air or in water to kill 50% of population during observation.

Several data can be found on the acute and sub-acute toxicity of dehydroacetic acid and its salt. An oral mouse LD<sub>50</sub> value of 1330 mg/kg has been reported by Zasshi.<sup>[21]</sup> For sub-acute toxicity, a 10 mg/kg daily dose was injected in monkeys. No effect was observed after 150 days. At high dosages, monkeys showed anorexia, vomiting, weakness, stupor, ataxia, and convulsion.<sup>[22]</sup> A report on the safety assessment of DHA and sodium dehydroacetate gives an overview of the toxicity in rats.<sup>[23]</sup> Conclusions on the acute oral toxicity release that the LD<sub>50</sub> were determined to be 1000 mg/kg for DHA and 570 mg/kg for sodium dehydroacetate. These values were also reported by Kobayashi *et al.* and Schmidt. In agreement with the Hodge and Sterne toxicity classification scale, these values are considered as “slightly toxic” when administered orally to rats.<sup>[24]</sup> This is in accordance with the

predicted value of 987 mg/kg calculated by the estimation software T.E.S.T. The consensus method for oral rat LD<sub>50</sub> provided lower predicted values of 204 mg/kg, 888 mg/kg, 619 mg/kg, and 504 mg/kg for PP1, PP2, and DIMERs, respectively. The oral rat LD<sub>50</sub> of PP1 was evaluated to be 4.5 times lower than that of the parent molecule which classes it in the category “moderately toxic” on the Hodge and Sterne toxicity classification.

Concerning the aquatic toxicity, data are limited in the literature, especially for crustaceans. For fish, one study by Wood reports toxicities on four different species: brown trout, perch, sunfish, and goldfish. A concentration of 5 ppm was tested. No effect was observed for sunfish and goldfish after 24 hours. Death appeared after 22 hours and 6 hours for brown trout and perch, respectively.<sup>[25]</sup> Results for Fathead minnow provided by the simulation program have shown higher toxicity in comparison with DHA, especially for DIMERS with LC<sub>50</sub> values of 2 mg/L and 3 mg/L for DIMER-1 and DIMER-2, respectively. This higher toxicity was also observed with the *Daphnia magna* LC<sub>50</sub> (48 h) estimation with 235 mg/L, 64 mg/L, 21 mg/L and 28 mg/L for PP1, PP2; DIMER-1 and DIMER-2, respectively.

The consensus method for mutagenicity estimation predicted a negative mutagenicity for DHA. This conclusion is in accordance with the non-mutagenic effect reported by two studies using different methods. The first one, by Lyer and Szybalski, used a simplified paper disc method; the second one observed chemical mutagenesis in microorganisms; both concluded on the absence of mutagenicity.<sup>[26-27]</sup> The same conclusion has been reported in different studies that evaluated the mutagenic potential of sodium dehydroacetate. In the present study, no mutagenicity effect has been predicted for the photoproducts.

Finally, the *in silico* study has permitted the estimation of the developmental toxicity (endocrine perturbation and reprotoxicity). Results of simulation tests have shown that DHA and its photoproducts could be responsible for developmental toxicity. Regarding previous works on teratogenicity and reproductive effects of DHA in mouse and rats, it is difficult to conclude on the concordance of the results because data have been found only for dehydroacetate sodium. Indeed, the effect of sodium dehydroacetate orally administered to pregnant mice during the pregnancy has been measured by Shiobara *et al.* After feeding of pregnant mice on days 6-15 of gestation, fetal lethality significantly increased to 50, 100 and 200 mg/kg/day.<sup>[28]</sup> In another study, conducted by Tanaka *et al.*, oral administration during days 6-17 of gestation at 0, 25, 50 and 100 mg/kg, have shown body weight loss and some

skeletal variations for the higher doses (50 and 100 mg/kg). Finally, no evidence of teratogenicity was found.<sup>[28]</sup>

**Table 2 : *In silico* toxicity predictions provided by the software T.E.S.T. for the photoproducts of DHA**

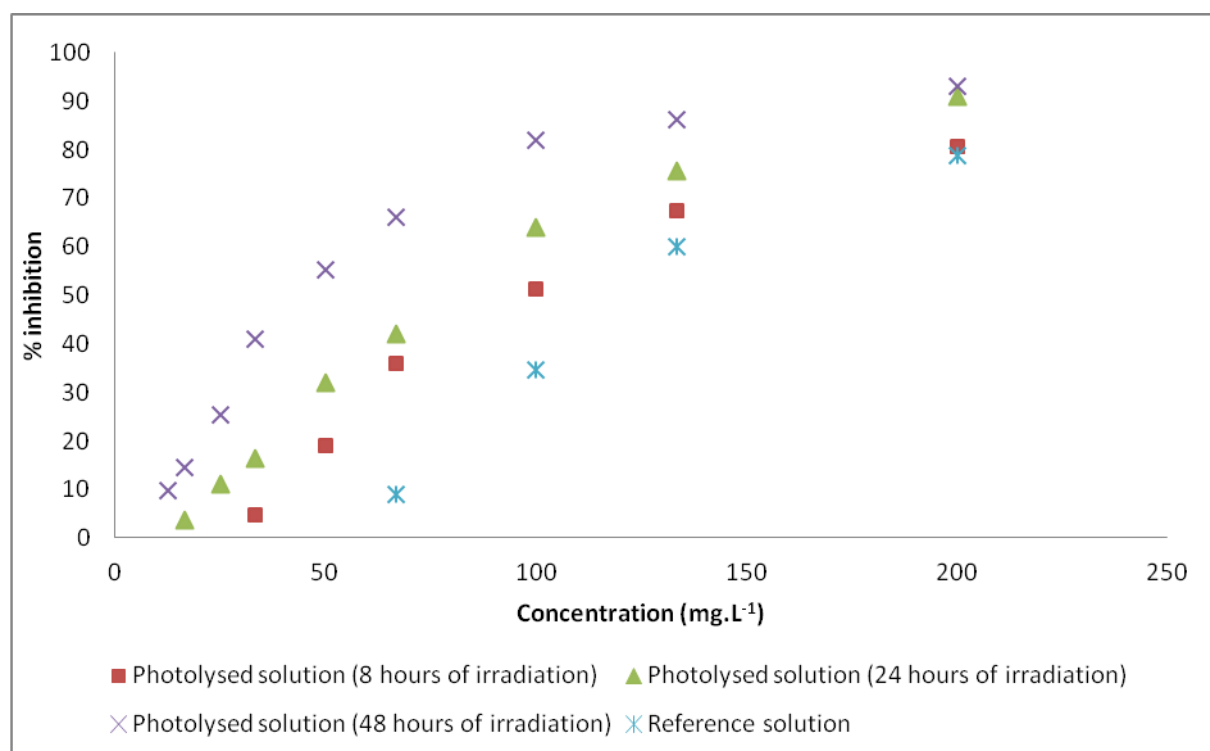
ID	Oral rat LD50 (mg/kg)	Fathead minnow LC50 96 hr (mg/L)	<i>Daphnia magna</i> LC50 48 hr (mg/L)
DHA	987	1889	306
PP1	204	1393	235
PP2	888	274	64
DIMERS-1	619	2	21
DIMER-2	504	3	28

#### VII.3.4.2 *In vitro* bioassays

Evaluation of the acute toxicity was performed using the *Vibrio fischeri* test, in order to evaluate the consequences of UV-Visible irradiation on the toxicity of the reference and irradiated solutions. Differences were evaluated by comparing their EC<sub>50</sub>. Acetonitrile proportion in the final tested aqueous solution must not exceed 20%. For this reason, a concentrated solution of DHA (4000 mg.L<sup>-1</sup>) was irradiated for 0 (reference solution), 8, 24 and 48 hours. Samples were then diluted in water to reach a “final” concentration of 400 mg.L<sup>-1</sup>. The kinetic study has shown that the relative amounts of the photoproducts steadily increase until the end of the experiment. Figure 7 displays the inhibition percentage of *Vibrio fischeri* bioluminescence after 5 min of incubation as a function of the concentration of the tested solution in mixture with the bacteria solution. The comparison of curves shows that the irradiated solutions are more toxic than the reference one. For example, at 25% (v:v) the solution after 48 hours of irradiation induces an inhibition percentage 2.5 times higher than that of the reference one. EC<sub>50</sub> on *Vibrio fischeri* were measured after three incubation times (5, 15 and 30 min) and are reported in Table 3. According to the toxicity categories established in the EU legislation, the mixture of the photoproducts resulting from DHA degradation could be considered as harmful (EC<sub>50</sub> in the range of 10-100 mg.L<sup>-1</sup>) for *V. fischeri*.<sup>[29]</sup>

**Table 3 : EC<sub>50</sub> (ppm) determined for the *Vibrio fischeri* bacteria after 3 incubation times (5 min, 15 min and 30 min)**

Irradiation time	<i>Vibrio Fischeri</i> (EC <sub>50</sub> , ppm)		
	5 min	15 min	30 min
-	121.96	122.96	119.69
8 hours	95.88	103.17	108.17
24 hours	75.23	69.26	63.68
48 hours	44.52	36.08	29.29



**Figure 7 : Response-dose curves for the reference and irradiated solutions of DHA solutions with the *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition test**

## VII.4 CONCLUSION

The UV-vis irradiation of DHA in different model systems and in a cosmetic formulation revealed its photo-instability. Untargeted screening of photodegradation products of DHA permitted to highlight the formation of four compounds. Three photoproducts were separated and identified using LC-UHR-MS/MS while a minor one was characterized by GC-MS. A photoproduct is an isomer of DHA, another one results from CO<sub>2</sub> elimination from DHA and to others correspond to dimeric structures. Chemical structures of the photo-induced dimers were postulated based on previous results by Sugiyama *et al.*<sup>[13]</sup> while ultra-high resolution measurements and CID experiments allowed the unambiguous identification of the two other photoproducts. All photoproducts were detected after 10 minutes of irradiation in hydrophilic and hydrophobic solutions of DHA, at the exception of dimers, which have not been detected in the cosmetic emulsion.

*In vitro* assays on *Vibrio fischeri* bacteria showed that the global ecotoxicity of the DHA solution increases with irradiation time. Results provided EC<sub>50</sub> values of 122 mg.L<sup>-1</sup> for the non-irradiated solution (5 min of incubation) and 44 mg.L<sup>-1</sup> for the solution after 48 hours of irradiation. The photoproduct resulting from CO<sub>2</sub> elimination of DHA (PP2) and both dimers should likely contribute to this ecotoxicity enhancement since *in silico* estimations for *D. magna* provided LC<sub>50</sub> values of 64 mg/L for PP2, 21 mg/L and 28 mg/L for dimers.

The present results show that personal care products containing DHA must be protected from direct sunlight to prevent photodegradation. The approach developed in this work showed the need to perform photodegradation studies in models extended to real samples, for which matrix effects can be observed. This approach can be applied to the assessment of active compounds and raw materials to study their long-term stability in order to assure their efficiency during product shelf life.

## Synthèse des principaux résultats de cette étude

Quatre photoproduits de l'acide déhydroacétique ont été caractérisés grâce aux expériences de modélisation en laboratoire. Trois d'entre eux ont été séparés et identifiés par LC-HR-MS/MS tandis qu'un photoproduit minoritaire a été caractérisé par GC-MS.

Le premier photoproduit correspond à un isomère du DHA. Il résulte de l'élimination d'un atome d'hydrogène du groupe méthyle suivie d'une cyclisation impliquant la fonction lactone. Les deux autres produits identifiés par LC-HR-MS/MS correspondent à des structures dimères du DHA. Elles semblent correspondre à des configurations de type « head-to-tail » et « head-to-head ». La première a été précédemment décrite dans l'étude de Sugiyama *et al.* consacrée à la photodégradation de l'acide déhydroacétique en phase solide.

Enfin, le photoproduit détecté par GC-MS résulte de l'ouverture du DHA par une réaction photoinduite de type Norish, suivie par une élimination de dioxyde de carbone et d'une cyclisation. Pour ce dernier, une première structure a été proposée à la suite d'une cyclisation conduisant à la formation de 2,6-diméthyl- $\gamma$ -pyrone. L'analyse GC-MS de la solution étalon correspondante a permis d'éliminer cette possibilité et d'envisager une autre structure résultante d'une cyclisation conduisant à la formation d'un cycle à six centres.

La détermination des structures des produits issus de la phototransformation sous irradiation UV-visible, a permis de déterminer leur toxicité relative et de la comparer à celle de l'acide déhydroacétique à l'aide d'outils *in silico*. Les résultats des tests *in silico* relatifs à la DL50 du rat, ont montré une toxicité potentiellement 4,5 fois supérieure à celle du DHA pour l'un des photoproduits. En ce qui concerne la toxicité aquatique, les résultats relatifs à l'espèce *Fathead minnow* ont montré des toxicités supérieures à celle du DHA, notamment pour les dimères. Cette toxicité plus élevée a également été observée avec l'estimation de la CL50 de *Daphnia magna* pour laquelle les essais *in vitro* ont montré que l'écotoxicité globale de la solution de DHA augmente avec le temps d'irradiation.

La phototransformation du DHA dans une émulsion cosmétique H/E a permis de valider la stratégie développée sur les systèmes modèles : les analyses d'une crème cosmétique après irradiation dans les mêmes conditions de photolyse que la solution de référence ont révélé la présence des photoproduits PP1 et PP2.

## Références bibliographiques

- [1] Penta S. *Dehydroacetic acid and its derivatives: useful synthons in organic synthesis*. 1st ed. Elsevier; 2017.
- [2] World Health Organization (WHO) / Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Class names and the international numbering system for food additives, section 3, p.7.
- [3] Kavanagh T, Kenny A. Effect of chemical treatments on shelf life and quality of raspberries. *Irish J. food Sci. Tech.* 1978; 2(2):117-22.
- [4] Hicks JE, Hall CB. Control of shredded lettuce discoloration. *85th Ann. Meet. Florida State Hort. Soc.* 1972; 219-221.
- [5] Watada AE. Physiological response of strawberry fruits treated with different fungicides. *Proc. W. Va. Acad. Sci.* 1971; 42:121-127.
- [6] European Commission, Regulation No 1223/2009 of the European parliament and of the council on cosmetic products 2009.  
[https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine\\_disruptors/docs/cosmetic\\_1223\\_2009\\_regulation\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf). Last accessed August 28, 2017.
- [7] Batt CA, Robinson RK. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd ed. Academic Press; 2014.
- [8] Beilfuss W, Hahn G, Hoop FK, Gradtke R, Weber K. Alcohol-free liquid concentrate for preserving cosmetics, household and technical products, Patent WO2002089759A1; 2002.
- [9] COSMOS – standard. Final draft 2009.  
<https://cosmosstandard.files.wordpress.com/2014/08/cosmos-standard-v2-21102013.pdf>. Accessed August 28, 2017.
- [10] Ecocert Greenlife. Referentiel Ecocert : Cosmétiques écologiques et biologiques Version 2, 2012.  
<http://www.ecocert.com/sites/default/files/u3/Referentiel-Ecocert.pdf>. Accessed August 28, 2017.
- [11] Label NATRUE: Exigences imposées aux cosmétiques naturels et biologiques, Version 2.7, 2013.  
[http://www.natrue.org/fileadmin/natrue/downloads/Criteria\\_FR\\_1.9\\_FINAL.pdf](http://www.natrue.org/fileadmin/natrue/downloads/Criteria_FR_1.9_FINAL.pdf). Accessed August 28, 2017.

- [12] Soil association organic standards. Revision 16.6, 2015.  
<https://www.soilassociation.org/media/5244/sa-health-and-beauty-standards.pdf>.  
Accessed August 28, 2017.
- [13] Sugiyama N, Sato T, Kataoka H, Kashima C. The photoreaction of dehydroacetic acid. *Bull. Chem. Soc. Jap.* 1971; 44:555-556.
- [14] Hongfang L, Xinhuai Z. Chromatographic determination and degradation of dehydroacetic acid as a food preservative. *J. Northeast Agric. Univ.* 1995; 01.
- [15] Bennassi CA, Semenzato A, Lucchiari M, Bettero A. Dehydroacetic Acid Sodium Salt - Stability in Cosmetic Preservative Mixtures. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1998; 10:29-32.
- [16] Hamilton RJ, Sewell PA. *Introduction to high performance liquid chromatography*. Springer, Dordrecht; 1982.
- [17] De Vaugelade S, Nicol E, Vujovic S, Bourcier S, Pirnay S, Bouchonnet S. UV-vis degradation of  $\alpha$ -tocopherol in a model system and in a cosmetic emulsion - Structural elucidation of photoproducts and toxicological consequences. *J. Chromatogr. A* 2017; 1517:126-133.
- [18] Yates P, Jorgenson MJ. Photodimeric Cage Compounds. *J. Amer. Chem. Soc.* 1963; 85:2956.
- [19] Gmurek M, Rossi AF, Martins RC, Quinta-Ferreira RM, Ledakowicz S. Photodegradation of single and mixture of parabens – Kinetic, by-products identification and cost-efficiency analysis. *Chemical Engineering Journal* 2015; 276:303-314.
- [20] Alvarez-Rivera G, Llompart M, Garcia-Jares C, Lores M. Identification of unwanted photoproducts of cosmetic preservatives in personal care products under ultraviolet-light using solid-phase microextraction and micro-matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 2015; 1390:1-12.
- [21] Kobayashi H, Ichikawa H, Kamiya N, Yoshida S, Hiraga K. Results concerning the acute toxicities of food additives. *Tokyo wet. Res. Lab. Public Health Ann. Rep.* 1976; 27(2):159-60.
- [22] Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. 5<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1984.
- [23] American College of Toxicology. 4 Final Report on the Safety Assessment of Sodium Dehydroacetate and Dehydroacetic acid. *Int. J. Toxicol.* 1985; (3):123-160.
- [24] Hodge HC, Sterner JH. Tabulation of toxicity classe *Am. Indust. Hyg. A. Quart.* 1949;10:93-96.



- [25] Wood EM, Hollis EH, Lennon RE. The toxicity of 3400 chemicals to fish (Part 1), Toxicity of 1085 chemicals to fish (Part 2), Report No. 560/6-87-002; 1987.
- [26] Iyer VN, Szybalski W. Two Simple Methods for the Detection of Chemical Mutagens. *Appl. Microbiol.* 1958; 6 (1):23–29.
- [27] Szybalski W. Special microbiological systems. II. Observations on chemical mutagenesis in microorganisms. *Ann. NY Acad. Sci.* 1958; 76:475-89.
- [28] Thomas H, Shepard MD, Ronald J, Lemire MD. Catalog of teratogenic agents. 11th ed. The Johns Hopkins University Press; 2004.
- [29] Commission of the European Communities CEC. Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993 laying down the principles for assessment of risks to man and the environment of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC. *Official J. Eur. Commun.*, L'227: 9-18.

---

## Conclusions et perspectives

---



Les principaux objectifs de cette thèse étaient d'étudier les conséquences du vieillissement sur les propriétés organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques conférées aux émulsions cosmétiques et d'étudier l'influence du rayonnement UV sur deux principes actifs couramment utilisés en cosmétique : l'alpha-tocophérol et l'acide déhydroacétique. Il s'agissait d'une part de questionner les pratiques actuelles de détermination de dates de péremption de certaines émulsions, d'autre part de tenter d'établir certains mécanismes de photodégradation impliqués dans le vieillissement du produit.

La première partie de ces travaux a été consacrée à l'établissement d'un état des lieux des pratiques mises en œuvre pour la détermination de la date de durabilité minimale et de la période après ouverture des produits cosmétiques. Pour cela, deux études rétrospectives ont été menées. La première sur les rapports de stabilité/compatibilité ; la seconde sur les rapports d'évaluation de la période après ouverture.

La première étude a mis en évidence une grande variabilité quant aux méthodes appliquées et critères sélectionnés dans les rapports de stabilité et de compatibilité des produits cosmétiques. Cette étude a également montré la prédominance de certaines mesures dans les tests (paramètres organoleptiques, pH...), aux dépens de critères a priori plus pertinents (taille des particules, fonctionnalité...).

La seconde étude rétrospective a montré des différences de méthodologies, de critères évalués et de niveaux de risque utilisés pour évaluer la PAO des produits cosmétiques. Elle révèle que les industries cosmétiques et les laboratoires de contrôle ont chacun adopté une méthode qui leur est propre. Même si leurs systèmes d'évaluation sont souvent inspirés de ceux de l'ANSM, on y retrouve une grande variabilité.

La deuxième partie de ces travaux a porté sur le suivi des paramètres organoleptiques d'une émulsion de référence, fabriquée « à façon » pour être autant que possible représentative des émulsions cosmétiques présentes sur le marché. L'objectif de cette étude était de proposer une démarche expérimentale permettant d'assurer la qualité de l'évaluation des critères organoleptiques. Cette démarche est particulièrement importante dans la réalisation des tests sensoriels visant à évaluer une durée de conservation, où l'expression de la modification est

un phénomène progressif. La démarche proposée a permis de s'affranchir du caractère subjectif des tests classiquement effectués par un seul opérateur.

Les résultats ont révélé l'influence de la température et de l'emballage sur la stabilité de l'émulsion cosmétique étudiée. L'analyse unidimensionnelle a permis de mettre en évidence la différence d'évolution des propriétés sensorielles de l'émulsion cosmétique en fonction des conditions dans lesquelles elle était stockée. L'utilisation de l'analyse multidimensionnelle a permis d'établir une date en mois, à partir de laquelle l'émulsion ne répond plus aux exigences organoleptiques.

Pour aller plus loin dans l'évaluation des propriétés organoleptiques des produits cosmétiques, une perspective intéressante pour le laboratoire EXPERTOX serait de s'intéresser aux outils d'aide aux analyses sensorielles. Ces dernières années sont apparus de nombreux développements de techniques instrumentales pour mesurer la qualité sensorielle d'un produit. Les analyseurs de texture informatisés, les rhéomètres, les « nez électroniques », les colorimètres... sont autant d'outils intéressants pour aider à l'évaluation du produit. Aujourd'hui ces instruments ne sont considérés comme fiables que si les mesures sont complétées et validées par des tests sensoriels ; ils semblent néanmoins constituer des compléments d'étude prometteurs.

La troisième partie de ces travaux a porté sur le suivi de paramètres physico-chimiques de l'émulsion de référence. Cette étude avait pour but de juger la pertinence de certains critères dans un protocole de stabilité/compatibilité permettant d'établir la DDM du produit. Elle a également permis de proposer une approche expérimentale pour l'établissement d'un modèle de correspondance entre le vieillissement en conditions réelles et en conditions accélérées.

La suite de ces études de corrélation consistera à tenter de valider le modèle proposé avec des contrôles expérimentaux, puis de l'appliquer à d'autres critères (par exemple la viscosité). Dans le but de valider le système de correspondance aujourd'hui utilisé pour l'établissement d'une PAO, l'utilisation d'une formule stable sur une plus longue durée sera nécessaire. Il sera impératif d'avoir une cinétique en temps réelle sur 3 ans.

Une méthode de dosage des actifs jouant un rôle dans la protection de la formule a été développée par GC-MS. Elle avait pour but de suivre une éventuelle cinétique de dégradation

de ces molécules dans l'émulsion de référence. Grâce à cette méthode, il a été possible de suivre le comportement des actifs d'intérêt, soumis à différentes conditions de stress. Les dosages réalisés pendant 1 an sur l'émulsion conservée à température ambiante ont montré une dégradation des concentrations en actifs, alors qu'elles restent stables après 3 mois en conditions accélérées. Ces résultats ont ainsi permis de mettre en évidence l'effet probable de la lumière sur la dégradation des actifs de la formule.

La quatrième partie de ces travaux a porté sur le suivi des paramètres microbiologiques de l'émulsion de référence.

Les résultats d' $a_w$  ont confirmé le risque d'une éventuelle contamination microbienne de l'émulsion tout au long des études en conditions réelles et accélérées. Les résultats des dénombrements des bactéries aérobies totales obtenus à l'aide la méthode « *Compact Dry TC* », préalablement validée pour une application cosmétique, ont montré la « propreté microbienne » de l'émulsion, quelle que soit la condition de stockage appliquée. Les résultats des dénombrements de germes totaux par la méthode normée vont également dans ce sens.

A la suite des résultats antimicrobiens et analytiques (dosage des conservateurs par GC-MS), des études ont été menées afin de confirmer l'efficacité des conservateurs aux concentrations présentes après dégradation.

Les résultats des « *challenge tests* » ont révélé que l'échantillon vieilli en conditions réelles pendant 1 an, pour lequel la plus grande diminution en conservateurs a été observée, présente une conformité aux critères A sur les cinq souches.

Ces résultats peuvent être interprétés :

- soit par le maintien de l'activité antimicrobienne des conservateurs aux concentrations présentes après dégradation,
- soit par la possible activité antimicrobienne de leurs produits de dégradation.

Des études supplémentaires sont envisagées afin de valider l'une ou l'autre hypothèse. Il faudrait pour cela reformuler une émulsion de référence avec des concentrations en conservateurs correspondant à celles obtenues après dégradation. Un « *challenge test* » sur cette dernière permettrait d'évaluer le maintien de l'efficacité des conservateurs aux nouvelles concentrations. Une seconde approche consisterait à caractériser les produits de dégradation, à les isoler et à évaluer leurs activités antimicrobiennes.

Afin de poursuivre l'étude de la dégradation des ingrédients d'intérêt et de l'évaluation de l'effet du facteur « lumière » sur la stabilité de l'émulsion, des études de photodégradation ont été menées. Les essais ont été réalisés sur l'alpha-tocophérol et l'acide déhydroacétique.

La stratégie utilisée a montré plusieurs résultats importants. Tout d'abord l'utilisation de l'enceinte de vieillissement accéléré a conduit à l'obtention de photoproduits dans un temps relativement court pour nos deux cas d'étude. La complémentarité des techniques de GC-MS et LC-MS a permis la détection de photoproduits aux propriétés physico-chimiques variées.

Dans l'étude de photodégradation de l'alpha-tocophérol, l'irradiation de solutions dégazées et non dégazées a conduit à des différences dans le nombre de photoproduits formés, montrant le rôle joué par l'oxygène dissous sur les mécanismes de dégradation. C'est pourquoi des mécanismes d'addition d'O<sub>2</sub> sur la molécule mère ont été proposés. Les deux principaux mécanismes d'addition mis en évidence sont les cyclo-additions 1,2 et 1,4 sur le cycle aromatique de l'alpha-tocophérol. Dans cette même étude, l'utilisation d'un analogue deutéré a facilité à la fois l'interprétation spectrale et la caractérisation de mécanismes d'addition d'O<sub>2</sub> sur la chaîne aliphatique de l'alpha-tocophérol.

Les valeurs de DL50 orales chez le rat, estimées par QSAR, ont montré que l'ensemble des produits de phototransformation caractérisés présente une toxicité similaire ou supérieure à celle de la molécule mère. Les tests de toxicité *in vitro* ont montré une augmentation de la toxicité de la solution avec le temps d'irradiation, mettant ainsi en évidence l'implication des photoproduits dans la toxicité de la solution.

Ces résultats montrent l'importance de prendre en compte la formation éventuelle de photoproduits dans l'évaluation de la sécurité d'un produit cosmétique.

La dernière partie de ces études concernait la détection dans l'émulsion de référence des photoproduits caractérisés après modélisation de l'irradiation UV-visible en laboratoire. Les méthodes ciblées, développées grâce à l'identification préalable des produits de photodégradation, ont permis la détection des photoproduits majoritaires dans l'émulsion. Cela montre que, dans nos conditions expérimentales, les photoproduits peuvent être formés dans une matrice complexe de type émulsion H/E.

La suite de ces études consistera à comparer la dégradation assistée par l'enceinte de vieillissement Q-SUN à la dégradation réelle. L'avantage du test de simulation par enceinte Q-SUN est de pouvoir apprécier le vieillissement réel du produit sans avoir à attendre des semaines voire des mois. Cependant, la dégradation de l'émulsion reste une dégradation forcée et non naturelle. Il serait donc intéressant d'étudier un produit commercial après une utilisation régulière par le consommateur et un stockage dans un environnement ordinaire.

Il serait également intéressant d'appliquer cette approche à l'évaluation d'autres composés actifs et/ou de matières premières, afin de s'assurer leur efficacité pendant la durée de vie du produit.



---

## Références bibliographiques

---

- [1] A. Kerdudo. Optimisation de la conservation des cosmétiques : impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation. Université Nice Sophia Antipolis. **2014**.
- [2] A.B. Raies, V.B. Bajic. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Computational Molecular Science* **2016**, 6(2), 147-172.
- [3] A.J.M. Santosa, M.S. Miranda, J.C.G. Esteves da Silva. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water Research* **2012**, 46(10), 3167–3176.
- [4] A.M. Pensé-Lhéritier. *Conception des produits cosmétiques : la formulation*. Tec & Doc Lavoisier, **2015**.
- [5] AFNOR. Validation of analytical methods, application to the microbiology of water. Validation protocol a commercial alternative method compared to a reference method, Revision No. 2, adopted by AFNOR Certification, NF148. **2013**.
- [6] Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Stabilité des produits de protection solaire: annexe II. **2007**.  
[http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/94b421a36160d8439caf57448eb85a8b.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/94b421a36160d8439caf57448eb85a8b.pdf) (accédé 08-17)
- [7] ASTM International. ASTM F1980-16-Standard Guide for Accelerated Aging of Sterile Barrier Systems for Medical Devices. **2016**.  
<http://file.yizimg.com/424653/2013120515134271.pdf> (accédé 08-17)
- [8] B. Briasco, P. Capra, A.C. Cozzi, B. Mannucci, P. Perugin. Packaging Evaluation Approach to Improve Cosmetic Product Safety. *Cosmetics*. **2016**, 3, 1-12.
- [9] B. Maxit. Diffusion dynamique de la lumière. Principes et limitations. **2008**. Présentation Corouan Technologie. [http://www.insp.upmc.fr/webornano/ressources/2008/pdf\\_bordeaux/Cordouan.pdf](http://www.insp.upmc.fr/webornano/ressources/2008/pdf_bordeaux/Cordouan.pdf) (accédé 12-17).
- [10] B.A. Eckenrode, S.A. McLuckey, G.L. Glish. Comparison of electron ionization and chemical ionization sensitivities in an ion trap mass spectrometer. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1991**, 106, 137-157.
- [11] B.A. Khan, N. Akhtar, T. Mahmood, M. Qayum, S.U. Zaman. Formulation and pharmaceutical evaluation of a W/O emulsion of Hippophae ramnoides fruit extract. *Journal of Pharmacy Research* **2010**, 3, 1342-1344.
- [12] Brazil National Health Surveillance Agency (ANVISA). Cosmetic products stability guide. **2004**.

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Cosmetic+Products+Stability+Guide/5f90ee5b-c77b-4c1e-91f9-5fa680b05022> (accédé 08-17)

- [13] C. Thomas, D. Siong, S. Pirnay. Evaluation of the content – containing interaction in cosmetic products using gas chromatography–mass spectrometry. *International Journal of Cosmetic Science* **2014**, 36 (4), 327-335.
- [14] C.W Dunnett. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association* **1955**, 50, 1096-1121.
- [15] Conseil de l’Union européenne. Directive 76/768/CEE du Conseil, du 27 juillet 1976, concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques. *JO L 262* **1976**.
- [16] Cosmetics Europe - The Personal Care Association. Activity Report 2016. **2017**. <https://www.cosmeticseurope.eu/library/6> (accédé 08-17)
- [17] D. Vallero. *Environmental contaminants: assessment and control*, Academic Press, **2010**.
- [18] D.C Steinberg. *Preservatives for Cosmetics*. Allured Books. **2012**.
- [19] E. Constantin. *Spectrométrie de masse - principes et applications*. Tec & Doc. **1996**.
- [20] Environmental Protection Agency. Quantitative Structure Activity Relationship. **2001**. <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (accédé 12-16)
- [21] European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). *Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Product*. **2004**. <http://www.packagingconsultancy.com/pdf/cosmeticscolipa-testing-guidelines.pdf> (accédé 08-17)
- [22] F. Guedira. *Cours de Spectroscopie-Chapitre III : spectroscopie d’absorption dans l’UV-visible*. Faculté des Sciences de Rabat. **2013**.
- [23] F. Husson, S. Lê, J. Pagès. Confidence ellipse for the sensory profiles obtained by principal component analysis. *Food Quality and Preference* **2005**, 16 (3), 245-250.
- [24] F. Strigler, C. Touraille, F. Sauvageot, J. Barthélémy, S. Issanchou, J. Pagès. *Les épreuves discriminatives et descriptives, Evaluation sensorielle : manuel méthodologique*. Lavoisier, Tec & Doc Lavoisier, **2009**.
- [25] Food and Drug Administration. Guidance for industry Q6A, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug

- Products: Chemical Substances. **2003**.  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf) (accédé 06-15)
- [26] Food and Drug Administration. Guidelines for industry Q1A (R2), Stability testing of new drug substances and products. **2003**.  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf) (accédé 06-15)
- [27] G. Alvarez-Rivera, M. Llompарт, C. Garcia-Jares, M. Lores. Identification of unwanted photoproducts of cosmetic preservatives in personal care products under ultraviolet-light using solid-phase microextraction and micro-matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A* **2015**, 1390, 1-12.
- [28] G. Bouchoux M. Sablier. Spectrométrie de masse Applications. *Techniques de l'ingénieur* **2005**. <https://www.techniques-ingenieur.fr> (accédé 11-17)
- [29] G.M Borgognone, J. Bussi, G. Hough. Principal component analysis in sensory analysis: covariance or correlation matrix? *Food Quality and Preference* **2001**, 12 (5-7), 323-326.
- [30] H. Hotelling. The generalization of Student's ratio. *Annals of Mathematical Statistics* **1931**, 2 (3), 360-378.
- [31] H. Kodaka, S. Mizuochi, H. Teramura, T. Nirazuka. Comparison of the Compact Dry TC method with the standard pour plate method (AOAC Official Method 966.23) for determining aerobic colony count in food samples. *Journal of AOAC international* **2005**, 88, 1702.
- [32] I. Kim, N. Yamashita, H. Tanaka. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. *Chemosphere* **2009**, 77, 518-525.
- [33] International Organization for Standardization. ISO 22716:2007 Cosmétiques - Bonnes pratiques de fabrication (BPF) - Lignes directrices relatives aux bonnes pratiques de fabrication. **2008**.
- [34] International Organization for Standardization. ISO/DTR 18811 Cosmétiques - Lignes directrices concernant l'évaluation de la stabilité de produits cosmétiques. <https://www.iso.org/fr/standard/63465.html> (accédé 06-15)
- [35] International Organization for Standardization. ISO/TR 13097:2013 Preview Guidelines for the characterization of dispersion stability, 1<sup>st</sup> Edition. **2013**.

- [36] ISO 22149:2006 Cosmetics – Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria. 1<sup>st</sup> ed. **2006**.
- [37] J. Curry. Water Activity and Preservation. *Cosmetic and Toiletries* **1985**, 100, 535-554.
- [38] J. E. Blundell, V. J. Burley. Satiation, satiety and the action of fibre on food intake. *International journal of obesity* **1987**, 11(1), 9-25.
- [39] J. Fourniat, M-C. Martini, M. Seiller. *Conservateurs antimicrobiens. Actifs et Additifs en Cosmétologie*. Lavoisier. **2006**.
- [40] J. Le Magnen. Hyperphagie provoquée chez le Rat blanc par altération du mécanisme de satiété périphérique. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie (Paris)* **1956**, 150(1), 32-35.
- [41] J. Lenoir. Introduction aux tests d'hypothèse, Unité « Ecologie et Dynamique des Système Anthropisés », Université de Picardie Jules Verne. **2013**  
<https://jonathanlenoir.files.wordpress.com/2013/12/tests-dhypothese-intro.pdf> (accédé 09-17)
- [42] J. Tranchant. *Manuel pratique de la chromatographie en phase gazeuse*. Masson. **1995**.
- [43] J.J. Savory, N.K. Kaiser, A.M. McKenna, F. Xian, G.T. Blakney, R.P. Rodgers, C.L. Hendrickson, A.G. Marshall. Parts-Per-Billion Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Measurement Accuracy with a “Walking” Calibration Equation. *Analytical Chemistry* **2011**, 83 (5), 1732–1736.
- [44] L. Brunel, A. Kotzev, G. Meunier, C. Tisserand. Diffusion multiple statique et dynamique de la lumière pour l'étude de colloïdes et polymères. Approches Multiphysiques pour les systèmes colloïdaux concentrés. **2010**. Présentation Formulation Recherche Company. <http://amc2.cnrs.fr/sites/default/files2/Brunel2010.pdf> (accédé 12-17).
- [45] L.L. Marking, R.A. Kimerle. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. Eds. *Aquatic Toxicology* **1979**, 667, 98-106.
- [46] M. al-Athar. *Annales du Service des antiquités de l'Egypte Tome II*, Le service, **1987**.
- [47] M. Garrison, N. Dayan. *Formulating cosmetics with natural oils, fats, butters, and waxes*. John Wiley & Sons. **2011**, 215-238.
- [48] M. Gmurek, A.F. Rossi, R.C. Martins, R.M. Quinta-Ferreira, S. Ledakowicz. Photodegradation of single and mixture of parabens – Kinetic, by-products

- identification and cost-efficiency analysis. *Chemical Engineering Journal* **2015**, 276, 303-314.
- [49] M. Rouaud. *Calcul d'incertitudes. Régression polynomiale et non-linéaire avec ou sans barres d'erreur*. Creative Commons. Rév. **2017**.
- [50] M. Waghmode, M. Kamble, A. Shruti. Pharmaceutical profile of alpha-tocopherol – A brief review. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* **2012**, 1 (3), 1023-1039.
- [51] M.B. Comisarow, A.G. Marshall. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **1974**, 25, 282.
- [52] M.L. Camaró-Sala, R. Martínez-García, P. Olmos-Martínez, V. Catalá-Cuenca, M.D. Ocete-Mochón, C. Gimeno-Cardona. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2015**, 33(7), 31-36.
- [53] N. De Kruijf, A. Schouten, M.A.H. Rijk, L.A. Pranoto-Soetardhi. Determination of preservatives in cosmetic products II. High-performance liquid chromatographic identification. *Journal of Chromatography* **1989**, 469, 317-328.
- [54] N.R. Cha, J.K. Lee, H.J. Jeong, J.C. Cho, M.J. Kim, S.Y. Lee. Determination of 19 preservatives in various matrices by high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, **2012**, 45, 2148-2160.
- [55] OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 316: Phototransformation of Chemicals in Water – Direct Photolysis. **2008**. <http://www.oecdlibrary.org/docserver/download/9731601e.pdf?expires=1511262126&id=id&accname=guest&checksum=BE9967D8A3A84C8CB8CD50166C106157> (accédé 09-17)
- [56] P. Bienvault. *Le talc Morhange a empoisonné et tué 36 bébés*. **2002**. <https://www.la-croix.com/Archives/2002-09-14/Le-talc-Morhange-a-empoisonne-et-tue-36-bebes- NP -2002-09-14-165577> (accédé 10-17).
- [57] P. Schubert, M. Kirchner. Ellipse area calculations and their applicability in posturography. *Gait Posture* **2014**, 39 (1), 518-22.
- [58] P. Walter. *Chimie, dermo-cosmétique et beauté : Dermo-cosmétique et beauté à travers les âges*, **2016**, 17-33.
- [59] Papyrus Smith, traduction V. Loret. Pour transformer un vieillard en jeune homme. *Mémoires de l'Institut Français d'Archéologie Orientale* **1935-1938**, 66, 853-877.

- [60] Parlement Européen. Règlement cosmétique (CE) N°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques. *Journal officiel de l'Union européenne*. **2009**. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32009R1223> (accédé 06-15)
- [61] R. Rakotomalala. Tests de normalité - Techniques empiriques et tests statistiques, Verison 2.0, Université Lumière Lyon 2. **2017**. [http://eric.univ-lyon2.fr/~ricco/cours/cours/Test\\_Normalite.pdf](http://eric.univ-lyon2.fr/~ricco/cours/cours/Test_Normalite.pdf) (accédé 09-17)
- [62] R. Ramousse, M. Le Berre, L. Le Guelte. *Introduction aux statistiques*. **1996**. <http://www.cons-dev.org/elearning/stat/> (accédé 10-17)
- [63] R.B. Cole. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*. Wiley-Interscience, New York. **1997**.
- [64] R.G. Iacocca. The Causes and Implications of Glass Delamination. *Pharmaceutical Technology* **2011**, 35(11), 6-9.
- [65] S. Bouchonnet. *La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse*, Tec & Doc Lavoisier, **2009**.
- [66] S. Klementova, D. Kahoun, L. Doubkova, K. Frejlichova, M. Dusakova, M. Zlamal. Catalytic photodegradation of pharmaceuticals – homogeneous and heterogeneous photocatalysis. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2017, 16; 67-71.
- [67] S. Le, F. Husson. Sensominer: A Package for Sensory Data Analysis. *Journal of Sensory Studies* **2008**, 23 (1), 14-25.
- [68] S. Penta. *Dehydroacetic Acid and Its Derivatives: Useful Synthons in Organic Synthesis*. Elsevier. **2017**, 152.
- [69] S.D.H. Shi, C.L. Hendrickson, A.G. Marshall. Counting individual sulfur atoms in a protein by ultra-high resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Experimental resolution of isotopic fine structure in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95 (20), 11532–11537.
- [70] S.H. Moussa, A.A. Tayel, A.A. Al-Hassan, A. Farouk. Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *Journal of Mycology* **2013**, 2013, 1-7.
- [71] S.H. Yalkowsky, He. Yan, P. Jain. *Handbook of Aqueous Solubility Data*. CRC Press. **2010**, 398.
- [72] SAS : Service d'accréditation suisse. Guide pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de leur incertitude de mesure dans les

domaines de la microbiologie alimentaire et de l'environnement, révision 03, n° 328.fw. **2013**.

- [73] SCCS - The SCCS's notes guidances for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation, 8th revision. Scientific Committee on Consumer Safety **2012** SCCS/1501/12.
- [74] Société Française d'Analyse Sensorielle (SFAS). Analyse et évaluation sensorielle. <http://www.sfasenso.fr/m-299-historique.html> (accédé 11-17)
- [75] T. Katagi. Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* **2004**, 182, 1.
- [76] T. Nielsen, M. Jägerstad. Flavour scalping by food packaging. *Trends in Food Science & Technology* **1994**, 5 (11), 353-356.
- [77] T.S. Issa, B. Philippe, H. Raymond, H. Michel, D. Jacques. Improved kinetic parameter estimation in pH-profile data. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, 198, 39.
- [78] V. Oakley, P. Rogers, D. McPhail, A. Amaku. Vessel Glass Deterioration in the Museum Environment: A Quantitative Study by Surface Analysis. *Conservation Journal* **1992**, 3.
- [79] W.H. Ding, J.H. Lo, S.H. Tzing. Determination of linear alkylbenzenesulfonates and their degradation products in water samples by gas chromatography with ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1998**, 818, 270-279.
- [80] X. Fernandez, F. Merck, A. Kerdudo. Conservateurs pour cosmétiques - Antioxydants et anti-UV. *Technique de l'Ingénieur*. **2012**.
- [81] Y.S. Liu, G.G. Ying, A. Shareef, R.S. Kookana. Photostability of the UV filter benzophenone-3 and its effect on the photodegradation of benzotriazole in water, *Environmental Chemistry* **2011** 8 (6), 581–588.



**Titre :** Evaluation des paramètres nécessaires à la détermination de la Date de Durabilité Minimale (DDM) et de la Période Après Ouverture (PAO) des émulsions cosmétiques

**Mots clés :** émulsion cosmétique, stabilité, GC-MS, LC-MS, photochimie, tests de toxicité *in vitro* et *in silico*

**Résumé :** Depuis le 11 juillet 2013, date d'application du Règlement cosmétique (CE) No 1223/2009, les metteurs sur le marché sont dans l'obligation de mentionner sur leurs produits la Date de Durabilité Minimale (DDM), ou si celle-ci excède 30 mois, la Période Après Ouverture (PAO). L'estimation de ces dates n'est pas encadrée réglementairement. *Cosmetics Europe*, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, le Comité scientifique pour la sécurité du consommateur ou encore la Commission Européenne proposent des lignes directrices, mais les conditions d'étude pour la détermination de la DDM et de la PAO restent encore à l'appréciation de la personne responsable de la commercialisation du produit. L'objectif de ce travail était d'étudier les conditions nécessaires à la mise en place d'un protocole de mesure de la stabilité d'émulsions cosmétiques, permettant de déterminer la DDM du produit de manière fiable et rapide. Pour cela, une approche expérimentale sur une émulsion représentative de l'industrie cosmétique a été menée. L'évolution des paramètres organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques a été évaluée, en accéléré (température augmentée) et en temps réel. Une approche statistique a montré que les propriétés sensorielles évoluent différemment en fonction de la température et du matériau dans lequel l'émulsion est stockée. L'établissement d'un modèle de correspondance entre le vieillissement en conditions réelles et en conditions accélérées a pu être proposé pour certains paramètres physico-chimiques. Les études de microbiologie se sont tout d'abord concentrées sur la validation d'une méthode commerciale, alternative

au dénombrement des germes aérobies totaux encadré par la norme ISO 21149, pour une application dans le domaine cosmétique. Après validation, la méthode a été utilisée comme un outil simple, rapide et économique pour le suivi de la stabilité microbiologique de l'émulsion de référence. La dégradation des conservateurs et de l'antioxydant présents dans la formule de référence a été suivie par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Ce suivi a permis de mettre en évidence l'effet probable de la lumière sur la dégradation des actifs de l'émulsion. A ces tests ont été associés une stratégie analytique visant à étudier la photostabilité de l'émulsion. Les études ont porté sur deux molécules : l'acide déhydroacétique et l'alpha-tocophérol. La stratégie a permis de caractériser les mécanismes impliqués dans les réactions de photodégradation. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse multi-étapes (GC-MS<sup>n</sup>) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution en tandem (LC-HR-MS/MS) ont été utilisées pour la séparation et l'identification structurale des photoproduits. La détection des photoproduits majoritaires dans l'émulsion de référence, après irradiation UV-visible, montre la possible formation des photoproduits dans une matrice complexe de type émulsion huile/eau. Les résultats des tests de toxicité, *in silico* et/ou *in vitro*, ont démontré l'importance de prendre en compte la formation éventuelle de photoproduits dans l'évaluation de la sécurité d'un produit cosmétique.

**Title :** Evaluation of the parameters required for the determination of BBD and PAO of cosmetic emulsions.

**Keywords :** cosmetic emulsion, stability, GC/MS, LC/MS, photochemistry, *in vitro* & *in silico* toxicity tests

**Abstract :** According to Cosmetic Regulation 1223/2009, implemented in July 2013, the manufacturer must mention the Date of Minimum Durability (DMD), or if DMD exceeds 30 months, the Period After Opening (PAO) on the product packaging. At the present time, no text regulates the procedures applicable to the validation of a DMD or a PAO. Some guidelines are published by *Cosmetics Europe*, the National Agency for the safety of medicines and health products, the Scientific Committee for consumer safety, or the European Commission; but the evaluation remains at the discretion of the person responsible for marketing the product. In this context, this work proposes recommendations to establish a stability protocol in order to quickly determine the DMD. Experimental approaches on an emulsion representative of the major category in the cosmetics industry have been established. Organoleptic, physicochemical and microbiological stabilities were evaluated. The emulsion stability has been tested in accelerated conditions and in real time. A statistical approach has been proposed to evaluate the product shelf life according to its organoleptic properties. The sensory properties of the cosmetic emulsion changed differently depending on the temperature and the material in which it has been stored. A mathematical correlation between the results of studies under normal and those obtained under accelerated conditions has been proposed for some parameters.

A microbiological study focused on the validation of a commercially available method, alternative to total count of aerobic microorganisms, normed by the ISO 21149 for cosmetic application. Once validated, this method has been used as an economical, quick and easy tool to evaluate the microbiological stability of cosmetic emulsions. Gas chromatography coupled with mass spectrometry was used to follow the degradation of antioxidant and preservatives. To take into account the photostability of the emulsion, an analytical strategy was proposed to identify the mechanisms involved in phototransformation reactions. The study focused on two molecules: dehydroacetic acid and alpha-tocopherol. Both gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and liquid chromatography coupled with ultrahigh resolution mass spectrometry (LC-UHR-MS) were used for the separation and the structural identification of photoproduits. The main photoproduits were detected in the reference emulsion after UV-visible irradiation, thus showing the possible formation of photoproduits in a complex oil/water emulsion. Both *in silico* and *in vitro* toxicity tests highlighted the need for taking into account the potential formation of photoproduits in the safety evaluation of a cosmetic product.



