

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	i
SOMMAIRE.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	viii
INTRODUCTION .....	1
I. GÉNÉRALITÉS SUR L'ETUDE .....	2
1.1. Généralités sur les produits cosmétiques.....	2
1.2. Contamination microbienne des produits cosmétiques .....	4
1.3. Paramètres et normes microbiologiques .....	6
1.4. Conservateurs .....	6
1.5. Conservateurs utilisés dans les cosmétiques .....	8
1.6. Problématique et présentation de l'étude.....	16
1.7. Choix des huiles essentielles .....	17
1.7.1. Les huiles essentielles.....	17
1.7.2. Huiles essentielles utilisées .....	21
CONCLUSION PARTIELLE I .....	24
II. MATERIELS ET METHODES.....	25
2.1. Produits testés.....	25
2.2. Méthodologie de travail.....	27
2.3. Analyses sensorielles.....	28
2.4. Test de vieillissement accéléré à l'étuve .....	33
2.5. Évaluation de l'efficacité d'un conservateur ou «challenge test» .....	33
2.6. Études socio-économiques .....	38
CONCLUSION PARTIELLE II.....	39
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS .....	40
3.1. Résultats des analyses des huiles essentielles sur CPG .....	40
3.2. Résultats des analyses sensorielles.....	41
3.3. Résultats des tests de stabilité à l'étuve.....	64
3.4. Résultats du « challenge test ».....	71
3.5. Résultats des enquêtes sociodémographiques .....	78
3.6. Recommandations .....	78
CONCLUSION PARTIELLE III.....	79
CONCLUSION GENERALE.....	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	83
PARTIES EXPERIMENTALES .....	87

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Limites microbiologiques pour les produits cosmétiques .....	6
Tableau II: Propriétés physico-chimiques des principaux parabènes .....	8
Tableau III: Caractéristiques physiques du 2-phénoxyéthanol .....	11
Tableau IV: Caractéristiques physiques du formaldéhyde .....	13
Tableau V: Caractéristiques physiques du benzoate de sodium .....	15
Tableau VI: Caractéristiques physiques du sorbate de potassium .....	16
Tableau VII: Quelques composés antiseptiques dans les huiles essentielles .....	21
Tableau VIII: Caractéristiques de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .....	25
Tableau IX: Caractéristiques de l'huile essentielle de <i>Cinnamosma fragrans</i> .....	26
Tableau X: Caractéristiques de l'huile essentielle d' <i>Eugenia caryophyllata</i> .....	26
Tableau XI: Concentration des conservateurs incorporés dans les produits cosmétiques .....	27
Tableau XII: Échelle standard de Mc FARLAND .....	35
Tableau XIII: Constituants chimiques de l'huile essentielle de thym .....	40
Tableau XIV: Composition chimique de l'huile essentielle de girofle clou.....	40
Tableau XV: Composition chimique de l'échantillon de l'huile essentielle de <i>Mandravasarotra</i> .....	40
Tableau XVI: Seuil de détection de l'huile essentielle de girofle dans les échantillons de lait démaquillant + base parfumante .....	41
Tableau XVII: Seuil de détection de l'huile essentielle de girofle dans les échantillons de lait démaquillant sans base parfumante .....	41
Tableau XVIII: Seuil de détection de l'huile essentielle de girofle dans les échantillons de lotions + base parfumante .....	42
Tableau XIX: Seuil de détection de l'huile essentielle de girofle dans les échantillons de lotions sans base parfumante .....	42
Tableau XX: Seuil de détection de l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> dans les échantillons de lait démaquillant + base parfumante .....	42
Tableau XXI: Seuil de détection de l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> dans les échantillons de lait démaquillant sans base parfumante .....	42
Tableau XXII: Seuil de détection de l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> dans les échantillons de lotion + base parfumante .....	43
Tableau XXIII: Seuil de détection de l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> dans les échantillons de lotion sans base parfumante .....	43
Tableau XXIV: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test de classement 1 avec l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> .....	45
Tableau XXV: Code des échantillons de lotion pour le test de classement 1 avec l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> .....	45
Tableau XXVI: Effectifs par rang du test de classement 1 pour les laits démaquillants .....	45
Tableau XXVII: Somme des rangs du test de classement 1 pour le lait démaquillant .....	46
Tableau XXVIII: Comparaison des laits démaquillants pour le test de classement 1 selon le Test du plus petit écart.....	47
Tableau XXIX: Résultat du test de classement 1 sur les laits démaquillants .....	48
Tableau XXX: Effectifs par rang du test de classement 1 pour les lotions.....	48
Tableau XXXI: Somme des rangs du test de classement 1 pour les lotions .....	48
Tableau XXXII: Comparaison des lotions pour le test de classement 1 selon le Test du plus petit écart .....	49
Tableau XXXIII: Résultat du test de classement 1 sur les lotions .....	50
Tableau XXXIV: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test de classement 2 avec l'huile essentielle de girofle .....	50

Tableau XXXV: Code des échantillons de lotion pour le test de classement 2 avec l'huile essentielle de girofle.....	50
Tableau XXXVI: Effectifs par rang du test de classement 2 pour les laits démaquillants .....	51
Tableau XXXVII: Somme des rangs du test de classement 2 pour le lait démaquillant .....	51
Tableau XXXVIII: Comparaison des lotions pour le test de classement 2 selon le Test du plus petit écart .....	52
Tableau XXXIX: Résultat du test de classement 2 sur les laits démaquillant .....	52
Tableau XL: Effectifs par rang du test de classement 2 pour les lotions .....	52
Tableau XLI: Somme des rangs du test de classement 2 pour les lotions .....	53
Tableau XLII: Comparaison des lotions pour le test 2 selon le Test du plus petit écart.....	53
Tableau XLIII: Résultat du test de classement 2 sur les lotions .....	54
Tableau XLIV: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test de classement 3 avec l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> + girofle .....	54
Tableau XLV: Code des échantillons de lotions pour le test de classement 3 avec l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> + girofle.....	55
Tableau XLVI: Effectifs par rang du test de classement 3 pour les laits démaquillants.....	55
Tableau XLVII: Somme des rangs du test de classement 3 pour le lait démaquillant.....	55
Tableau XLVIII: Comparaison des laits démaquillants pour le test 3 selon le Test du plus petit écart .....	56
Tableau XLIX: Résultat du test de classement 3 sur les laits démaquillants.....	57
Tableau L: Effectifs par rang du test de classement 3 pour les lotions.....	57
Tableau LI: Somme des rangs du test de classement 3 pour les lotions .....	57
Tableau LII: Comparaison des lotions pour le test 3 selon le Test du plus petit écart.....	58
Tableau LIII: Résultat du test de classement 3 sur les lotions .....	58
Tableau LIV: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test d'acceptabilité 1 avec l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> .....	59
Tableau LV: Code des échantillons de lotion pour le test de classement 3 avec l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> .....	59
Tableau LVI: Résultats du test d'acceptabilité 1 des laits démaquillants.....	60
Tableau LVII: Résultats du test d'acceptabilité 2 des lotions .....	60
Tableau LVIII: Code des échantillons de lotion pour le test d'acceptabilité 2 avec l'huile essentielle de girofle .....	60
Tableau LIX: Résultats du test d'acceptabilité 2 des laits démaquillants.....	61
Tableau LX: Résultats du test d'acceptabilité 2 des lotions .....	61
Tableau LXI: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test d'acceptabilité 3 avec l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> + girofle .....	62
Tableau LXII: Code des échantillons de lotion pour le test de classement 3 avec l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> .....	62
Tableau LXIII: Résultats du test d'acceptabilité 3 des laits démaquillants.....	62
Tableau LXIV: Résultats du test d'acceptabilité 3 des lotions.....	63
Tableau LXV: Caractéristiques des produits pour le test de stabilité à l'étuve .....	64
Tableau LXVI: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des laits démaquillants pour l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> .....	64
Tableau LXVII: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des lotions pour l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> .....	65
Tableau LXVIII: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des laits démaquillants pour l'huile essentielle de clou de girofle.....	67
Tableau LXIX: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des lotions pour l'huile essentielle de clou de girofle .....	68

Tableau LXX: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des laits démaquillants pour l'huile essentielle de clou de girofle + <i>mandravasarotra</i> .....	69
Tableau LXXI: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des lotions pour l'huile essentielle de clou de girofle + <i>mandravasarotra</i> .....	70
Tableau LXXII: Présentation des produits soumis au «challenge test».....	71
Tableau LXXIII: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur <i>S. aureus</i> : cas du lait démaquillant.....	72
Tableau LXXIV: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur <i>S. aureus</i> : cas de la lotion .....	72
Tableau LXXV: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur <i>C. albicans</i> : cas du lait démaquillant.....	73
Tableau LXXVI: Tableau LXXI: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur <i>C. albicans</i> : cas de la lotion.....	74
Tableau LXXVII: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + <i>mandravasarotra</i> sur <i>S. aureus</i> : cas du lait démaquillant .....	75
Tableau LXXVIII: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + <i>mandravasarotra</i> sur <i>S. aureus</i> : cas de la lotion .....	75
Tableau LXXIX: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + <i>mandravasarotra</i> sur <i>C. albicans</i> : cas du lait démaquillant.....	76
Tableau LXXX: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + <i>mandravasarotra</i> sur <i>C. albicans</i> : cas de la lotion.....	77
Tableau LXXXI: Classification de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> .....	95
Tableau LXXXII: Classification de l'espèce <i>Candida albicans</i> .....	96
Tableau LXXXIII: Matériels requis pour les analyses du seuil de détection.....	121
Tableau LXXXIV: Matériels requis pour les épreuves hédoniques .....	123

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure générale des parabènes .....	8
Figure 2: Formule générale du 2-phénoxyéthanol .....	11
Figure 3: Formule développée du formaldéhyde .....	12
Figure 4: Formule générale du benzoate de sodium .....	14
Figure 5: Formule générale du sorbate de potassium .....	16
Figure 6: Échelle picturale relatant l'appréciation des échantillons .....	30
Figure 7: Déroulement du «challenge test» .....	25
Figure 8: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur <i>S. aureus</i> : cas du lait démaquillant.....	72
Figure 9: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur <i>S. aureus</i> : cas de la lotion.....	73
Figure 10: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur <i>C. albicans</i> : cas du lait démaquillant.....	73
Figure 11: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur <i>C. albicans</i> : cas de la lotion ...	74
Figure 12: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + <i>mandravasarotra</i> sur <i>S. aureus</i> : cas du lait démaquillant .....	75
Figure 13: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + <i>mandravasarotra</i> sur <i>S. aureus</i> : cas de la lotion .....	76
Figure 14: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + <i>mandravasarotra</i> sur <i>C. albicans</i> : cas de la lotion .....	76
Figure 15: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + <i>mandravasarotra</i> sur <i>C. albicans</i> : cas de la lotion .....	77
Figure 16: Hydrodistillation du thym .....	87
Figure 17: Huile essentielle de thym .....	88
Figure 18: Hydrodistillation de l'huile essentielle de thym .....	90
Figure 19: Huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .....	90
Figure 20: Préparation de la solution de Mac FARLAND .....	90
Figure 21: Échantillons de lait et lotions pour le challenge test .....	90
Figure 22: Colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	90
Figure 23: Dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	90
Figure 24 : Colonies de <i>Candida albicans</i> .....	91
Figure 25: Dénombrement des colonies de <i>Candida albicans</i> .....	91
Figure 26: Épreuve d'analyse sensorielle .....	91
Figure 27: Épreuve d'analyse sensorielle .....	91
Figure 28: Échantillons des laits démaquillant pour le test de stabilité .....	91
Figure 29: Échantillons des laits lotions pour le test de stabilité .....	91
Figure 30: <i>Staphylococcus aureus</i> .....	95
Figure 31: <i>Candida albicans</i> .....	96
Figure 32: Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse .....	97
Figure 33: Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .....	99
Figure 34: Profil chromatographique de l'huile essentielle de girofle clou ( <i>Eugenia caryophyllata</i> ).....	99
Figure 35: Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>mandravasarotra</i> ( <i>Cinnamosma fragrans</i> )	100
Figure 36: Ajustement de l'inoculum .....	124
Figure 37: Ajustement de l'inoculum .....	126

## LISTE DES ABREVIATIONS

- **AFNOR** : Association Française de Normalisation
- **ANOVA** : Analyse de la variance
- **BPF** : Bonnes Pratiques de Fabrication
- **CMB** : Concentration Minimale Bactéricide
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **CPG** : Chromatographie en phase gazeuse
- **DLUO** : Date Limite d'Utilisation Optimale
- **ESSA** : École Supérieure des Sciences Agronomiques
- **FDA** : Foods and Drugs Administration
- **HE** : Huile Essentielle
- **HPLC** : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide à haute performance)
- **IAA** : (Département) Industries Agricoles et Alimentaires (ESSA)
- **IK** : Indice de Kovats
- **ISO** : International Standards Organization
- **RNF** : Réseau Normalisation et Francophonie

# *Introduction*

Rapport-Gratuit.Com

## INTRODUCTION

L'homme a depuis fort longtemps été désireux de modifier et d'améliorer son apparence. Les premières utilisations des cosmétiques sont presque aussi anciennes que lui. Déjà lors de la Préhistoire, il réalisait de la peinture corporelle d'origine minérale mélangée à des corps gras pour embellir et protéger sa peau. Depuis, l'application des cosmétiques a considérablement évolué. Depuis le XX<sup>ème</sup> siècle et surtout avec l'Industrialisation, les produits sont de plus en plus variés.

A présent, ces produits sont conçus dans la majorité des cas avec des produits de synthèse ou encore des dérivés pétroliers, ce qui a permis de baisser fortement leurs prix. Toutefois, dans les produits cosmétiques d'aujourd'hui, ce sont les composants des parfums et les conservateurs qui représentent les allergènes les plus fréquemment rencontrés ; viennent ensuite les excipients et les émulsifiants. Pour le cas des conservateurs, les parabènes sont les plus utilisés en cosmétique. Ils ont fait l'objet de nombreuses études qui ont démontré leur large spectre d'action contre divers microorganismes. Néanmoins, la controverse sur leur emploi s'accroît depuis des études britanniques effectuées en 2004 qui ont permis la détection des traces de parabènes dans des échantillons du cancer du sein [11]. D'autre part, la tendance actuelle vers les cosmétiques biologiques devient de plus en plus considérable.

Par ailleurs, l'usage des cosmétiques à Madagascar est relativement ancien. Actuellement cela ne se limite plus aux « recettes traditionnelles » : les malgaches se tournent de plus en plus vers les produits de synthèse. Dans un soucis de sécurité ainsi que de bien-être du consommateur, il nous a donc semblé judicieux avec la société HOMEOPHARMA de nous intéresser à la question suivante : « Quels sont les additifs à base de plante qui pourraient jouer le rôle de conservateur et seraient compatibles avec les produits cosmétiques à Madagascar pour le cas de la société HOMEOPHARMA ? »

Afin d'obtenir réponse à cette question, des revues bibliographiques ont été réalisées en amont suivis de divers travaux de laboratoire, des analyses sensorielles et des enquêtes sociodémographiques.

La présente étude se subdivisera donc en trois parties : après les généralités sur les cosmétiques, les conservateurs en général et l'exposé de la méthodologie, la deuxième partie traitera des matériels et méthodes mis en œuvre pour le bon déroulement de l'étude et la troisième partie traitera des résultats, des discussions ainsi que des recommandations et permettra alors de répondre à la question fondamentale posée précédemment.

# Généralités sur l'étude

## I. GÉNÉRALITÉS SUR L'ETUDE

### 1.1. Généralités sur les produits cosmétiques

#### 1.1.1. Définition

Un cosmétique est une substance ou un mélange destiné à être mis en contact avec diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaires, les ongles, les lèvres, les organes génitaux externes, les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, protéger, parfumer, maintenir en bon état, de modifier leur aspect ou d'en « corriger » l'odeur. Les cosmétiques sont des produits d'hygiène et d'embellissement. De manière plus générale, la cosmétique désigne l'ensemble des procédés et traitements destinés à embellir. [24]

#### 1.1.2. Composants d'un produit cosmétique

Un produit cosmétique est généralement composé de :

- L'excipient ou base : c'est la partie la plus importante du point de vue quantitatif : eau, huile, cire et émulsifiants pour une émulsion ; eau, tensioactifs et épaississant pour les shampoings ou gels douches ; mélange d'alcool gras, de cires et d'huiles pour les rouges à lèvres.
- Les principes ou agents actifs : ce sont eux qui confèrent leurs propriétés soignantes aux cosmétiques. Les substances hydratantes ou les filtres solaires protecteurs sont des agents actifs, tout comme les vitamines.
- Les substances auxiliaires (additifs) : elles stabilisent les préparations cosmétiques. Les conservateurs et les antioxydants sont comptés parmi ces dernières.
- Les parfums : un produit de beauté n'aurait pas forcément besoin d'être parfumé, mais l'achat se fait aussi avec le nez : l'odeur joue un rôle prépondérant dans la prise de décision. [19]

#### 1.1.3. Émulsifiant

Les émulsifiants sont d'importants agents stabilisants. La peau réussit tout naturellement à émulsionner l'huile et l'eau. Mais pour que la phase aqueuse et la phase huileuse d'un produit cosmétique forme une émulsion agréable, l'ajout d'un tiers : l'émulsifiant est nécessaire. [19]

- Composition d'une émulsion

L'émulsion cosmétique est un cocktail dont les principaux composants sont la phase aqueuse et la phase huileuse.

- La phase aqueuse est constituée d'eau et de substances hydrosolubles, comme les extraits de plantes
- La phase huileuse est généralement composée d'huiles, de cires, d'alcools gras, d'esters d'acide gras ou des composants gras comme par exemple l'huile d'avocat ou l'huile de noyau d'abricot.

Il existe deux types d'émulsions :

- L'émulsion « huile dans l'eau » dans laquelle les gouttelettes d'huile sont en suspension dans l'eau. L'eau forme une phase continue dans laquelle sont incorporées les

gouttelettes d'huile constituant la phase discontinue. Et puisque la phase continue est aqueuse, cette émulsion a un fort pouvoir hydratant, s'étale facilement et est rapidement absorbée.

- L'émulsion « eau dans l'huile » dans laquelle les gouttelettes d'eau sont enfermées dans l'huile, cette dernière formant la phase continue. Une telle émulsion couvre les besoins de la peau en graisse et en eau ; elle est mieux adaptée aux soins de nuit.

Dans la réalité, plus de 90% des formules de soins ont le même et unique excipient : l'émulsion. C'est une « recette de base » à partir de laquelle est élaborée toute palette de produits : lait nettoyant, crème pour le visage, crème solaire ou soins capillaires. Le grand avantage des émulsions est qu'elles sont bien tolérées par la peau car leur composition est très proche de la couche hydrolipidique naturelle de l'épiderme.

#### **1.1.4. Qualités requises par un produit cosmétique ou produit d'hygiène corporelle**

Toute formulation cosmétique doit [2]:

- Respecter l'intégrité de la peau,
- Maintenir son pH physiologique ou permettre un retour rapide à la normale,
- Être bien tolérée et d'une parfaite innocuité toxicologique et microbienne pour l'utilisateur,
- Avoir une **texture** agréable,
- Être facile d'emploi.

#### **1.1.3. Étiquetage des produits cosmétiques**

Les récipients et/ou emballages doivent porter, en caractères indélébiles, facilement lisibles et visibles:

- le nom ou la raison sociale, et l'adresse ou le siège social, du fabricant ou du responsable de la mise sur le marché du produit cosmétique établi à l'intérieur de la Communauté;
- le contenu nominal au moment du conditionnement indiqué en poids ou en volume;
- la date de durabilité minimale annoncée par la mention "À utiliser de préférence avant fin..." pour les produits dont la durabilité minimale est inférieure à 30 mois;
- la durée d'utilisation après ouverture sans dommage pour le consommateur pour les produits dont la durabilité minimale excède 30 mois. Cette information est indiquée par un symbole spécial qui représente un pot de crème ouvert;
- les précautions particulières d'emploi;
- le numéro de lot de fabrication ou la référence du produit permettant l'identification de la fabrication;
- la fonction du produit. [2]

## 1.2. Contamination microbienne des produits cosmétiques

### 1.2.1. Origine des contaminations

Une des principales sources d'altération des produits cosmétiques est d'origine microbiologique (les sources de contamination sont essentiellement les ingrédients, surtout à l'eau). [21]

Un produit cosmétique peut en effet être contaminé par des microorganismes de plusieurs manières. Ces microorganismes se multiplient jusqu'à produire un nombre total de bactéries susceptible d'altérer la qualité du produit et de nuire à la santé des consommateurs, allant d'infections simples jusqu'à des réactions allergiques graves. [38]

Les sources possibles de contamination microbienne des produits cosmétiques sont très nombreuses. Il y a :

- ♣ Les contaminations survenant au cours de la fabrication dues :
  - aux matières premières souillées (l'eau, les produits d'origine végétale, animale ou tellurique) pouvant servir de nutriments aux micro-organismes ;
  - aux locaux ou à des matériels inadaptés ou insuffisamment protégés des causes de pollution : courant d'air, humidité, eau stagnante, etc. ;
  - au personnel qui sont des éventuels porteurs de germes par leurs peaux, leurs cheveux, leurs salives, leurs vêtements, leurs chaussures, etc. et par leurs déplacements dans les ateliers de fabrication.
- ♣ Les contaminants survenant après la fabrication dus :
  - au conditionnement primaire comme les articles de conditionnement (flacons, tubes, etc.) emballés directement dans des cartons, sans un isolement de ce dernier par un sac en matière plastique ;
  - à l'utilisation par le consommateur du produit (prélèvement avec les doigts, remise dans le récipient d'excédents de produit prélevé, introduction involontaire d'eau lors de l'usage ou de la refermeture du flacon).

### 1.2.2. Nature des contaminants

Les bactéries sont les agents contaminants les plus fréquemment rencontrés aussitôt après la fabrication des produits. Les champignons inférieurs (moisissures, levures) sont moins fréquents. Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont le plus souvent isolées des produits cosmétiques non utilisés ; cette fréquence s'explique par l'origine hydrique de ces germes. Viennent ensuite les genres *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, etc.

En cours d'utilisation, la nature des contaminants retrouvés n'est pas identique : les genres *Staphylococcus* sont alors les germes les plus fréquemment rencontrés.

Selon la norme internationale ISO 18415 [8], portant sur Cosmétiques- Microbiologie- Détection des micro-organismes spécifiés et non spécifiés : pour les cosmétiques et d'autres

produits topiques, la détection d'agents pathogènes pour la peau tels que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* peut être justifié car ils peuvent engendrer des infections cutanées ou ophtalmiques. La détection d'autres sortes de micro-organismes peut aussi représenter un intérêt car ces micro-organismes (y compris des indicateurs de contamination fécale, par exemple *Escherichia coli*) laissent penser à une défaillance de l'hygiène au cours du processus de fabrication.

Ce sont d'ailleurs les germes dont des indications spécifiques sont données pour leur identification. Les normes correspondantes sont les suivantes pour :

- *Staphylococcus aureus* : ISO 22718:2006 Cosmétiques — Microbiologie — Recherche de *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa* : ISO 22717:2006 Cosmétiques — Microbiologie — Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*
- *Candida albicans* : ISO 18416 : 2007 Cosmétiques — Microbiologie — Recherche de *Candida albicans*
- *Escherichia coli* : NF ISO 21150 : Cosmétiques — Microbiologie — Détection d'*Escherichia coli*

### 1.2.3. Conséquence des contaminations

La contamination microbiologique d'un produit cosmétique peut être préjudiciable sur un double plan :

- Sur le plan de la santé pour le consommateur. En cas d'utilisation d'un produit contaminé, le risque sera fonction de la nature du germe contaminant, de l'importance de la contamination du produit et du site corporel où sera déposé le produit. La peau saine, avec sa microflore résidente, constitue une barrière efficace vis-à-vis des microorganismes exogènes, de plus la quantité de produit déposé par unité de surface cutanée est faible ( $1\text{mg/cm}^2$ ). Le risque sera d'autant plus important si le produit est utilisé sur une peau lésée, au voisinage d'une muqueuse (muqueuse oculaire par exemple), chez le très jeune enfant, chez les sujets dont la résistance aux infections est diminuée, etc.

- Sur le plan économique pour le fabricant. En effet, outre le coût du rejet de lots trouvés contaminés par le laboratoire de contrôle, les modifications des caractères organoleptiques et physico-chimiques du produit, qui surviennent souvent lorsque la contamination devient importante, peuvent détourner le client de l'achat du produit.

Les modifications observées peuvent être :

- Un changement de coloration dû : soit à la dégradation de composants du produit, soit à la formation de métabolites diffusibles par les contaminants (pigments de *Pseudomonas* par exemple) ;

- L'apparition de colonies parfois pigmentées, en surface des produits pâteux présentés en pots (*Flavobacterium*, *Micrococcus*, levures, moisissures, etc.). cette apparition de colonies peut

être favorisée par la présence, en surface du produit, de gouttelettes d'eau de condensation formées après fermeture du contenant (pots) ;

- L'apparition de troubles, de floculats dans les produits limpides, constitués par la biomasse microbienne et/ou par des composants des produits insolubilisés sous l'influence du métabolisme microbien ;

- L'apparition de gaz, le plus souvent due au développement de bactéries anaérobies ;

- Une modification des caractères rhéologiques : variation de viscosité, rupture des émulsions ;

- Un changement olfactif : certains microorganismes produisent des composés d'odeur plus ou moins désagréable qui vont modifier le parfum habituel du produit ;

- Une modification de pH de la préparation, une oxydation, une réduction ou une hydrolyse d'actifs ou d'additif, etc. réactions dues à l'activité des enzymes bactériens. [16]

### 1.3. Paramètres et normes microbiologiques

Il n'existe pas de paramètres et de normes microbiologiques officiels, relatifs à la qualité microbiologique des produits cosmétiques, mais seulement les limites proposées et recommandées par la profession.

Ces limites comprennent des spécifications quantitatives, des spécifications qualitatives reproduites dans le tableau suivant, ainsi que les critères d'acceptation. Pour ces derniers, il est indiqué que « tous les échantillons doivent être conformes aux spécifications quantitatives et qualitatives ».

Tableau I: Limites microbiologiques pour les produits cosmétiques [4]

MICROORGANISMES	LIMITES
<b>Spécifications quantitatives (prise d'essai de 1g ou de 1ml minimum)</b>	
Microorganismes aérobies mésophiles revivifiables	
Catégorie 1 : produits destinés aux bébés et à la zone oculaire	$\leq 10^2$ UFC/g ou /ml
Catégorie 2 : autres produits	$\leq 10^3$ UFC/g ou /ml
<b>Spécifications qualitatives</b>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Non détectable dans un échantillon de
<i>Staphylococcus aureus</i>	produit de 0,1g ou 0,1ml
<i>Candida albicans</i>	

### 1.4. Conservateurs

#### 1.4.1. Généralités

Selon la définition de la communauté européenne de la directive 95/2/CE, on entend par conservateur toute substance qui prolonge la conservation des produits en les protégeant contre les altérations dues aux microorganismes [3]. Selon le Nouveau précis d'esthétique cosmétique, 5ème

édition, dans les cosmétiques, un conservateur a pour rôle de protéger les produits cosmétiques des contaminations microbiennes et fongiques au cours de la fabrication et lors de l'utilisation. [28].

Compte tenu des risques liés à un développement de microorganismes dans un produit cosmétique, le formateur doit, dans la majorité des cas, se poser la question de l'addition d'un agent conservateur adapté à la formule considérée. Certaines formulations peuvent posséder une autoprotection suffisante et ne nécessitent pas l'ajout d'un conservateur antimicrobien. Cette autoprotection peut être la conséquence des caractéristiques physico-chimiques de la formulation ou liée à la présence en quantité suffisante d'actifs ou d'additifs possédant des propriétés antimicrobiennes. Ces derniers peuvent être introduits dans la formulation pour une autre fonction que la conservation (conservateurs proprement dits + substances pouvant participer à la conservation) du produit et doivent être capables de développer, au sein du produit cosmétique, des propriétés microbiostatiques et microbicides étendues, sans toutefois interférer notablement sur la flore cutanée normale lors d'une application unitaire.

#### 1.4.2. Autoprotection des formulations

##### 1.4.2.1. Protection par les caractéristiques physico-chimiques de la formulation

Certaines caractéristiques physico-chimiques des préparations peuvent influencer la capacité de multiplication et/ou de survie des microorganismes. [16]

###### a. pH

Un pH inférieur à 4 ou supérieur à 8 peut inhiber la multiplication de la majorité des bactéries et participer à la protection du produit. Cependant un pH acide peut permettre la croissance de champignons microscopiques. [16]

###### b. Activité de l'eau ou $a_w$

L' $a_w$  minimale pour laquelle les microorganismes peuvent se multiplier varie selon les espèces microbiennes. Les espèces du genre *Pseudomonas* exigent une quantité d'eau libre très importante et peuvent rarement survivre dans un milieu dont l' $a_w$  est inférieure à 0,96. Les autres bacilles à Gram négatif peuvent survivre à une  $a_w$  de 0,90. Les staphylocoques et les microcoques sont moins exigeants : *Staphylococcus aureus* peut survivre à une  $a_w$  de 0,86. Les levures et moisissures sont encore moins exigeantes ( $a_w$  minimale : 0,60). Les spores bactériennes sont également très résistantes à la diminution de l' $a_w$ . [16]

##### 1.4.2.2. Protection par un conservateur

Si la formule ne possède pas un pouvoir auto-protecteur suffisant, un conservateur antimicrobien doit être ajouté. Divers critères vont orienter le choix de ce conservateur : l'innocuité, le spectre d'activité, la compatibilité avec le processus de fabrication, notamment si une phase de chauffage intervient dans le processus, la solubilité dans l'eau, le pH de la formulation, le coefficient de partage huile/eau, la compatibilité avec les autres composants, la compatibilité avec les matériaux de conditionnement. [16]

## 1.5. Conservateurs utilisés dans les cosmétiques

### 1.5.1. Conservateurs synthétiques

#### 1.5.1.1. Parabène

##### b) Généralités

L'utilisation de conservateurs dans les produits cosmétiques est très répandue. Les plus utilisés sont de loin les parabènes.

Un **parabène** est un parahydroxybenzoate d'alkyle, c'est-à-dire un ester résultant de la condensation de l'acide parahydroxybenzoïque avec un alcool. Ses propriétés antibactérienne et antifongique font qu'il est généralement utilisé comme conservateur dans les cosmétiques, les médicaments et les aliments. Les parabènes sont généralement synthétiques mais existent également à l'état naturel dans certains aliments. Les produits de l'abeille (propolis, gelée royale,...) en sont particulièrement riches mais également certains fruits comme l'orge, la pêche, la fraise. On les trouve naturellement comme précurseurs de Coenzyme Q10 dans le corps humain et plus particulièrement dans le corps de la femme. [24].

##### c) Propriétés physico-chimiques

La structure générale d'un parabène étant donnée par l'illustration ci-dessous, les différents composés de cette famille diffèrent par la nature du groupe alkyle R.

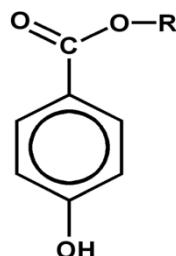


Figure 1: Structure générale des parabènes [24].

Les parabènes constituent une famille d'ingrédients. Ils sont tous assez proches mais différents par leurs structures chimiques, notamment par la longueur de la chaîne alkyle).

Les propriétés physico-chimiques des principaux parabènes sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau II: Propriétés physico-chimiques des principaux parabènes [24].

R-	Méthyl	Éthyl	Propyl	Butyl
Désignation de l'additif (ester/sel)	E218/E219	E214/E215	E216/E217	-
Masse molaire (g/mol)	152,05	166,06	180,08	194,09
Point de fusion (°C)	131	116 - 118	96 - 98	68 - 69

<b>Point d'ébullition (°C)</b>	270 – 280	297 - 298		
<b>Solubilité dans l'eau à (25°C)</b>	0,25%	0,17%	0,05%	0,02%
<b>Apparence à 25°C</b>	Cristaux incolores sans odeurs et sans goût			

#### d) Utilisations

Du fait de leur activité effective antibactérienne et antimycosique, ils sont utilisés comme conservateurs dans des aliments, des boissons, des cosmétiques et des produits pharmaceutiques. Ils sont retrouvés dans plus de 80 % des produits d'hygiène et de toilette dont des shampoings, des crèmes hydratantes, mousses à raser, gels nettoyant,... [24]

Dans les **industries alimentaires** : les parabènes ont été ajoutés aux aliments depuis plus de 50 ans et leur emploi s'est étendu progressivement à un nombre plus grand d'aliments. Les parabènes les plus utilisés sont les methylparabène et propylparabène. Leur plus forte incorporation est retrouvée dans les [3]:

- gâteaux, pâtisseries, glaçages, garnitures : 0,03 à 0,06% avec un rapport methyl/propyl de 1 sur 3,
- boissons sucrées, crèmes et pâtes : 0,1% avec une combinaison de parabènes,
- confitures, gelées, condiments : 0,07% avec un rapport methyl/propyl de 2 sur 1,
- olives, conserves : mélange de divers parabènes à 0,1%,
- sirops à la concentration de 0,07%.

**Cosmétiques** : L'incorporation majoritaire des parabènes dans les cosmétiques est due à leur faible toxicité, leur spectre d'activité important (bactéries, moisissures, levures, champignons), l'absence d'interaction avec les autres substances contenues dans les cosmétiques, leur stabilité, leur biodégradabilité, leur acceptation par les différents organismes de régulation internationaux et leur faible coût.

Les parabènes, seuls ou en association avec d'autres conservateurs sont utilisés dans tous les types de cosmétiques qui peuvent être en contact avec la peau, les cheveux et le cuir chevelu, les lèvres, les muqueuses, les aisselles et les ongles. Les parabènes les plus utilisés en 1995 étaient par ordre de décroissance, respectivement, methyl, ethyl, propyl, butyl, benzylparabène. Il existe une pénétration transcutanée des parabènes.

Ils peuvent être utilisés à des concentrations de 0,4% (acide) pour un ester et 0,8% (acide) pour un mélange d'esters... [35]

**Médicaments.** Les parabènes sont utilisés depuis les années 1950 et ils ont été employés comme conservateurs dans de nombreux produits médicaux. Parmi, les parabènes, le propylparabène est l'un des plus efficaces contre les mycoses. [22]

### e) Consommation par l'être humain du parabène

Les résultats sont analysables seulement pour les methyl et propylparabènes. Selon la FDA (Food and Drug Administration), la consommation quotidienne de methylparabène est de 0,6 mg par jour (0,01 mg/kg/j) et celle de propylparabène est de 0,78 mg par jour (0,013 mg/kg/j) pour une personne de 60 kg. En plus des produits alimentaires, les parabènes sont aussi consommés via les cosmétiques et les produits d'hygiène (0,833 mg/kg/j) et les médicaments (0,417 mg/kg/j).

La consommation totale de parabène est ainsi estimée à 75,78 mg/j ou 1,26 mg/kg/j pour une personne pesant 60 kg. La quantité supposée apportée par les aliments serait de l'ordre de 1 mg/j, celle des cosmétiques de 50 mg/j et celle des médicaments de l'ordre de 25 mg/j. [22].

### f) Dangers par rapport à l'utilisation du parabène [3].

#### *Controverses sur le parabène*

En 2010, l'utilisation de parabènes porte à controverse en raison de leur capacité à activer les récepteurs des œstrogènes, induisant une possible action sur la fertilité et les tumeurs œstrogéno-dépendantes, comme le cancer du sein. Le 3 mai 2011, l'Assemblée Nationale a adopté une proposition de loi interdisant l'utilisation du parabène en France.

En effet, la structure cyclique des parabènes se rapproche de celle de l'œstradiol ; œstrogène primaire, naturellement présent et indispensable au maintien des caractères sexuels secondaires et à la fertilité chez la femme. En conséquent, il est possible que les parabènes agissent sur les phénomènes biologiques liés au cycle des œstrogènes.

Les travaux de TAVARES *et al.* (2009) ont montré que les parabènes étaient capables de se lier aux récepteurs à œstrogènes, d'activer les gènes contrôlés par ces récepteurs, de stimuler la croissance cellulaire et d'augmenter le niveau de protéines réceptrices aux œstrogènes. Cela explique l'effet œstrogénique mis en évidence par plusieurs études. [3]

Les propriétés physiques des parabènes, notamment leur liposolubilité qui augmente avec la taille de leur chaîne alkyle, leurs permettant de pénétrer la couche cornée de la peau. Une étude réalisée par PRUSAKEWICZ *et al.* (2007) a montré que les parabènes empêchaient la sulfatation des œstrogènes par l'inhibition de l'activité de la sulfotransférase dans la peau. Cette enzyme jouant un rôle dans la régulation négative de la production d'œstradiol, les parabènes ont le pouvoir d'augmenter la quantité d'œstrogène présents dans le derme. Cela explique que l'application cutanée chronique des parabènes peut provoquer des effets œstrogéniques. [3]

Mais la polémique réside surtout dans la découverte des parabènes dans des tissus des cancers du sein chez la femme d'après les études menées par DARBLE *et al.* (2004) et qui mènent à l'hypothèse que les parabènes peuvent être à l'origine du cancer de sein. Cependant aucune étude épidémiologique n'a été publiée pour supporter ou réfuter l'hypothèse d'un lien entre l'application du parabène et l'augmentation de l'incidence du cancer du sein. [3]

### 1.5.1.2. 2-phénoxy-éthanol

#### a) Généralités.

Le 2-phénoxyéthanol est un éther de glycol aromatique de formule brute  $C_8H_{10}O_2$  utilisé dans les produits dermatologiques tels que les crèmes pour la peau et les crèmes solaires pour ses propriétés d'agent de conservation et de solvant. [24]

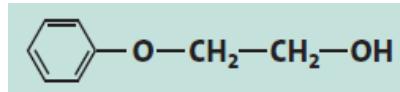


Figure 2: Formule générale du 2-phénoxyéthanol [24].

#### b) Propriétés physiques.

Le 2-phénoxyéthanol est un liquide huileux incolore, de faible odeur aromatique. Il est modérément soluble dans l'eau (2,7g/100ml à 20°C), très soluble dans l'alcool, l'éther, l'acétone, le glycérol, le propylène glycol, les solutions de soude, légèrement soluble dans les huiles minérales. Ce conservateur sert aussi souvent de solvant pour d'autres conservateurs, en particulier pour les parabènes. [1]

Les principales caractéristiques physiques du 2-phénoxyéthanol sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Tableau III: Caractéristiques physiques du 2-phénoxyéthanol [24].

Masse molaire	138,16 g/mol
Point de fusion	14°C
Point d'ébullition	245°C
Densité $d_{20}^{20}$	1,109
Point éclair	121 - 127°C

#### c) Propriétés chimiques

Le 2-phénoxyéthanol est un produit stable dans les conditions normales de température et de pression. Il est également stable en présence d'acides et de bases.

Il peut réagir vivement avec les oxydants forts avec risque d'incendie et d'explosion. C'est un produit combustible. Les produits de combustion sont des oxydes de carbone.

Son noyau benzénique lui confère également des propriétés parfumantes.

#### d) Utilisations [24].

Le 2-phénoxyéthanol est présent à l'état naturel dans le thé vert et la chicorée. Mais il est la plupart du temps synthétisé et utilisé comme :

- solvant pour peintures, vernis, laques, encres d'imprimerie, colorants ;
- Intermédiaires de synthèses ;
- biocide entrant dans la composition de produits d'entretien ménagers et industriels (agents de nettoyage, désinfectants...), l'industrie textile, ...
- biocides, répulsif d'insectes, agents de conservation pour cosmétiques, produits d'hygiène corporelle, produits pharmaceutiques à usage humain ou vétérinaire, fixateur de parfum.

#### e) Dose

Cette substance est un allergène reconnu très puissant. Il est autorisé par la législation pour une concentration maximale de 1 %, en tant que conservateur. [20].

#### f) Toxicité sur l'homme

Il existe peu de données concernant la toxicité du 2-phénoxyéthanol chez l'homme. Les effets décrits sont des allergies cutanées et des troubles neurologiques. Concernant la toxicité aiguë, les concentrations jusqu'à 10% (dans la vaseline) appliquées sur la peau de volontaires ne provoquent pas d'effets irritants. Par contre plusieurs cas de sensibilisation cutanée (eczéma ou urticaire) sont rapportés. La fréquence est faible et les cas sont le plus souvent en rapport avec une utilisation régulière dans des cosmétiques. Les données sur les risques cancérogènes ou les effets sur la reproduction liés au 2-phénoxyéthanol ne sont pas encore connues.

#### 1.5.1.3. Formaldéhyde

##### a) Généralités

Le méthanal ou formaldéhyde ou aldéhyde formique ou formol est un composé organique de la famille des aldéhydes, de formule chimique  $\text{CH}_2\text{O}$ . C'est d'ailleurs le plus simple des composés de cette famille. À température ambiante, c'est un gaz inflammable. Le terme formol est généralement réservé à des solutions aqueuses. La structure du formaldéhyde est représentée par la figure suivante [24]:

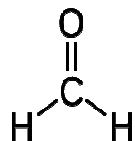


Figure 3: Formule développée du formaldéhyde [24].

##### b) Propriétés physiques

L'aldéhyde formique est un composé organique volatile. Il possède une odeur caractéristique (piquante et suffocante) et c'est un composé incolore. Très inflammable il est soluble dans l'eau (à 99%), l'alcool et les solvants organiques. [24].

Les principales caractéristiques physiques du formaldéhyde sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau IV: Caractéristiques physiques du formaldéhyde [5].**

Massé molaire	30,03 g
Point de fusion	-92,0 à -118,0 °C
Point d'ébullition	-19,2°C
Densité	1,04
Point éclair	32 à 61°C

### **c) Propriétés chimiques**

Le méthanal possède la plupart des propriétés chimiques des aldéhydes, mis à part le fait qu'il soit plus réactif. De plus, il est remarquablement électrophile, et peut réagir par substitution électrophile aromatique avec les composés aromatiques ou par addition électrophile sur les alcènes.

Enfin, le formol (methanal) est facilement oxydé par le dioxygène de l'air pour former de l'acide formique. C'est pourquoi il faut conserver le méthanal dans des récipients bien étanches. [24].

### **d) Utilisations**

Le méthanal est utilisé comme :

- désinfectant, notamment en médecine vétérinaire (pédiluves de désinfection) ;
- fixateur et conservateur de cadavres d'animaux ou d'humains (pour les dissections d'écoles de médecine par exemple)
- conservateur dans certains vaccins ;
- pour assécher ou tuer la peau (pour le traitement médical des verrues par exemple) ;
- en dentisterie ; sous forme directe (formaldéhyde) ou dérivée (paraformaldéhyde, polyoxyméthylène)
- pour embaumer les corps,
- pour produire des polymères et des produits chimiques (plus de 50 % du total des usages du méthanal) ; etc. [24].

### **e) Dose**

Classé cancérogène et très allergisant, sa concentration ne doit pas dépasser 0,2 %. [20]

### **f) Toxicité sur l'homme**

Le formaldéhyde est une substance qui réagit de façon rapide et quasi complète avec les différents composants organiques des cellules avec lesquels il entre en contact, qu'il s'agisse de protéines, de lipides ou d'acides nucléiques (composants des chromosomes). Ceci explique la plupart, sinon tous les effets néfastes provoqués par cette molécule qui sont essentiellement des lésions locales au point de contact. [36].

- Effets locaux :

Les solutions de formaldéhyde sont irritantes pour la peau et sévèrement pour les yeux. Les vapeurs provoquent une irritation sensorielle transitoire et réversible des yeux et des voies respiratoires.

Le formaldéhyde peut également provoquer des allergies cutanées. Ces allergies sont déclenchées par un contact direct avec un produit contenant du formaldéhyde ou des matériaux en libérant. Lors du contact, le formaldéhyde se lie aux protéines qu'il rencontre et c'est ce produit qui déclenche le mécanisme allergique. Les allergies se manifestent généralement par un eczéma de contact localisé mais parfois également par des réactions généralisées (choc anaphylactique). Elles sont principalement d'origine domestique provenant des contacts avec les produits cosmétiques et des produits ménagers. [36].

- Autres effets

Des symptômes de type fatigue, maux de tête, trouble du sommeil ont été rapportés pour des individus exposés à une concentration qui dépasse 0,3ppm. [36].

#### 1.5.1.4. Benzoate de sodium

##### a) Généralités

Le benzoate de sodium (E211) est le sel de sodium de l'acide benzoïque. Sa formule chimique est représentée par la figure suivante [24] :

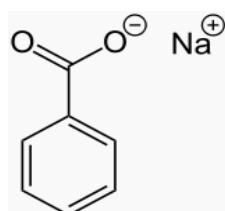


Figure 4: Formule générale du benzoate de sodium [24].

L'acide benzoïque est présent naturellement dans certains fruits comme les canneberges ou airesles à des concentrations de l'ordre de 0,6 g·l<sup>-1</sup>. Il est aussi présent dans les produits laitiers par la fermentation de l'acide hippurique à des concentrations de l'ordre de 16 mg·kg<sup>-1</sup>.

L'acide benzoïque peut également être produit industriellement ; il est ensuite dissout dans une solution d'hydroxyde de sodium pour former du benzoate de sodium.

##### b) Propriétés

Les propriétés physiques du benzoate de sodium sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau V: Caractéristiques physiques du benzoate de sodium [24].

Masse molaire	144 g
Point de fusion	Au dessus de 300 °C
Masse volumique	1,44 g·cm <sup>-3</sup>
Température d'auto-inflammation	>500 °C
Point éclair	>100 °C

### c) Utilisation

Le benzoate de sodium est utilisé comme conservateur alimentaire, autorisé sous condition et référencé en Europe sous le code E211. Il est autorisé en cosmétique biologique comme fongicide et antibactérien. Employé seul il est surtout efficace pour des préparations ayant un pH inférieur à 4. Il est le plus souvent associé au sorbate de potassium. [23].

Aux États-Unis, la Food and Drug Administration limite la concentration d'utilisation dans les aliments à 0,1 %.

Il est utilisé pour préserver toutes sortes de produits cosmétiques (crèmes, lotions, shampoings ...), peintures et colles acides avec une concentration moyenne 0.1-0.5%

### d) Effets sur la santé

Cet additif est autorisé, mais il est suspecté, seul ou en association avec des colorants et additifs alimentaires d'avoir des effets sur la santé des enfants.

Des colorants s'étaient déjà montrés capable d'exacerber l'hyperactivité, syndrome qui affecte de nombreux enfants aux USA, mais selon une étude publiée en septembre 2007, le benzoate de sodium pourrait aussi être un facteur d'hyperactivité, cette fois chez des enfants de la population générale et pas seulement chez des enfants déjà hyperactifs. Les chercheurs doivent encore vérifier s'il s'agit d'une synergie entre le benzoate de sodium et certains colorants, ou si c'est l'effet du seul benzoate de sodium.

#### 1.5.1.5. Sorbate de potassium

##### a) Généralités [24].

Le sorbate de potassium (E202) est un additif alimentaire, plus précisément un agent conservateur. Chimiquement, c'est un sel de potassium de l'acide sorbique (E200). Il est synthétisé chimiquement et on le retrouve dans de nombreux aliments tels que les yaourts aux fruits, les sauces et les boissons.

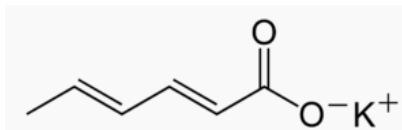


Figure 5: Formule générale du sorbate de potassium [24].

### b) Propriétés

Le tableau suivant fournit quelques indications sur les propriétés physiques du sorbate de potassium

Tableau VI: Caractéristiques physiques du sorbate de potassium [24].

Masse molaire	150 g
Point de fusion	270 °C
Masse volumique	1,363 g·cm <sup>-3</sup>

### c) Utilisations

Le sorbate de potassium est un conservateur alimentaire autorisé en cosmétique bio, efficace contre les moisissures, levures et bactéries aérophile dans une gamme de pH de 2 à 6,5. Il est le plus souvent associé au Benzoate de Sodium

Avec une concentration moyenne 0.1-0.5%, il est utilisé pour préserver toutes sortes de produits cosmétiques (crèmes, lotions, shampoings ...), peintures et colles légèrement acides (solutions de gomme arabique ...) [23].

## 1.6. Problématique et présentation de l'étude

De part les controverses sur l'utilisation des conservateurs d'origine chimique depuis quelques années, et dans un souci du bien-être et de la sécurité des consommateurs, en association avec la société HOMEOPHARMA (cf annexe II), nous nous sommes proposés d'effectuer une étude sur les conservateurs naturels qui peuvent être utilisés dans les cosmétiques. Par ailleurs, la tendance actuelle se penche sur les « cosmétiques biologiques », l'élaboration de produits avec des conservateurs naturels constituerait un pas vers cette propension.

A travers cette étude, nous nous proposons de répondre à la question suivante « quels sont les conservateurs à base de plante qui seraient compatibles avec les produits cosmétiques pour le cas de la société HOMÉOPHARMA à Madagascar? »

### 1.6.1. Buts et objectifs

Le but de l'étude est de mettre à la disposition des malgaches des produits cosmétiques dont la majorité des matières premières soit d'origine naturelle pour contribuer au bien être et à la sécurité des consommateurs. Les conservateurs choisis doivent contribuer à maintenir la stabilité du produit au cours du temps et avoir des activités antioxydantes et antibactériennes selon les normes requises.

L'étude vise donc à vérifier les hypothèses suivantes :

H1 : Les huiles essentielles choisies en tant que conservateur contiennent des composantes qui agissent en tant que conservateurs dans les produits cosmétiques

H2 : Ces conservateurs sont efficaces sur les plans physico-chimiques, microbiologiques et acceptables d'un point de vue sensoriel

### 1.6.2. Méthodologie de travail

Les principales méthodes de travail suivantes ont été utilisées :

- Des études bibliographiques et webographiques ont été menées en amont et tout au long de l'expérimentation.
- Les enquêtes socio-économiques sur un échantillon sélectionné de population pour dégager les attitudes des utilisateurs de cosmétiques face aux produits qui contiennent des conservateurs naturels
- Des expérimentations par laquelle des essais d'incorporation des conservateurs dans les produits ont été effectués dans le laboratoire de Recherches et Développement, des analyses sur CPG des huiles essentielles sélectionnées, des analyses sensorielles (détermination du seuil de détection des huiles essentielles et hédoniques) et enfin la vérification de l'efficacité des conservateurs retenus par des «challenge test» effectués dans le laboratoire de microbiologie.

## 1.7. Choix des huiles essentielles

Les effets antimicrobiens de différentes espèces de végétaux et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction d'huile essentielle contenue dans la plantes. Ces huiles ont un spectre d'action très large puisqu'ils inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et levures. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier la nature de leurs composés volatils majeurs. Produits naturels sains, servant d'arômes alimentaires, les huiles essentielles sont actuellement étudiées pour mieux cerner leur efficacité comme conservateur naturel. Les huiles essentielles et leurs composés constitutifs empêchent la production, sporulation et la synthèse des toxines et des bactéries. Sur les levures, ils agissent sur la biomasse et la production de pseudomycélium. Sur les moisissures, ils inhibent la germination des spores, l'elongation du mycélium, la sporulation et la toxinogénèse. [7].

### 1.7.1. Les huiles essentielles.

#### 1.7.1.1. Généralités sur les huiles essentielles

Une huile essentielle est définie par la norme AFNOR NF. T. 75 – 006 ; comme étant un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, que ce soit par entraînement à la

vapeur, moyennant des procédés mécaniques, ou par distillation sèche. L'huile ainsi extraite est séparée de la phase aqueuse via des procédés physiques, à l'issue desquels elle pourrait subir des traitements physiques qui ne modifieront pas de manière significative sa composition. [10]

D'après RAMANOELINA (1997); les huiles essentielles sont les produits obtenus sous forme liquide par distillation à la vapeur des matières premières végétales et plus rarement animales. On distingue les huiles essentielles des huiles fixées par leur caractère volatil et odorant. [42]

De nature complexe, les huiles essentielles affinent et enrobent les sensations olfactives et gustatives données par les composés odorants synthétiques.

Les huiles essentielles sont largement utilisées en parfumerie, cosmétique, dans la pharmacie, elles sont également employées en tant qu'arômes alimentaires et insecticides.

#### **1.7.1.2. Procédé d'obtention**

Selon l'objectif visé et les types de matières premières à traiter, le choix du procédé est large, mais les plus couramment utilisés à l'heure actuelle sont l'entrainement à la vapeur et l'extraction par solvant. [42]

##### **a. L'enfleurage**

L'enfleurage présente deux méthodes qui nécessitent beaucoup de temps. La première consiste à déposer le solvant et les matières premières végétales sur des châssis vitrés pour avoir une pommade de haute qualité, tandis que la deuxième est une pulvérisation d'un beurre solide qui peut fondre sur les matières végétales, pour une récupération d'un produit actif très aromatique. [42]

##### **b. L'expression**

C'est une technique utilisée principalement pour les agrumes, elle est aussi réservée pour quelques plantes spécifiques et elle est pratiquée avec des pressoirs. [42]

##### **c. L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation consiste à laisser tremper et parfois macérer de la matière première végétale dans une cuve remplie d'eau. L'eau « dissout » alors en quelque sorte les substances aromatiques contenues dans les cellules végétales qui éclatent par turgescence. L'ensemble du mélange est ensuite chauffé et les substances aromatiques volatiles sont entraînées avec la vapeur d'eau. [42]

L'hydrodistillation est le procédé le plus rudimentaire et nécessite un très grand savoir faire dans la mise en œuvre. En effet, une montée en température trop rapide du milieu provoque un « coup de feu » ou caramélation de l'essence qui subit des réactions dites de Maillard (brunissement non enzymatique) [42]

### 1.7.1.3. Propriétés

L'utilisation des vertus antimicrobiennes des huiles essentielles ne date pas d'aujourd'hui. Plusieurs manuscrits très anciens décrivaient déjà de nombreuses recettes à base de plantes et d'huiles aromatiques que les prêtres et les médecins employaient. Actuellement, l'utilisation des huiles essentielles s'effectue sur des bases scientifiques et rationnelles dans le but de mettre au point de nouveaux produits à divers usages médical, vétérinaire et cosmétique. En effet, dans la littérature, plusieurs travaux de recherche ont prouvé les propriétés antimicrobienne, antivirale et insecticide des composés terpénoïdes. [30].

#### a. Propriétés antimicrobiennes

Du fait de la variabilité de quantité et de profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie de sa rupture entraînant la fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure. En effet, GLOGANI et KALOASTIAN (2006) ont noté que les composés terpénoïdes des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures. De même GIDEON *et al.* (2007) ont rapporté que les phénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane et des parois cellulaires des bactéries. [37]

##### ❖ Propriétés antibactériennes

La capacité des huiles essentielles à neutraliser les germes est aujourd'hui indiscutable. Grace à la pratique des aromatogrammes, les propriétés anti-infectieuses des huiles essentielles ont pu être exploitées selon des critères rigoureux. La connaissance des molécules porteuses de l'activité antibactérienne est de première importance.

Les molécules possédant le coefficient antibactérien les plus élevés sont : le carvacrol, le thymol et l'eugénol (composants majoritaires des huiles essentielles de thym et de clou de girofle); elles appartiennent toutes trois au groupe des phénols ; l'australol et le gaïacol font partie de ce groupe mais les huiles essentielles les recelant sont moins actives.

Les phénols sont les molécules les plus antiseptiques que l'on puisse rencontrer dans une plante. Ils tuent directement les germes par destruction de leur membrane cellulaire. Les phénols aromatiques sont de puissants énergisants et bactéricides. [18].

L'aldéhyde cinnamique possède également une activité anti-infectieuse comparable à celle des phénols.

Les alcools à 10 atomes de carbone (ou monoterpénoïdes) se situent immédiatement après ; leur liste est plus étendue : géraniol, linalol, thujanol, et myrcénol, terpinoléol, menthol et pipéritol

sont les plus connus. Présentant une fiabilité certaine et un assez large spectre, ces molécules seront utiles dans de nombreux cas d'infection bactérienne.

Le groupe des aldéhydes manifeste également une certaine puissance antibactérienne : néral et géranial (qui forment les citrals), citronnellal et cuminal sont les plus souvent employés.

Le groupe de cétones présente un intérêt dans le traitement des états infectieux mucopurulents (action le plus souvent uniquement indirecte) : verbénone, thujone, bornéone (camphre), carvone,...

En ce qui concerne les éthers, leur action antibactérienne est certaine mais irrégulière ; seul l'aromatogramme permet de prévoir avec certitude leur utilité : estragole et anéthole sont les molécules les plus représentatives de ce groupe.

Les oxydes présentent en général des propriétés légèrement anti-infectieuses.

Enfin, les terpènes peuvent être intéressants, mais leur utilité en ce domaine se révélera plutôt sous forme aérodiffusée.

Par ailleurs, selon les travaux de DEANS *et al* (1987), l'étude de l'effet de 50 huiles essentielles de plantes sur 25 genres de bactéries à 4 concentrations différentes a montré que 9 huiles essentielles ont manifesté des propriétés inhibitrices les plus importantes dont : les huiles essentielles de l'angélique, du laurier, de la cannelle, du clou de girofle, du thym, de l'amande amère, de la marjolaine, du piment et du géranium. [7]

Les constituants volatils majeurs qui ont les propriétés antimicrobiennes les plus importantes sont : le carvacrol (composé volatil majeur de l'huile essentielle d'origan), l'eugénol (huiles essentielles de poivre, clou de girofle), linalol (huiles essentielles de coriandre), l'aldéhyde cinnamique (huile essentielle de cannelle), le thymol (huiles essentielles de thym). [7]

#### ❖ Propriétés antifongiques

Ici, les groupes moléculaires cités en priorité par leur action antibactérienne, se révèlent également actifs sur les fungis, néanmoins avec un traitement de plus longue durée en aromathérapie. Doivent être cités également les alcools et les lactones pour leur activité antifongiques.

Selon PAULI et KNOBLOCH (1987), les composés dont les activités antifongiques sont les plus élevées sont l'iso-eugénol, le cinnaldéhyde, le carvacrol, l'eugénol et le thymol [7].

#### ❖ Propriétés antivirales

Des molécules appartenant à de nombreuses familles chimiques ont révélé *in vitro* leur activité antivirale : monoterpénols, monoterpénals, etc.

Le couple synergique, cinéole-monoterpénol sera utile pour traiter les pathologies virales concernant la sphère respiratoire. Il est présent dans de nombreuses huiles essentielles issues d'arbres de la famille des myrtacées.

Le groupe des cétones, notamment la rare cryptone, a révélé une intéressante capacité à combattre spécifiquement les virus nus. Les aldéhydes, en usage interne et en diffusion atmosphérique constitueront de bons compléments dans le traitement des malades atteints d'infectons virales.

Les virus sont en général, très sensibles aux molécules aromatiques et certaines pathologies virales graves sont susceptibles d'être très nettement améliorées grâce à elles.

### **b. Autres fonctions**

Les huiles essentielles peuvent également assurer de nombreuses fonctions dont une action antiseptique, désodorisante, antiparasitaire, insectifuge et insecticide, anti-inflammatoire, etc.

Dans le cadre de notre étude nous sélectionnerons les huiles essentielles qui auront comme composantes majeures les molécules actives ayant des propriétés anti-infectieuses.

#### **1.7.2. Huiles essentielles utilisées**

Plusieurs composés sont souvent cités comme responsable des propriétés antiseptiques des huiles essentielles, tels que le thymol, le carvacrol, l'eugénol et le 1,8-cinéol. [15]

Les huiles essentielles contenant en majorité ces composés sont citées dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII: Quelques composés antiseptiques dans les huiles essentielles [13]

Composés	Huiles essentielles
Carvacrol, Thymol	Thym, Origan, Sarriette
Eugénol	Clou de girofle, Cannelle
1,8-cinéol	<i>Mandravasarotra</i> , Romarin

Selon les extractions effectuées par la société HOMEOPHARMA les huiles essentielles suivantes ont été sélectionnées : les huiles essentielles de thym, de clou de girofle et de *mandravasarotra*.

##### **1.7.2.1. L'huile essentielle du *Thymus vulgaris***

###### **a) Description botanique du *Thymus vulgaris***

*Thymus* est un genre de plantes de la famille des Lamiacées. Ce genre comporte plus de 300 espèces. Ce sont des plantes rampantes ou en coussinet portant de petites fleurs rose pâle ou blanches. Ces plantes sont riches en huiles essentielles et à ce titre font partie des plantes

aromatiques. La principale huile essentielle de *Thymus vulgaris* est un terpénoïde qui lui doit son nom, le thymol, une substance bactéricide.

### b) L'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* possède différents chimiotypes : à thymol, à carvacrol, à linalol, à géraniol, à thujuanol-4, à  $\alpha$ -terpinéol, etc. seule l'analyse chromatographique en phase gazeuse donne des chromatogrammes qui permettent de différencier les différents types chimiques. [39]

D'après ROULIER G. (1990); l'huile essentielle de thym aurait à la fois des propriétés antibactériennes majeures, des propriétés antimycosiques et antivirales. [18]

D'après les travaux de RANDRIANASOLO (1996), les analyses effectuées sur les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* montrent qu'elle renferme ces corps responsables d'une activité antimicrobienne à savoir des phénols : le thymol (54,14% dans la tige feuillée et 59,57% dans la tige fleurie) le carvacrol ; des alcools (linalol,  $\alpha$ -terpinéol) ; des hydrocarbures aromatiques (p-cymène). [13]

Les germes bactériens sur lesquels a été effectué le test antimicrobien de l'huile essentielle de thym sont des coccies Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus faecalis*), des bacilles Gram positif (*Bacillus subtilis*) et des bacilles Gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Les concentrations minimales inhibitrices ou CMI testées sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* sont respectivement de :

- 14 437,5  $\mu$ g/ml
- 7218,75  $\mu$ g/ml
- 115 000  $\mu$ g/ml

D'après les études de BENJILALI *et al.* (1986); l'étude du pouvoir antiseptique des huiles essentielles appliquée aux essences du thym (*Thymus capitatus*), du romarin (*Rosmarinus officinalis*), de l'Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) et de l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*) a montré que l'huile essentielle de thym s'est révélée la plus active sur les 37 souches de moisissures étudiées. [29]

Par ailleurs, la sensibilité de *Candida albicans* aux huiles essentielles a été étudiée par POZZATI P. *et al.* (2010). La concentration minimale d'huile essentielle capable d'inhiber la formation du tube germinatif variait de 66,07  $\mu$ g/ml à plus de 3200  $\mu$ g/ml. Le profil d'activité étant le suivant : huile essentielle d'origan > **thym** > cannelle > gingembre > basilic > sauge > romarin [29].

#### 1.7.2.2. L'huile essentielle de *Cinnamosma fragrans*

##### a) Description botanique de *Cinnamosma fragrans*

Suivant les localités où elle pousse, *Cinnamosma fragrans* Baillon répond à plusieurs noms vernaculaires malgaches tels que *fanalamangidy*, *mangidimanitra*, *motrobetiniaina*, *sakaiala*,

*sakaiazo*, *sakarivohazo* et *mandravasarotra* évoquant ainsi des caractéristiques aromatiques mêlées à des propriétés exceptionnelles qui attirent la curiosité. Plus récemment, le nom français « Saro » a été attribué à l'espèce sans doute pour des raisons de commodité au niveau de la prononciation.

Bien que très connue sous le nom « *Mandravasarotra* », l'espèce *Cinnamosma fragrans* B. risquerait d'être confondue avec une autre appartenant au même genre, en l'occurrence *Cinnamosma madagascariensis* qui en plus de porter le même nom que la première, s'agirait du véritable « *mandravasarotra* ».

De taille assez modeste, *Cinnamosma fragrans* B. se représentent généralement sous le port arbustif de 4 à 7m de hauteur ou petit arbre inférieur à 4m de hauteur, très aromatique à écorces, feuilles et fruits dotés d'une saveur pimentée brûlante. [12]

#### **b) Formes d'utilisation et indications thérapeutiques de la plante**

Les différentes parties de la plante étaient utilisées fraîches ou plus ou moins séchées. Elles sont employées soit généralement en infusion pendant dix minutes, soit en décoction de cinq à dix minutes, ou bien directement mâchées comme pour les écorces.

Les feuilles et les tiges sont utilisées contre le rhume et le maux de tête, avec les écorces les feuilles sont employées comme stimulant, tonique et contre la colique. Enfin les écorces traitent les maux de dents et sont actives contre le tænia.

#### **c) Composition chimique de l'huile essentielle de *Cinnamosma fragrans***

La composition chimique des échantillons analysés par RANDRIAMAHAZO (2009) montre que le constituant le plus abondant est représenté par le 1,8-cinéole (31,55 à 53,28%) qui appartient au groupe des oxydes, lequel est accompagné de quelques molécules de proportion relativement importante tels que  $\alpha$ -pinène (2,27 à 5,04%),  $\beta$ -pinène (4,18 à 6,56%), limonène (1,29 à 10,40%), terpinène-4-ol (2,33 à 8,79%),  $\alpha$ -terpinéol (4,04 à 8,57%). La proportion de 1,8-cinéole est la plus élevée dans les feuilles sèches (53,28%) et s'avère être la plus basse dans les écorces sèches (31,55%). [12]

#### **d) Propriétés microbiologiques de l'huile essentielle de *Cinnamosma fragrans* [17]**

Les travaux effectués par RANDRIANARIVELO *et al.* (2009) ont permis d'apprécier les activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *C. fragrans*. En effet, RANDRIANARIVELO *et al.* (2009) ont montré que les huiles essentielles de *C. fragrans* possèdent un large spectre d'activités antimicrobiennes vis-à-vis des différentes souches. Les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides ont été évaluées entre 0,18 et 5,88 mg/ml pour le type chimique à linalol (95,8%) et entre 0,37 et 1,18 mg/ml pour le type chimique à 1,8 cinéol. [17]

### 1.7.2.3. L'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata*

#### a) Description botanique du giroflier

C'est un arbre à feuillage persistant pouvant atteindre 12 à 15 cm et originaire d'Indonésie. Le clou de giroflier s'obtient en récoltant les boutons floraux avant leur épanouissement. La corolle, dont les pétales sont repliés au sommet du clou de girofle, s'appelle « tête de clou ». A Madagascar, il n'existe qu'une seule forme de giroflier et est rencontrée sur la Côte-Est [27].

#### b) L'huile essentielle de clous de girofle [26].

L'huile essentielle de clous de girofle est obtenue par distillation à la vapeur des clous. C'est un liquide mobile d'aspect jaune à jaune pâle. Cette huile essentielle possède de nombreuses propriétés : antibactérienne puissante à large spectre, antivirale puissante, fongicide remarquable, antalgique et antinévralgique puissante, régulatrice du système nerveux, mucolytique et expectorante puissante ; anticoagulante, antispasmodique, coronarodilatatrice.

Une étude menée par FU *et al.* (2007) sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de clou de girofle (*Syzygium aromaticum* (L.)) et le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) montre que Les CMI de l'huile de girofle variait de 0,062% à 0,500% (v / v). [6]

## CONCLUSION PARTIELLE I

Les cosmétiques sont des produits destinés à mettre en contact avec la peau afin d'en modifier l'aspect ou de corriger l'odeur. Tout comme les produits alimentaires, ce sont des produits facilement périssables et nécessitent l'incorporation de conservateurs afin d'élargir leur durée de conservation.

Parmi les conservateurs de synthèse actuellement utilisés dans les cosmétiques, nombreux sont examinés à la loupe et en particulier le parabène malgré ses propriétés antimicrobiennes. Parmi les huiles essentielles ayant des propriétés antimicrobiennes, les huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*), de clous de girofle (*Eugenia caryophyllata*) et de *mandravasarotra* (*Cinnamosma fragrans*) ont été sélectionnées pour être testées dans les produits cosmétiques.

# *Matériels et Méthodes*

## II. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. Produits testés

#### 2.1.1. Présentation des produits cosmétiques

Une des principales sources d'altération des produits cosmétiques est d'origine microbiologique (les sources de contamination sont essentiellement les ingrédients, surtout à l'eau). Ainsi, les essais ont été effectués sur des produits cosmétiques qui contiennent une proportion élevée en phase aqueuse dont un lait démaquillant et une lotion. De par leur teneur en eau élevée, ces produits sont rapidement sujets à des altérations. D'où l'intérêt de l'étude des conservateurs à appliquer dans leurs formulations.

##### a) Le lait démaquillant orchidée

De texture visqueuse, le lait démaquillant orchidée est un des produits de la gamme de soins professionnels d'HOMEOPHARMA. Produit de soin purifiant, ce lait destiné à des peaux à tendance grasse ou acnéique a été conçu pour éliminer toutes traces de maquillage et toutes autres impuretés de la peau.

##### b) La lotion Baobab

C'est une lotion de soin destinée aux peaux sèches qui complète le nettoyage de la peau en éliminant les dernières traces de lait démaquillant. Elle prolonge les bienfaits du démaquillage

#### 2.1.2. Les huiles essentielles

Il s'agit d'huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, de *Cinnamosma fragrans* et d'*Eugenia caryophyllata*.

Les caractéristiques de ces huiles essentielles sont détaillées dans les tableaux suivants :

Tableau VIII: Caractéristiques de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Nom botanique	<i>Thymus vulgaris</i>
Procédé d'obtention	Hydrodistillation
Organe distillé	Feuilles
Densité	0,907 – 0,935 [26].
Principaux constituants biochimiques	Thymol, $\alpha$ -terpinène
Propriétés	Antiseptique général puissant, anti-infectieux à large spectre d'action, antiviral et stimulant

	immunitaire, antibactérien, antiparasitaire, fongicide, digestive, carminative, apéritive, cholagogue [26].
--	---

Tableau IX: Caractéristiques de l'huile essentielle de *Cinnamosma fragrans*

Nom botanique	<i>Cinnamosma fragrans</i>
Procédé d'obtention	Hydrodistillation
Organe distillé	Feuilles
Densité	0,896 [26].
Principaux constituants biochimiques	1,8-cinéole, sabinène, $\beta$ -pinène, $\alpha$ -pinène
Propriétés	Antivirale, anticatarrhale, expectorante, antibactérienne, immunomodulante, antifongique, antispasmodique, calmante [26].

Tableau X: Caractéristiques de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata*

Nom botanique	<i>Eugenia caryophyllata</i>
Procédé d'obtention	Hydrodistillation
Organe distillé	Feuilles
Densité	1,04 - 1,06 [26].
Principaux constituants biochimiques	Eugénol
Propriétés	Anti-infectieuse, antibactérienne puissante à large spectre, antivirale, antifongique, antiparasitaire, antiseptique, stimulante générale ; neurotonique, hypertensive, aphrodisiaque légère [26].

## 2.2. Méthodologie de travail

Le travail s'effectuera en trois étapes constituées des analyses sensorielles, des tests d'efficacité des conservateurs ou « challenge test » et des tests de stabilité des produits à l'étuve à 45°C et à température ambiante.

Ces étapes sont indépendantes les unes des autres et leurs résultats combinés permettront d'effectuer un choix sur le conservateur le plus pertinent.

Une enquête socio-économique a été préalablement menée pour connaître l'avis des consommateurs sur les conservateurs utilisés dans les produits cosmétiques.

### 2.2.1. Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles nécessite l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse ou CPG (cf. annexe IV) qui permettra d'identifier les constituants ainsi que leur pourcentage relatif. Les analyses CPG ont été effectuées au laboratoire des IAA à l'ESSA.

### 2.2.2. Détermination du seuil de détection des huiles essentielles dans les produits cosmétiques et analyses hédoniques.

Les essais ont été effectués sur les produits cosmétiques précités vu leur teneur en eau assez élevée: un lait démaquillant et une lotion. De par le rendement très faible de l'huile essentielle de thym après une hydrodistillation au laboratoire (cf Partie expérimentale I), l'utilisation de cette HE n'aurait pas été rentable. Deux huiles essentielles ont été finalement retenues pour évaluer leurs propriétés conservatrices dans ces produits dont l'huile essentielle de clou de girofle (*Eugenia caryophyllata*) et l'huile essentielle de *Mandravasarotra* (*Cinnamosma fragrans*).

Ces huiles essentielles ont été incorporées séparément puis en même temps dans les produits, à différentes concentrations selon leurs CMI ou leur CMB. Les concentrations de ces huiles essentielles dans les produits cosmétiques testés sont présentées dans le tableau suivant.

**Tableau XI: Concentration des conservateurs incorporés dans les produits cosmétiques**

Huile Essentielle	Concentration 1	Concentration 2	Concentration 3	Concentration 4	Concentration 5
Girofle	0,06%	0,12%	0,24%	0,48%	
<i>Mandravasarotra</i>	0,18%	0,24%	0,32%	0,48%	
Girofle + <i>Mandravasarotra</i>	0,06% + 0,06%	0,06% + 0,12%	0,12% + 0,06%	0,12% + 0,12%	0,18% + 0,18%

Les conservateurs ont été incorporés à quatre (4) concentrations différentes pour les deux types de produits. La détection du seuil de tolérance sensoriel de ces huiles essentielles a été déterminée par des analyses sensorielles sur des jurys entraînés. Le résultat de cette épreuve indiquera la concentration à partir de laquelle l'huile essentielle sera perçue par le sujet lorsqu'elle est incorporée dans les produits. Par ailleurs, des analyses hédoniques sur des sujets naïfs permettront de sélectionner parmi les produits élaborés ceux qui seront finalement retenus.

### 2.2.3. Test de stabilité

Le test de stabilité visera surtout à suivre l'évolution des caractéristiques organoleptiques des produits et peut être effectué directement après formulation du produit. Par ailleurs, il permettra d'apprécier les propriétés antioxydantes de ces huiles essentielles. En effet, Les conséquences de l'oxydation d'un corps gras dans une formule cosmétique sont essentiellement d'ordre fonctionnel (aspect, texture), nutritionnel (acides gras polyinsaturés, vitamines) et sensoriel (odeur, couleur, dans certains cas le goût) : elles affectent directement la qualité marchande du produit. [9].

### 2.2.4. Test d'efficacité microbienne ou «CHALLENGE TEST»

Toutes les concentrations d'huiles essentielles dans les produits n'ont pas pu être soumises aux tests d'efficacité microbiologiques. Les huiles essentielles retenues pour le «challenge test» sont celles qui ont été les plus stables durant le test de vieillissement et qui ont été les plus appréciées durant les analyses sensorielles.

## 2.3. Analyses sensorielles

L'analyse sensorielle consiste à analyser les propriétés organoleptiques des produits par les organes des sens, à savoir la vue, l'ouïe, le goût, l'odorat et le toucher. D'après STONE et SIDEL (1995): « L'analyse sensorielle est une méthode scientifique pour évoquer, mesurer, analyser et interpréter les réponses obtenues à partir de produits ayant été évalués par les organes des sens ». [41].

Les épreuves sensorielles se révèlent être un outil efficace par rapport aux éventuelles réactions des consommateurs vis-à-vis des produits.

Une analyse du seuil de détection des huiles essentielles ajoutées dans les produits est d'abord effectuée au préalable, ensuite des tests hédoniques de classement et d'acceptabilité à l'issue de laquelle la concentration la plus appréciée dans les produits sera retenue.

### 2.3.1. Épreuves sensorielles :

#### a. Analyse du seuil de détection des huiles essentielles dans les produits

##### • Principe

Ces épreuves ont été réalisées dans le but de d'évaluer à partir de quelle concentration l'huile essentielle commençait à être ressentie par les sujets. Cette épreuve comporte deux types de tests

- Analyse du seuil de détection de l'huile essentielle (*mandravasarotra* ou girofle) sur des échantillons contenant des huiles essentielles à concentration croissante sans base parfumante
- Analyse du seuil de détection de l'huile essentielle considérée comme conservateur sur des échantillons dont la formulation contient une base parfumante

Et chaque test se fera en deux étapes c'est-à-dire d'abord sur les laits démaquillants ensuite les lotions et seront espacées par des pauses pour éviter la fatigue sensorielle des sujets.

Le but de ces deux types d'analyses étant de déterminer si l'huile essentielle en question est plus ressentie et plus appréciée mélangée avec des bases parfumantes ou lorsqu'elle constitue la seule base parfumante de la formulation.

Rappelons qu'une base parfumante constitue l'odeur dans un produit cosmétique. Les bases parfumantes sont des compositions de deux ou plusieurs principes aromatiques. Une base parfumante se compose comme un parfum c'est-à-dire un mélange de deux ou plusieurs principes aromatiques. [14]

Pour ce faire, un flacon contenant un coton imbibé de l'huile essentielle à tester est placé devant chaque sujet. Après avoir senti préalablement l'odeur de l'essentielle, ce dernier sentira un à un les 5 échantillons à différentes concentrations du moins concentré vers le plus concentré et notera dans le formulaire l'échantillon à partir duquel il aura retrouvé l'odeur de l'huile essentielle préalablement sentie.

Remarques :

- Seuls les échantillons contenant uniquement de l'huile essentielle de girofle ou de *mandravasarotra* ont été soumis à l'analyse du seuil de détection pour déterminer si l'odeur de l'huile essentielle est plus accentuée avec des bases parfumantes
- Le premier des cinq échantillons senti par le sujet ne contient pas du tout l'huile essentielle et sert donc de témoin, les quatre concentrations sont présentées dans le paragraphe précédent (tableau XI)
  - Traitement des résultats

Les résultats obtenus ont été traités sur le Logiciel *EXCEL sur Microsoft Office 2007*: ce logiciel a permis de regrouper et de classer les informations.

**b. Les épreuves hédoniques**

Il s'agit ici de demander aux sujets de classer des produits en fonction de leur préférence.

• **Épreuve de classement**

➤ **Principe**

Lorsque l'épreuve de classement est utilisée comme épreuve hédonique, la tâche des sujets est de classer des échantillons présentés simultanément sur la base de leur caractère agréable de « plus agréable » à « moins agréable ».

Ce type de test ne renseigne pas sur le niveau de satisfaction propre aux différents lots testés : il permet uniquement de classer les lots les uns par rapport aux autres. [44].

Les sujets attribueront donc un rang (de 1 à 4) aux quatre échantillons selon leur préférence. Sera donc classé en numéro 1, l'échantillon le plus préféré et en numéro 4, l'échantillon le moins préféré.

Après avoir attribué un rang aux trois échantillons, les sujets auront pour tâche de donner la raison de l'attribution de ces rangs pour chaque échantillon.

#### ➤ Traitement des résultats

L'ANOVA a été utilisée pour pouvoir dépouiller les résultats. Ces derniers ont pu être interprétés à l'aide de la loi de Page ainsi que la loi de FRIEDMAN à partir de la somme des rangs obtenus par les produits pour déceler la différence perçue par les sujets.

Selon le nombre de variables ou caractéristiques observées simultanément, les outils statistiques disponibles se classent en méthodes à une dimension ou à plusieurs dimensions. De plus, selon que les méthodes sont contraignantes ou peu contraignantes, principalement quant à la condition d'application relative aux distributions des populations-parents, elles sont qualifiées de paramétriques ou non paramétriques (*distribution-free methods*).

Souvent, dans le cas de classements hédoniques, ce sont ces méthodes qui sont employées puisque les données correspondent à des rangs. [31].

#### • Test d'acceptabilité

##### ➤ Principe

Il s'agit d'évaluer séparément les produits à différentes concentrations d'huile essentielles afin d'obtenir des appréciations individuelles des produits. Pour ce type de test les échantillons sont présentés un à un. Le sujet aura donc à évaluer individuellement les échantillons de lait ou lotion à une concentration donnée. Le test d'acceptabilité permet également de voir la fidélité des juges pendant les analyses par rapport aux tests de classement.

La notation se fait sur une échelle structurée numérique en 5 points (note de 1 à 5), une échelle sémantique ou sur une échelle visuelle représentée par une ligne avec à l'extrême gauche « Je déteste » et à droite « J'adore » et sur laquelle le consommateur doit positionner une marque (un trait ou une croix) marquant son appréciation. [14].

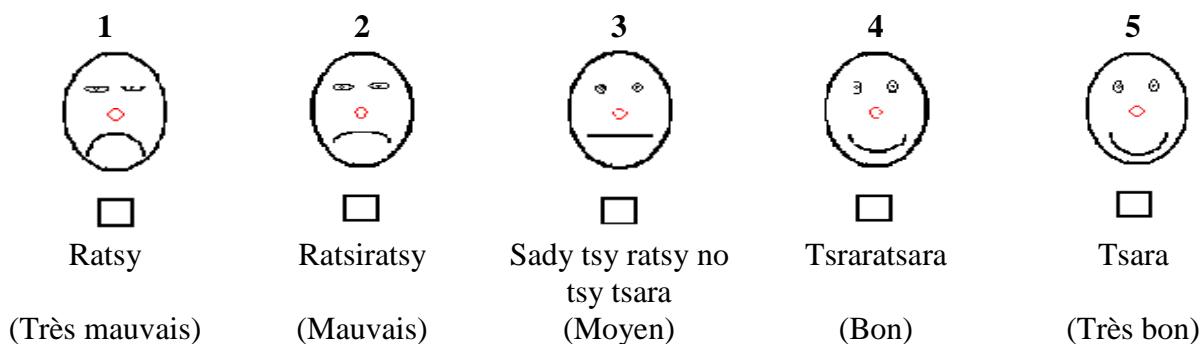


Figure 6: Échelle picturale relatant l'appréciation des échantillons [14]

### ➤ Traitement des résultats

Puisque le nombre de produits à étudier est supérieur ou égal à 3, on ne peut se contenter de faire des comparaisons 2 à 2. Les résultats sont interprétés par ANOVA ou analyse de la variance qui est un test d'hypothèse consistant en la comparaison des moyennes de plusieurs populations [41].

#### 2.3.2. Outils de travail

##### a. Les juges

Dans la réalisation des évaluations sensorielles, on distingue deux types de jurys :

- les jurys entraînés constitués de 15 à 20 sujets composés des membres du comité scientifique de l'HOMEOPHARMA qui réaliseront l'analyse du seuil de détection.
- Les jurys naïfs constitués d'une soixantaine de sujets au minimum issus de l'HOMEOPHARMA et de l'ESSA qui effectueront les tests hédoniques.

Ces sujets naïfs sont composés de catégories de personnes venant de milieux différents et d'âges variés qui n'ont pas reçus de formation préalable sur les analyses sensorielles. Cependant, ces individus ont reçus des directives précises par rapport au déroulement des analyses ainsi que le mode de remplissage des formulaires.

##### b. Le local

Les évaluations sensorielles se sont déroulées dans la salle de réunion de l'HOMEOPHARMA à Antsakaviro pour les tests du seuil de détection. Pour les épreuves hédoniques, les épreuves se sont déroulées à l'HOMEOPHARMA Manakambahiny et à l'ESSA.

##### c. Présentation des échantillons

Chaque échantillon a un code distinct (un code à trois chiffres). Tous les échantillons sont présentés simultanément à chaque sujet dans un ordre prévu à l'avance et il a le droit de sentir plusieurs fois les échantillons tout en respectant l'ordre de gauche à droite. [14].

Comme les huiles essentielles ont été incorporées séparément puis en même temps dans les produits, 3 types d'analyses hédoniques (test de classement et d'acceptabilité) ont eu lieu :

- Pour les produits (lait et lotion) dont le conservateur utilisé est l'huile essentielle de girofle
- Pour les produits dont le conservateur utilisé est l'huile essentielle de *mandravasarotra*
- Pour les produits qui contiennent simultanément les deux huiles essentielles précitées comme conservateur

#### 2.3.3. Déroulement des analyses

Avant l'épreuve proprement dite, des explications et des consignes seront fournies aux sujets sur le déroulement des tests et le remplissage des questionnaires. Ces derniers seront ensuite amenés à sentir chacun les échantillons mis à leur disposition. En aval de ces épreuves, se feront les dépouillages et le traitement des résultats.

#### ♣ Préparation des échantillons

Les échantillons ont été élaborés au sein du laboratoire de Recherche et Développement de l'HOMEOPHARMA. Les lotions sont disposées dans des flacons de 10ml les laits dans des pots de 30g sur lesquels seront disposées les étiquettes portant le code à 3 chiffres de chaque échantillon.

#### 2.3.4. Traitement statistique des résultats

Les résultats sont analysés statistiquement afin de permettre à l'expérimentateur de tirer des conclusions sur la population de personnes ou de produits proposés.

Les résultats des tests statistiques sont exprimés en donnant la probabilité que le résultat soit vrai du fait d'un événement fortuit plutôt que d'une différence réelle. Si on obtient un résultat 5 fois sur 100, du fait du hasard, on dit alors que la probabilité est de 0,05. On estime habituellement qu'un résultat statistique est significatif si sa probabilité est égale ou inférieure à 0,05. À ce niveau de probabilité, l'hypothèse nulle serait rejetée 5 fois sur 100 alors qu'en vérité, elle devrait être acceptée [14].

Les tests statistiques servent à analyser les données provenant des études sensorielles.

Ces analyses statistiques visent les objectifs suivants

- Vérifier les hypothèses posées préalablement;
- Voir s'il y a des différences importantes entre les échantillons, les traitements ou les populations et si ces différences sont fonction d'autres variables ou paramètres;
- Contrôler l'uniformité des réponses fournies par les sujets. Pour cela, ont été utilisées les méthodes statistiques suivantes [41].

- ***Moyenne et écart type***

La moyenne arithmétique est la somme de la valeur d'une variable divisée par le nombre d'individus. L'écart type est la racine carrée de la variance.

- ***Analyse de la variance ou ANOVA***

L'Analyse de la variance couvre un ensemble de techniques de tests et d'estimation destinés à quantifier l'effet de variables qualitatives sur une variable numérique. Dans le cas le plus simple, cela consiste à comparer plusieurs moyennes d'échantillons.

Cette méthode permet d'analyser des données qui dépendent de plusieurs types d'effets opérant simultanément, afin de quantifier ces effets et d'en évaluer l'importance. L'ANOVA détermine aussi l'impact d'un ou de deux facteurs sur une réponse (respectivement l'ANOVA à un facteur et l'ANOVA à deux facteurs).

L'ANOVA peut aussi être utilisée en association avec les tests de comparaison multiple.

- ***Test de Khiz***

Ce test permet de mettre en évidence s'il y a une différence ou non entre les différentes catégories pour chaque classe (test par ligne) et s'il y a une différence entre les classes pour chaque catégorie (test par colonne).

- **Test de FRIEDMAN**

Le test de FRIEDMAN permet d'effectuer la comparaison de plus de deux échantillons appariés, de faibles effectifs, ne vérifiant pas la condition de "normalité". Les sommes des rangs octroyés à chaque échantillon seront donc comparées entre elles. L'échantillon le plus apprécié par les sujets sera donc celui avec la plus petite valeur de la somme des rangs.

## 2.4. Test de vieillissement accéléré à l'étuve

Le vieillissement accéléré consiste à placer un produit dans des conditions telles que son vieillissement est accéléré par rapport à un vieillissement en conditions ambiantes. L'intérêt principal est d'observer l'évolution au cours du temps pour estimer une date limite d'utilisation optimale sans attendre la durée réelle proposée. Par exemple : Mimer un an de vieillissement en quatre mois. [32].

Le vieillissement accéléré par augmentation de température est basé sur le principe d'Arrhénius selon :

$$\text{Vitesse d'oxydation} = A \exp(-E_a / RT)$$

Ea : énergie d'activation de la vitesse d'oxydation apparente

R la constante des gaz parfaits

T la température

Ainsi toute réaction chimique est accélérée par la température. Le vieillissement des produits étant basé dans le cas étudié sur des réactions chimiques d'oxydation, ces réactions vont aussi être accélérées. Connaissant l'énergie d'activation, il est possible de simuler un phénomène se déroulant à température ambiante à partir d'un test à température plus élevée, sur un temps plus court.

Tous les échantillons ont été conditionnés dans des flacons transparents afin de mieux observer les modifications survenant au cours de la période de test et placés dans une étuve à 45°C.

## 2.5. Évaluation de l'efficacité d'un conservateur ou «challenge test»

### 2.5.1. Généralités

Afin de maîtriser la contamination secondaire des produits cosmétiques, l'industrie cosmétique a recours au test de contamination artificielle ou « Challenge-test ».

Un «challenge test» est une technique permettant de démontrer l'efficacité antimicrobienne (bactériostatique ou bactéricide) d'une substance donnée (produits pharmaceutiques, cosmétiques ou agroalimentaires par exemple). [24].

Le principe du « Challenge-test » consiste en l'inoculation de l'échantillon à tester par une sélection de microorganismes : bactéries, levures et moisissures, pathogènes ou susceptibles de dégrader le produit. La viabilité de ces microorganismes dans le produit est ensuite évaluée sur une période aussi longue que jugée nécessaire. [4].

Les microorganismes à utiliser dans le « Challenge-test » sont :

- D'après le Comité scientifique des produits cosmétiques et non alimentaire destinés aux consommateurs (SCCNFP ; 2003), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* ;
- Selon la Pharmacopée européenne, les mêmes souches bactériennes que ci-dessus ainsi que la moisissure *Aspergillus niger* ;
- Selon la Pharmacopée américaine, les mêmes souches bactériennes que ci-dessus, ainsi que *Escherichia coli*.

### 2.5.2. Méthode de la Pharmacopée Européenne

La pharmacopée européenne décrit une méthode de contrôle de l'efficacité de la conservation antimicrobienne des préparations pharmaceutiques et fixe des critères d'efficacité minimale en fonction de la voie d'administration du médicament. Ainsi, des critères sont fixés pour les spécialités pour application locale que l'on peut considérer comme proches des produits cosmétiques dans leur conception. Telle que décrite, cette méthode, qui est très proche de l'essai décrit à la Pharmacopée américaine, n'est applicable qu'aux produits possédant une phase aqueuse. [16]

#### 2.5.2.1. Micro-organismes d'essai

Pour les préparations pour application locale, quatre micro-organismes d'essai sont préconisés : *Pseudomonas aeruginosa* CIP 82.118 (ATTC 9027), *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 (ATTC 6538), *Candida albicans* IP 48.72 (ATTC 102333 1) et *Aspergillus niger* IP 1431.83 (ATTC 16404)

Selon les souches disponibles au sein du laboratoire de microbiologie de la société HOMEOPHARMA, les essais porteront sur *Staphylococcus aureus*, et *Candida albicans*.

#### 2.5.2.2. Inoculum

##### ❖ Préparation et ajustement de l'inoculum

L'inoculum est constitué d'une suspension

- Des cellules bactériennes issues d'une culture de 18-24h à 30-35°C sur gélose trypticase soja pour *S. aureus*
- Des levures issues d'une culture de 48h à 20-25°C sur gélose Sabouraud pour *C. albicans*

Pour préparer ces suspensions, le diluant utilisé est une solution de peptone (1g/l) et de chlorure de sodium (9g /l) pour *S. aureus* et *C. albicans*.

La culture développée en surface des boîtes de pétri doit être ensuite dispersée et transférée dans des récipients appropriés. Quelques colonies sont ensemencées dans le bouillon nutritif puis l'ensemble est incubé pendant 4 à 5h à température ambiante pour *C. albicans*. La culture microbienne est ensuite diluée avec de l'eau peptonée tamponnée jusqu'à l'obtention d'une opacité identique à l'une des gammes étalons de Mc FARLAND.

Ces suspensions ajustées à  $10^7$  à  $10^8$  germes viables par ml, doivent être utilisées immédiatement pour l'inoculation des échantillons de produit. Leur population est déterminée par dénombrement en milieu gélosé identique au milieu de production de l'inoculum.

L'estimation de la concentration microbienne dans les suspensions est déterminée à partir de la comparaison avec la gamme étalon proposées par Mc FARLAND.

#### ♣ Préparation de l'échelle de Mc FARLAND [15].

L'échelle de Mc FARLAND est utilisée pour estimer approximativement la concentration microbienne en suspension dans un liquide grâce à des valeurs préétablies.

Cette technique est basée sur la comparaison de la turbidité de la suspension microbienne avec celle des gammes étalon proposées par Mc FARLAND. Deux réactifs constituent la solution Mc FARLAND : le chlorure de barium ( $BaCl_2$ ) et l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ). En effet, la turbidité de la solution de Mc FARLAND varie selon la proportion de ces 2 réactifs, se traduisant par une formation de faible précipité correspondant au sulfate de barium.

Les compositions de la gamme étalon sont indiquées dans le tableau ci-après.

Tableau XII: Échelle standard de Mc FARLAND [15].

Mc FARLAND Standard	BaCl <sub>2</sub> (ml) 1%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml) 1%	Concentration en UFC/ml
0,5	0,05	9,95	$1,5 \times 10^8$
1,0	0,1	9,9	$3,0 \times 10^8$
2,0	0,2	9,8	$6,0 \times 10^8$
3,0	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$
4,0	0,4	9,6	$1,2 \times 10^8$
5,0	0,5	9,5	$1,5 \times 10^8$
6,0	0,6	9,4	$1,8 \times 10^8$
7,0	0,7	9,3	$2,1 \times 10^8$
8,0	0,8	9,2	$2,4 \times 10^8$
9,0	0,9	9,1	$2,7 \times 10^8$
10,0	1,0	9,0	$3,0 \times 10^8$

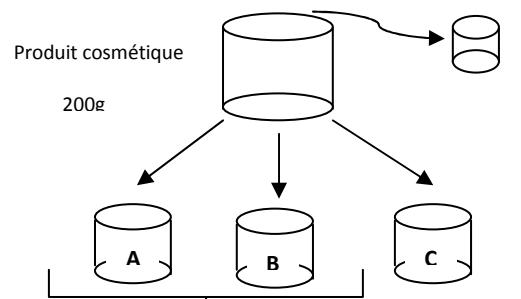
La comparaison est réalisée au moyen d'un opacimètre et s'observe visuellement. La concentration en ufc/ml est lire dans le tableau précédent indiquant la correspondance entre valeurs exprimées en Mc FARLAND et valeur en ufc/ml. Cette suspension constitue l'inoculum pour le test antimicrobien.

#### ♣ Contamination de la matrice

Pour chaque micro-organisme, un récipient de produit à examiner est ensemencé avec la suspension préparée précédemment, afin d'obtenir un inoculum de  $10^5$  –  $10^6$  germes viables par ml ou par g de préparation. Le volume de l'inoculum introduit ne doit pas dépasser 1% du volume du produit (0,5% pour la Pharmacopée américaine). Pour assurer une répartition homogène, il faut mélanger soigneusement.

Le produit est ensuite maintenu à 20 - 25°C, et des dénombrements sont réalisés après 2, 7, 14 et 28 jours de conservation.

Le schéma de réalisation du test d'efficacité des conservateurs dans les produits cosmétiques se résume dans le diagramme suivant :



Challenge Test



Concentration = x %

7.8 : Test de stabilité

a : *S. aureus*

b : *C. albicans*

Inoculum

V(Inoculum) = 1% V(Produit)

5,6 : Réserve

Incubation 20 - 25°C

$10^6$  -  $10^8$  germes/ml

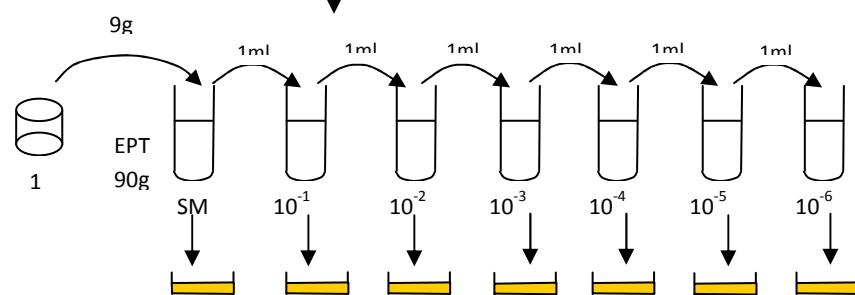
Lecture 1

T=48h

Incubation 24h

Dénombrement

Dilution décimale

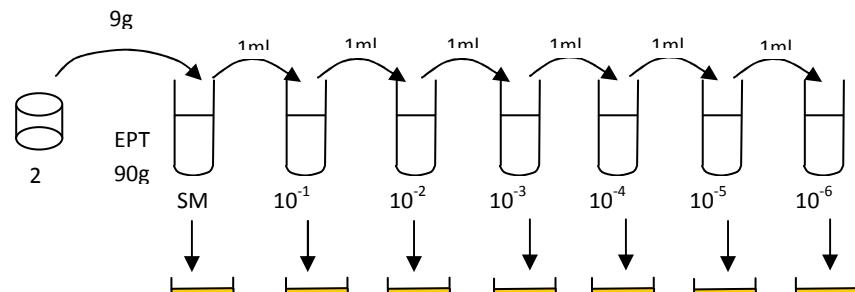


Lecture 2

T=7j

Incubation 24h

Dénombrement

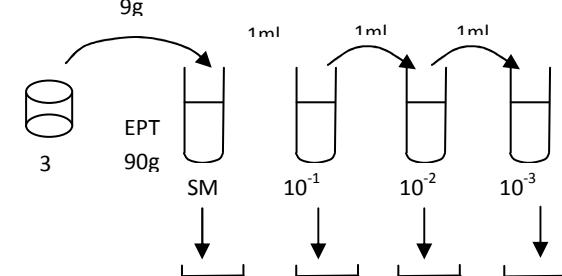


Lecture 3

T= 14j

Incubation 24h

Dénombrement



Lecture 4

T= 28i

Incubation 24h

Dénombrement

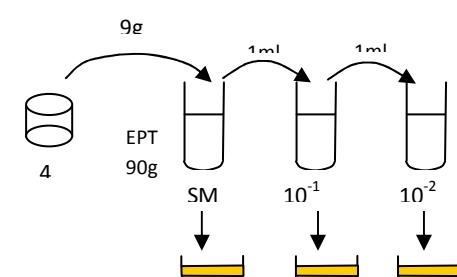


Figure 7: Déroulement du «challenge test»

#### ♣ Critères d'appréciation

Pour les préparations pour application locale, les critères recommandée (critères dits A) d'efficacité du conservateur sont :

- Pour les bactéries (*S. aureus* et *P. aeruginosa*) : réduction de 2log en 48h, de 3log en 7jours de la population initiale et pas d'augmentation ultérieure (au 28ème jour).
- Pour les fungi (*C. albicans* et *A. niger*) : réduction de 2log en 14jours et pas d'augmentation ultérieure.

## 2.6. Études socio-économiques

Ce paragraphe sera axé sur les résultats des différentes enquêtes effectuées auprès des utilisateurs de produits cosmétiques.

Une étude de marché est un ensemble de techniques marketing qui permet de mesurer, analyser et comprendre les comportements, les appréciations, les besoins et attentes d'une population définie.

L'étude de marché effectuée utilise des techniques quantitatives telles que le sondage, les panes, et d'autres techniques qualitatives telles que les entretiens individualisés. Elle s'est aussi accompagnée de recherches documentaires (compilation et analyse de sources existantes). [14]

Les informations à recueillir auprès des sujets à interroger ont été obtenues de façon auto administrée (questionnaire par internet).

#### ➤ Enquêtes sociodémographiques

Des enquêtes ont été effectuées auprès de 72 personnes pour évaluer la situation actuelle de l'utilisation des produits cosmétiques mais surtout l'utilisation des produits cosmétiques « sans conservateurs d'origine chimique ».

Dans cette voie, une série de 15 questions ont été élaborés à l'aide de la plate forme «google questionnaire » principalement axée sur les points suivants :

- La fréquence d'utilisation des produits cosmétiques,
- Les critères influençant le choix d'achat des produits cosmétiques,
- L'intérêt pour les cosmétiques naturels ou biologiques
- L'intérêt pour les cosmétiques sans conservateurs de synthèse

Le traitement des résultats obtenus de l'enquête se fera par la plate forme «google questionnaire » mais aussi à l'aide du logiciel EXCELL sous Windows 2007.

## CONCLUSION PARTIELLE II

Diverses méthodes ont donc été employées afin de mieux déterminer le choix des huiles essentielles à utiliser ainsi que leur efficacité en tant que conservateur dans les produits cosmétiques cibles.

Les analyses chromatographiques en phases gazeuses permettent d'identifier les constituants des huiles essentielles choisies et de vérifier si elles contiennent réellement les composants antimicrobiens recherchés.

Les analyses sensorielles ainsi que les tests de vieillissement accéléré à l'étuve constituent des outils précieux dans les choix des concentrations d'huiles essentielles à faire tester dans les analyses microbiologiques. Par ailleurs, les tests de stabilité à l'étuve permettent de donner un aperçu des pouvoirs antioxydants des huiles essentielles utilisées.

Les analyses microbiologiques quant à elles permettent d'évaluer l'efficacité réelle des conservateurs sur des souches de microbes.

# Résultats et Discussions

### III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### 3.1. Résultats des analyses des huiles essentielles sur CPG

Le résultat des analyses chromatographiques des huiles essentielles effectuées au laboratoire des IAA à l'ESSA sont présentées ci –après respectivement pour l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*), de girofle (*Eugenia caryophyllata*) et de *mandravasarotra* (*Cinnamosma fragrans*). Les profils sont présentés en annexe n°5).

Tableau XIII: Constituants chimiques de l'huile essentielle de thym

CONSTITUANT	CONCENTRATION DE L'ÉCHANTILLON (% RELATIF)	NORME AFNOR NFT 75-349
α-thuyène+ α-pinène	0,5	1,1-3,7
Myrcène	1,0	1,0-2,8
α-terpinène	1,1	0,9-2,6
β-terpinène	14,5	5,0-10,3
p-cymène	7,0	15,0-28,0
Linalol	1,9	4,0-6,2
β-caryophyllène	3,0	0,6-1,8
<b>Thymol</b>	<b>56,82</b>	<b>36,0-55,0</b>
Carvacrol	2,68	1,2-4,0

Tableau XIV: Composition chimique de l'huile essentielle de girofle clou

CONSTITUANT	CONCENTRATION DE L'ÉCHANTILLON (% RELATIF)	NORME AFNOR NFT 75-207
β-caryophyllène	8,1	2-7
α-humulène	1,0	-
<b>Eugénol</b>	<b>87,0</b>	<b>75-87</b>
Acétate d'eugényle	1,7	8-15

Tableau XV: Composition chimique de l'échantillon de l'huile essentielle de *Mandravasarotra*

CONSTITUANT	CONCENTRATION DE L'ÉCHANTILLON (% RELATIF)	RESULTATS DÉJÀ TROUVÉS
α-pinène	5,3	4,9
β-pinène	5,8	6,7
Sabinène	7,6	9,2
Myrcène	2,4	2,8
α-terpinène	1,1	0,5
Limonène	3,7	11,5
<b>1,8-cinéol</b>	<b>47,9</b>	<b>42,3</b>
Cis-β-ocimène	-	1,4
β-terpinène	2,2	0,9
Trans-β-ocimène	-	0,9
p-cymène	0,4	-
Terpinolène	0,5	-
Linalol	2,0	-
Terpinène-4ol	5,2	2,7
α-terpinéol	4,4	3,0

Ces résultats montrent que les huiles essentielles contiennent bien les composés à activités antibactériennes en quantité élevée : 87% pour l'Eugénol si la norme est de 75-87% et même supérieure aux normes pour le thymol (56,82% si la norme est de 36,0-55,0) et le 1,8-cinéol (47,9% si les résultats déjà trouvés sont de 42,3%).

### 3.2. Résultats des analyses sensorielles

#### 3.2.1. Analyses du seuil de détection des huiles essentielles

Afin de classer les résultats obtenus pour ces analyses, le dépouillement des résultats s'est fait sur le logiciel *EXCEL* sur *Microsoft Office 2007*.

##### 3.2.1.1. Pour l'huile essentielle de girofle

Les tableaux suivants (tableaux XVI, XVII, XVIII et IXX) représentent le nombre de réponses marquées pour une concentration donnée de girofle dans les gammes de lotions et lait contenant des bases parfumantes ainsi que la moyenne obtenue par rapport à l'appréciation générale sur une échelle de 1 à 5 de l'échantillon en question. Les tests ont été effectués sur 21 sujets.

Tableau XVI: Seuil de détection de l'huile essentielle de girofle dans les échantillons de lait démaquillant + base parfumante

Échantillons	Réponses marquées en %	Appréciation générale
Échantillon 1 : 0,06% d'HE	23,81	4
Échantillon 2 : 0,12% d'HE	19,05	3,75
Échantillon 3 : 0,24% d'HE	19,05	3,75
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	<b>38,09</b>	<b>4,12</b>

Tableau XVII: Seuil de détection de l'huile essentielle de girofle dans les échantillons de lait démaquillant sans base parfumante

Échantillons	Réponses marquées en %	Appréciation générale
Échantillon 1 : 0,06% d'HE	33,33	371
Échantillon 2 : 0,12% d'HE	14,29	1,66
Échantillon 3 : 0,24% d'HE	<b>28,58</b>	<b>3,66</b>
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	23,80	4,4

Les résultats des analyses de seuils de détection pour les lotions sont représentés dans les tableaux suivants :

**Tableau XVIII: Seuil de détection de l'huile essentielle de girofle dans les échantillons de lotions + base parfumante**

Échantillons	Réponses marquées en %	Appréciation générale
Échantillon 1 : 0,06% d'HE	9,52	4
Échantillon 2 : 0,12% d'HE	<b>33,34</b>	<b>4,14</b>
Échantillon 3 : 0,24% d'HE	<b>33,34</b>	<b>3,43</b>
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	23,80	4

**Tableau XIX: Seuil de détection de l'huile essentielle de girofle dans les échantillons de lotions sans base parfumante**

Échantillons	Réponses marquées en %	Appréciation générale
Échantillon 1 : 0,06% d'HE	19,04	3
Échantillon 2 : 0,12% d'HE	<b>33,34</b>	<b>3,57</b>
Échantillon 3 : 0,24% d'HE	23,81	3,6
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	23,81	4,23

### **3.2.1.2. Pour l'huile essentielle de mandravasarotra**

Les mêmes tests que précédemment ont également été effectués sur 17 sujets avec les huiles essentielles de *mandravasarotra* ; les résultats pour les échantillons de lait démaquillant sont représentés dans les tableaux suivants :

**Tableau XX: Seuil de détection de l'huile essentielle de *mandravasarotra* dans les échantillons de lait démaquillant + base parfumante**

Échantillons	Réponses marquées en %	Appréciation générale
Échantillon 1 : 0,18% d'HE	<b>33,33</b>	<b>2,83</b>
Échantillon 2 : 0,24% d'HE	16,67	3,66
Échantillon 3 : 0,32% d'HE	27,78	3,4
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	22,22	4,25

**Tableau XXI: Seuil de détection de l'huile essentielle de *mandravasarotra* dans les échantillons de lait démaquillant sans base parfumante**

Échantillons	Réponses marquées en %	Appréciation générale
Échantillon 1 : 0,12% d'HE	16,67	2,66
Échantillon 2 : 0,24% d'HE	22,22	2,25
Échantillon 3 : 0,32% d'HE	22,22	2,25
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	<b>33,89</b>	<b>1,71</b>

Les résultats des tests effectués sur les lotions sont les suivantes :

**Tableau XXII: Seuil de détection de l'huile essentielle de *mandravasarotra* dans les échantillons de lotion + base parfumante**

Échantillons	Réponses marquées en %	Appréciation générale
Échantillon 1 : 0,18% d'HE	22,22	3,5
Échantillon 2 : 0,24% d'HE	<b>38,88</b>	<b>4,28</b>
Échantillon 3 : 0,32% d'HE	16,68	4,33
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	22,22	2,5

**Tableau XXIII: Seuil de détection de l'huile essentielle de *mandravasarotra* dans les échantillons de lotion sans base parfumante**

Échantillons	Réponses marquées en %	Appréciation générale
Échantillon 1 : 0,18% d'HE	<b>44,44</b>	<b>3,25</b>
Échantillon 2 : 0,24% d'HE	16,67	4
Échantillon 3 : 0,32% d'HE	16,67	3,66
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	22,22	3,25

### **3.2.1.3. Discussions sur l'analyse du seuil de détection**

#### ➤ Cas de l'huile essentielle de girofle :

##### - Sur les laits démaquillants

38,09% des sujets ne détectent l'odeur de l'huile essentielle qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> concentration c'est-à-dire à 0,48% d'huile essentielle de girofle lorsqu'elle est mélangée avec la base parfumante dans le lait démaquillant et a obtenu une note de 4,12 sur 5. Pour les échantillons sans base parfumante, la majorité des sujets c'est-à-dire 28,58% ont décelé l'odeur du conservateur à partir de la 3<sup>ème</sup> concentration c'est-à-dire à un taux de 0,24% d'huile essentielle et dont la note obtenue a été de 3,66.

L'huile essentielle de girofle est donc mieux masquée et plus appréciée lorsqu'elle est associée à la base parfumante dans le lait démaquillant.

##### - Sur les lotions

Dans les échantillons contenant des bases parfumantes 33,34% des sujets ont perçu l'huile essentielle de girofle à partir de la 2<sup>ème</sup> concentration (0,12%) et lui ont attribué une note de 4,14 sur 5 et 33,34% ont également décelé l'odeur du conservateur utilisé à la 3<sup>ème</sup> concentration c'est-à-dire à 0,24% avec une note de 3,43.

Dans les lotions contenant seulement l'huile essentielle de girofle par contre, la majorité des sujets c'est-à-dire 33,34% ont perçu l'odeur du conservateur à partir de la 2<sup>ème</sup> concentration.

Les sujets n'ont donc pas cernés de différence flagrante entre les échantillons dont le girofle est mélangé avec les bases parfumantes et ceux où il est incorporé seul dans la formulation.

➤ **Cas de l'huile essentielle de *mandravasarotra***

- **Sur les laits démaquillants**

33,33% des sujets ont détecté l'odeur de l'huile essentielle à partir de la 1<sup>ère</sup> concentration c'est-à-dire à 0,18% d'huile essentielle de *mandravasarotra* lorsqu'elle est mélangée avec la base parfumante et a obtenu une note de 2,83 sur 5 et se situe encore entre moyen et désagréable. Pour les échantillons sans base parfumante, la majorité des sujets c'est-à-dire 33,89% ont décelé l'odeur du conservateur à partir de la 4<sup>ème</sup> concentration c'est-à-dire à un taux de 0,48% d'huile essentielle et dont la note obtenue a été de 1,71.

L'huile essentielle de *mandravasarotra* est moins cernée par les sujets lorsqu'elle n'est pas associée aux bases parfumantes toutefois elle est moins appréciée vue que la moyenne des appréciations est de 1,71 c'est-à-dire entre désagréable et assez désagréable.

- **Sur les lotions**

Dans les échantillons contenant des bases parfumantes 38,88% des sujets ont perçu l'huile essentielle de *mandravasarotra* à partir de la 2<sup>ème</sup> concentration (0,12%) et lui ont attribué une note de 4,28.

Dans les lotions dont l'huile essentielle de *mandravasarotra* n'a pas été associée à la base parfumante par contre, la majorité des sujets c'est-à-dire 44,44% ont perçu l'odeur de l'H.E. dès la 1<sup>ère</sup> concentration.

L'huile essentielle de girofle est donc légèrement mieux masquée et plus appréciée lorsqu'elle est associée à la base parfumante dans les lotions.

L'analyse du seuil de détection de ces conservateurs dans les produits ne permet pas à elle seule de donner une estimation de la préférence des consommateurs d'où la raison des tests hédoniques effectués sur une soixantaine de sujets.

### **3.2.2. Analyses hédoniques**

Par rapport aux résultats obtenus sur les analyses du seuil de détection les échantillons analysés par les sujets sont celles qui contiennent des bases parfumantes.

Les épreuves hédoniques sur l'odeur ont permis de déterminer laquelle des concentrations proposées est la plus appréciée par le sujet pour un type de produit. Le but est de choisir parmi les différentes concentrations celle qui sera testée en « challenge test ».

#### **3.2.2.1. Tests de classement**

Les tests de classements ont été effectués pour les 3 types de conservateurs employés :

- **Test 1** : test de classement sur les échantillons de lait et de lotion dont le conservateur utilisé est le *mandravasarotra* incorporé à 4 concentrations différentes (tableau XI)
- **Test 2** : test de classement sur les échantillons de lait et de lotion dont le conservateur est le girofle incorporé à 4 concentrations différentes
- **Test 3** : test de classement sur les échantillons de lait et de lotion avec comme conservateur : girofle + *mandravasarotra* à 5 concentrations différentes.

### a. Test de classement 1

Les sujets ayant participé au test sont au nombre de 61. Cette épreuve a été effectuée sur 4 échantillons différents de lait et 4 échantillons de lotion portant les codes à 3 chiffres

Les codes des échantillons des laits démaquillant sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau XXIV: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test de classement 1 avec l'huile essentielle de *mandravasarotra***

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,18% d'HE	426
Échantillon 2 : 0,24% d'HE	237
Échantillon 3 : 0,32% d'HE	512
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	124

Le code des échantillons pour les lotions sont présentés ci-après :

**Tableau XXV: Code des échantillons de lotion pour le test de classement 1 avec l'huile essentielle de *mandravasarotra***

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,18% d'HE	351
Échantillon 2 : 0,24% d'HE	614
Échantillon 3 : 0,32% d'HE	832
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	175

Sur les échantillons de lait et de lotion que les sujets ont classés par ordre de préférence décroissante, les effectifs par rangs peuvent être regroupés dans les tableaux suivants :

#### - Cas des laits démaquillants

**Tableau XXVI: Effectifs par rang du test de classement 1 pour les laits démaquillants**

RANG	426	237	512	124
1	14	15	18	15
2	15	15	13	16
3	17	20	16	8
4	15	11	14	22
TOTAL	61	61	61	61

D'après le tableau, 512 (0,24% d'HE) est l'échantillon qui a eu un nombre élevé par rapport au nombre de fois où ont été classé au premier rang les 3 autres échantillons. Cependant comme il n'existe pas de différence très significative avec les échantillons 426, 237 et 124 qui ont été classés numéro 1 respectivement 14, 15 et 15 fois par les sujets, les résultats seront plus explicites sur les différences perçues suite à la comparaison de la somme des rangs par le test de FRIEDMAN.

Le tableau suivant représente la somme des rangs pour les 4 échantillons

Tableau XXVII: Somme des rangs du test de classement 1 pour le lait démaquillant

ECHANTILLONS	NOMBRE DE JURYS CONSIDERES	SOMME DES RANGS OBTENUS
426	61	155
237	61	149
512	61	148
124	61	157

Le tableau montre que c'est l'échantillon 512 (0,24% d'HE) qui a la somme des rangs la plus faible, ce qui confirme l'hypothèse énoncée précédemment comme quoi, cet échantillon est la plus appréciée par rapport aux 3 autres.

#### ♣ Loi de Page

Comme les valeurs obtenues pour la somme des rangs ne sont pas très éloignées, utilisons la loi de Page pour déterminer si les produits sont différents entre eux.

On calcule la statistique de Page L de la manière suivante

$$L = R_1 + 2 R_2 + 3 R_3 + \dots + p R_p$$

Avec  $R_p$  : somme des rangs affecté au produit  $p$

On se reporte alors à la table de Page qui donne la valeur théorique  $l\alpha$  au seuil de risque fixé  $\alpha$ .

Si  $L < l\alpha$  alors l'ordre n'est significativement pas reconnu.

Si  $L > l\alpha$  alors l'ordre est significativement reconnu.

$$L = 1527$$

On compare alors la valeur observée à une valeur théorique,  $z$ , obtenue dans une *table de page* au risque  $\alpha = 5\%$ , pour  $n=4$ . La valeur théorique  $l\alpha$  est de **266**.

Comme  $L > l\alpha$  donc les 4 échantillons sont perçus comme différents.

#### ♣ Loi de FRIEDMAN

Si l'on utilise la loi de FRIEDMAN

$$F = \frac{12}{np(p+1)} (R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_i^2 + \dots + R_p^2) - 3n(p+1)$$

Avec:  $n$  = nombre de juges = 61

$p$  = nombre de produits = 4

$R_i$  = somme des rangs pour le produit  $i$

$$F = -2,42$$

On compare alors la valeur observée à une valeur théorique,  $z$ , obtenue dans une **table de  $\chi^2$**  au risque  $\alpha = 5\%$ , pour  $(p-1)$  degrés de liberté. La valeur de  $z$  est de **7,81**.

Comme la valeur de  $F$  est inférieure à  $z$ , alors les produits ne sont pas tous significativement différents.

#### ♣ Test du plus petit écart

Il reste alors à savoir quels produits sont différents entre eux. Une différenciation plus détaillée peut se faire en comparant deux à deux les produits en effectuant le test du plus petit écart en utilisant la règle de la plus petite différence significative.

Cette règle consiste à comparer chaque différence de somme des rangs entre 2 produits à la valeur théorique suivante :

$$\delta = z \sqrt{\frac{np(p+1)}{6}}$$

Où  $z$  est une valeur lue dans la table de gausse au niveau  $\frac{2\alpha}{p(p-1)}$

$$\frac{2\alpha}{p(p-1)} = \frac{2 * 0,05}{4 * 3} = 0,0083$$

On détermine ensuite  $z$  à partir de la table de la loi normale  **$z = 2,64$**

$$\delta = 2,64 \sqrt{\frac{61 * 4 * 5}{6}}$$

$\delta = 37,64$

Cette valeur obtenue est comparée à la différence entre la somme des rangs de deux produits deux à deux ( $x$ ).

Si  $|R_i - R_j| < \delta$  alors  $R_i$  et  $R_j$  ne sont pas différents pour la caractéristique étudiée

Si  $|R_i - R_j| > \delta$  alors  $R_i$  et  $R_j$  sont différents sur cette caractéristique.

**Tableau XVIII: Comparaison des laits démaquillants pour le test de classement 1 selon le Test du plus petit écart**

PRODUITS	Rang i	Rang j	Rang i-j	Valeur critique	$ R_i - R_j  = x$	Différence Significative
124 vs 512	157	148	9	37,64	$x < \delta$	Non
124 vs 237	157	149	8	37,64	$x < \delta$	Non
124 vs 426	157	155	2	37,64	$x < \delta$	Non
426 vs 512	155	148	7	37,64	$x < \delta$	Non
426 vs 237	155	149	6	37,64	$x < \delta$	Non
237 vs 512	149	148	1	37,64	$x < \delta$	Non

D'après ces résultats, les jurys n'ont pas perçus de différences très significatives entre les quatre échantillons de lait démaquillant. Ces tests ayant été effectués sur des jurys naïfs, la majorité ont stipulé avoir eu des difficultés pour émettre leur préférence vu que l'odeur des échantillons étaient à peu près similaires

Pour pouvoir également comparer deux à deux les quatre échantillons, l'ANOVA à un facteur a été utilisé. Un test de comparaison multiple, le **Test de DUNCAN** a été ensuite effectué à un seuil de 5%.

**Tableau XXIX: Résultat du test de classement 1 sur les laits démaquillants**

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES
124	2,574	A
426	2,541	A
237	2,443	A
512	2,426	A

Les moyennes de la somme des rangs obtenues par les 4 échantillons varient peu (de 2,426 à 2,574). Et par l'ANOVA, les échantillons ont été classé en un seul groupe A. Ce qui confirme bien que les différences perçues par les sujets sur les 4 échantillons sont non significatives.

#### - Cas des lotions

Le tableau suivant présente la somme des rangs des lotions pour le test de classement 1.

**Tableau XXX: Effectifs par rang du test de classement 1 pour les lotions**

RANG	351	614	832	175
1	23	14	15	7
2	15	16	15	14
3	12	19	16	14
4	11	12	15	26
TOTAL	61	61	61	61

L'échantillon 351 est de loin celui qui a été classé numéro 1 par rapport aux 3 autres échantillons et n'a été classé 4<sup>ème</sup> que 11 fois. Cet échantillon est apparemment le plus apprécié par les sujets.

La somme des rangs pour les 4 échantillons sont représentés dans le tableau suivant

**Tableau XXXI: Somme des rangs du test de classement 1 pour les lotions**

ECHANTILLONS	NOMBRE DE JURYS CONSIDERES	SOMME DES RANGS OBTENUS
351	61	130
614	61	151
832	61	151
175	61	177

La somme des rangs obtenue par l'échantillon 351 est de 130 et largement inférieure à celle des 3 autres échantillons, cela confirme donc que cet échantillon soit le plus apprécié.

#### ❖ *Loi de Page*

En appliquant les formules précédemment stipulées, on obtient

$$L = 1593$$

La valeur de  $l\alpha$  étant de **266**,  $L$  est donc supérieur à  $l\alpha$ , les produits sont donc perçus comme différents.

#### ❖ *Loi de FRIEDMAN*

En appliquant les formules également données précédemment

$$F = 7,93$$

Comme la valeur de  $F$  est supérieure à  $z = 7,81$ , alors les produits sont significativement différents.

#### ❖ *Test du plus petit écart*

Pour connaître deux à deux ces différences on a recours aux formules relatives au test du plus petit écart d'où les résultats suivants :

$$\delta = 37,64$$

Les comparaisons deux à deux des échantillons de lotion sont données par le tableau suivant :

Tableau XXXII: Comparaison des lotions pour le test de classement 1 selon le Test du plus petit écart

PRODUITS	Rang i	Rang j	Rang i-j	Valeur critique	$ R_i - R_j  = x$	Différence Significative
175 vs 351	177	130	47	37,64	$x > \delta$	Oui
175 vs 614	177	151	26	37,64	$x < \delta$	Non
175 vs 832	177	151	26	37,64	$x < \delta$	Non
832 vs 351	151	130	21	37,64	$x < \delta$	Non
832 vs 614	151	151	0	37,64	$x < \delta$	Non
614 vs 351	151	130	21	37,64	$x < \delta$	Non

L'échantillon 351 (à 0,12% d'HE) est vraiment perçu par les sujets comme étant très différent de l'échantillon 175 (à 0,48% d'HE). Effectivement l'échantillon 175 étant considéré par les sujets comme ayant une trop forte odeur et parfois même associée à une odeur de médicaments par certains sujets.

Un test de DUNCAN effectué à un seuil de 5% a permis de classer les produits en deux groupes

Tableau XXXIII: Résultat du test de classement 1 sur les lotions

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES	
175	2,902	A	
614	2,475	A	B
832	2,475	A	B
351	2,131		B

Comme l'échantillon 175 est significativement différent de 351 ils font partis de deux groupes différents, tandis que la valeur de la somme des rangs des échantillons 614 et 832 sont exactement les mêmes. La concentration la plus faible ainsi que la plus élevée étant le plus souvent perçus comme ayant des légères ou très fortes, ces échantillons n'ont pas fait l'objet de remarques particulières par les jurys qui n'ont visiblement pas trouvé de différence flagrante. Le plus apprécié reste néanmoins celui qui a la plus faible concentration.

### b. Test de classement 2

Les sujets ayant participé au test sont également au nombre de 61. Cette épreuve a été effectuée de la même manière que le test 1 avec l'huile essentielle de *mandravasarotra* sur 4 échantillons différents de lait et 4 échantillons de lotion portant les codes à 3 chiffres

Les codes des échantillons des laits démaquillants sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XXXIV: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test de classement 2 avec l'huile essentielle de girofle

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,06% d'HE	202
Échantillon 2 : 0,12% d'HE	474
Échantillon 3 : 0,24% d'HE	343
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	909

Le tableau suivant présente le code des échantillons des lotions :

Tableau XXXV: Code des échantillons de lotion pour le test de classement 2 avec l'huile essentielle de girofle

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,06% d'HE	512
Échantillon 2 : 0,12% d'HE	251
Échantillon 3 : 0,24% d'HE	422
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	347

#### - Cas des laits démaquillants

Les 61 sujets ont classé les 4 échantillons de laits démaquillants à concentration croissante d'huile essentielle de girofle. Les effectifs par rangs attribués par les jurys pour chaque échantillon sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau XXXVI: Effectifs par rang du test de classement 2 pour les laits démaquillants

RANG	202	474	343	909
1	18	15	7	20
2	14	11	31	4
3	9	26	15	10
4	20	9	8	27
TOTAL	61	61	61	61

L'échantillon 909 (0,06% d'huile essentielle de girofle) semble être le plus apprécié par les sujets puisqu'il a été classé 20 fois numéro 1 par les sujets. Toutefois 18 sujets ont classé l'échantillon 202 au premier rang. Il faut aussi remarquer que 27 sujets ont classé l'échantillon 909 au dernier rang c'est-à-dire au moins apprécié.

L'interprétation de la somme des rangs permettra de connaitre quel échantillon est le plus apprécié.

Tableau XXXVII: Somme des rangs du test de classement 2 pour le lait démaquillant

ECHANTILLONS	NOMBRE DE JURYS CONSIDERES	SOMME DES RANGS OBTENUS
202	61	153
474	61	148
343	61	145
909	61	166

D'après ce tableau l'échantillon 343 est toutefois celui qui a obtenu la valeur la plus faible pour la somme des rangs.

#### ❖ *Loi de Page*

Pour déterminer les différences entre les produits la loi de Page a été utilisée d'où les résultats

$$L = 1548$$

La valeur de  $\lambda$  étant de **266**,  $L$  est donc supérieur à  $\lambda$ , les produits sont donc perçus comme différents.

#### ❖ *Loi de FRIEDMAN*

$$F = 8,54$$

La valeur de  $z$  étant **7,81** ;  $F$  est supérieur à  $z$ , alors les produits sont significativement différents.

#### ❖ *Test du plus petit écart*

Pour connaitre les différences deux à deux des produits, le test du plus petit écart est effectué.

$$\delta = 37,64$$

Les comparaisons deux à deux des échantillons de lotion sont données par le tableau suivant :

Tableau XXXVIII: Comparaison des lotions pour le test de classement 2 selon le Test du plus petit écart

PRODUITS	Rang i	Rang j	Rang i-j	Valeur critique	$ R_i - R_j  = x$	Différence Significative
909 vs 343	166	145	21	37,64	$x < \delta$	Non
909 vs 474	166	148	18	37,64	$x < \delta$	Non
909 vs 202	166	153	13	37,64	$x < \delta$	Non
202 vs 343	153	145	8	37,64	$x < \delta$	Non
202 vs 474	153	148	5	37,64	$x < \delta$	Non
474 vs 343	148	145	3	37,64	$x < \delta$	Non

Tous les échantillons de lotions avec le girofle ne sont donc pas perçus comme significativement différents pour le test de classement.

Tableau XXXIX: Résultat du test de classement 2 sur les laits démaquillant

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES
909	2,721	A
202	2,508	A
474	2,426	A
343	2,377	A

La plupart des jurys ont du mal à discerner la différence entre les odeurs ; en effet 29 sujets sur les 61 n'ont pas trouvé de justification quant au choix de leur classement.

#### - Cas des lotions

Le tableau suivant présente la somme des rangs des lotions pour le test de classement 2.

Tableau XL: Effectifs par rang du test de classement 2 pour les lotions

RANG	512	251	422	347
1	31	7	11	12
2	8	22	18	12
3	12	16	26	6
4	10	16	6	31
TOTAL	61	61	61	61

L'échantillon 512 est de loin celui qui a été classé numéro 1 par rapport aux 3 autres échantillons et n'a été classé 4<sup>ème</sup> que 11 fois. Cet échantillon est apparemment le plus apprécié par les sujets.

Le tableau suivant la somme des rangs obtenue pour les quatre échantillons

Tableau XLI: Somme des rangs du test de classement 2 pour les lotions

ECHANTILLONS	NOMBRE DE JURYS CONSIDERES	SOMME DES RANGS OBTENUS
512	61	123
251	61	163
422	61	149
347	61	176

L'échantillon 512 (à 006% d'huile essentielle) a une valeur de la somme des rangs largement inférieure à celle des 3 autres échantillons.

♦ *Loi de Page*

En appliquant les formules précédemment mentionnées dans les paragraphes précédents, on obtient

$$L = 1600$$

La valeur de  $\lambda$  étant de **266**,  $L$  est donc supérieur à  $\lambda$ , les produits sont donc perçus comme différents.

♦ *Loi de FRIEDMAN*

$$F = 18,19$$

La valeur de  $z$  étant **7,81** ;  $F$  est supérieur à  $z$ , alors les produits sont significativement différents.

♦ *Test du plus petit écart*

Pour connaître deux à deux ces différences on a recours aux formules relatives au test du plus petit écart d'où les résultats suivants :

$$\delta = 37,64$$

Les comparaisons deux à deux des échantillons de lotion sont données par le tableau suivant :

Tableau XLII: Comparaison des lotions pour le test 2 selon le Test du plus petit écart

PRODUITS	Rang i	Rang j	Rang i-j	Valeur critique	$ R_i - R_j  = x$	Différence Significative
347 vs 512	176	123	53	37,64	$x > \delta$	Oui
347 vs 422	176	149	27	37,64	$x < \delta$	Non
347 vs 251	176	163	12	37,64	$x < \delta$	Non
251 vs 512	163	123	40	37,64	$x > \delta$	Oui
251 vs 422	163	149	12	37,64	$x < \delta$	Non
422 vs 512	149	123	24	37,64	$x < \delta$	Non

L'échantillon 512 (à 0,06% d'HE) a été celui qui a reçu le plus de remarques comme étant la plus douce et la plus légère contrairement à l'échantillon 347 (à 0,48% d'HE) considéré par certains jurys comme ayant une odeur très forte et parfois même désagréable. Ce qui expliquerait leur différence très significative. L'échantillon 512 ayant reçu le plus de remarques positives la différence est déjà significative avec l'échantillon 251 (à 0,12% d'HE).

Les produits ont donc été répartis en deux groupes représentés dans le tableau suivant

**Tableau XLIII: Résultat du test de classement 2 sur les lotions**

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES	
347	2,885	A	
251	2,639	A	
422	2,443	A	B
512	2,049		B

### c. Test de classement 3

61 jurys ont participé à cette évaluation sensorielle. Les démarches entreprises pour cette épreuve sont similaires aux 2 premiers tests toutefois le mélange des huiles essentielles de *Mandravasarotra* et de girofle ont été testé sur 5 échantillons différents de lait et 4 échantillons de lotion portant les codes à 3 chiffres

Les codes des échantillons des laits démaquillant sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau XLIV: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test de classement 3 avec l'huile essentielle de *mandravasarotra* + girofle**

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,06% d'HE Girofle + 0,06% HE <i>mandravasarotra</i>	428
Échantillon 1 : 0,06% d'HE Girofle + 0,12% HE <i>mandravasarotra</i>	532
Échantillon 1 : 0,12% d'HE Girofle + 0,06% HE <i>mandravasarotra</i>	276
Échantillon 1 : 0,12% d'HE Girofle + 0,12% HE <i>mandravasarotra</i>	153
Échantillon 1 : 0,18% d'HE Girofle + 0,18% HE <i>mandravasarotra</i>	849

Les codes des échantillons dans le cas des lotions sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau XLV: Code des échantillons de lotions pour le test de classement 3 avec l'huile essentielle de *mandravasarotra* + girofle**

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,06% d'HE Girofle + 0,06% HE <i>mandravasarotra</i>	146
Échantillon 1 : 0,06% d'HE Girofle + 0,12% HE <i>mandravasarotra</i>	612
Échantillon 1 : 0,12% d'HE Girofle + 0,06% HE <i>mandravasarotra</i>	243
Échantillon 1 : 0,12% d'HE Girofle + 0,12% HE <i>mandravasarotra</i>	371
Échantillon 1 : 0,18% d'HE Girofle + 0,18% HE <i>mandravasarotra</i>	902

- **Cas des laits démaquillants**

Les effectifs par rang obtenu pour chaque échantillon sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau XLVI: Effectifs par rang du test de classement 3 pour les laits démaquillants**

RANG	428	532	276	153	849
1	18	10	9	11	13
2	12	13	13	13	10
3	9	11	19	17	4
4	6	19	11	9	13
5	16	8	9	11	21
TOTAL	61	61	61	61	61

L'échantillon 428 été classé 18 fois numéro 1 par les jurys ; ce qui est une valeur largement supérieure à celles obtenues par les autres échantillons. Il semble ainsi être l'échantillon le plus apprécié, toutefois la somme des rangs obtenue pour chaque échantillon permettra de vérifier cette hypothèse.

**Tableau XLVII: Somme des rangs du test de classement 3 pour le lait démaquillant**

ECHANTILLONS	NOMBRE DE JURYS CONSIDERES	SOMME DES RANGS OBTENUS
428	61	173
532	61	181
276	61	181
153	61	178
849	61	201

La valeur de la somme des rangs obtenue par l'échantillon 123 (0,06% d'HE girofle + 006% d'HE *mandravasarotra*) est bien la valeur la plus faible, ce qui confirme l'hypothèse énoncée précédemment.

Pour déterminer les différences perçues par les jurys, les lois suivantes ont été utilisées

♣ **Loi de Page**

En appliquant la formule précédemment énoncée pour cette loi, on obtient

$$L = 2795$$

La valeur de  $la$  étant de **477**,  $L$  est donc supérieur à  $la$ , les produits sont donc perçus comme différents.

♣ **Loi de FRIEDMAN**

D'après la loi de FRIEDMAN, la valeur obtenue pour  $F$  est de

$$F = 0,60$$

Comme  $z=9,49$  ;  $F$  est inférieure à  $z$  ce qui signifie que les produits ne sont pas significativement différents. Ces résultats peuvent être confirmés par le test du plus petit écart.

♣ **Test du plus petit écart**

Ce test permet de comparer deux à deux les produits pour déterminer s'il existe une différence significative entre eux. En ayant recours aux formules relatives au test du plus petit écart, la valeur critique est la suivante:

**Tableau XLVIII: Comparaison des laits démaquillants pour le test 3 selon le Test du plus petit écart**

PRODUITS	Rang i	Rang j	Rang i-j	Valeur critique	$ R_i - R_j  = x$	Différence Significative
428 vs 849	173	201	28	49,02	$x < \delta$	Non
428 vs 532	173	181	8	49,02	$x < \delta$	Non
428 vs 276	173	181	8	49,02	$x < \delta$	Non
428 vs 153	173	178	5	49,02	$x < \delta$	Non
153 vs 849	178	201	23	49,02	$x < \delta$	Non
153 vs 532	178	181	3	49,02	$x < \delta$	Non
153 vs 276	178	181	3	49,02	$x < \delta$	Non
276 vs 849	181	201	20	49,02	$x < \delta$	Non
276 vs 532	181	181	0	49,02	$x < \delta$	Non
532 vs 849	181	201	20	49,02	$x < \delta$	Non

Ce tableau montre que les produits ne sont tous pas significativement différents entre eux. Le test de DUNCAN le confirme d'ailleurs en classant les produits dans un seul groupe comme le montre le tableau suivant.

Tableau XLIX: Résultat du test de classement 3 sur les laits démaquillants

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES
428	2,836	A
153	2,918	A
276	2,967	A
532	2,967	A
849	3,360	A

En effet, les moyennes obtenues par les échantillons se situent entre 2,836 et 3,360 ; les valeurs ne sont pas très éloignées, les jurys ont donc eu du mal à différencier les produits et d'effectuer le classement.

- *Cas des lotions*

La somme des rangs pour le test de classement 3 des lotions est présentée dans le tableau suivant :

Tableau L: Effectifs par rang du test de classement 3 pour les lotions

RANG	428	532	276	153	849
1	23	12	15	2	9
2	12	12	12	15	5
3	7	14	18	9	10
4	8	18	9	20	10
5	11	5	7	15	27
TOTAL	61	61	61	61	61

L'échantillon 428 (0,06% d'HE girofle + 0,06% d'HE *mandravasarotra*) est de loin celui qui a été classé numéro 1 par rapport aux 4 autres échantillons et est apparemment celui qui est le plus apprécié. Ce qui est d'ailleurs confirmé par le tableau suivant qui présente la somme des rangs obtenus par chacun des échantillons.

Tableau LI: Somme des rangs du test de classement 3 pour les lotions

ECHANTILLONS	NOMBRE DE JURYS CONSIDERES	SOMME DES RANGS OBTENUS
146	61	145
612	61	165
243	61	162
371	61	220
902	61	223

♣ *Loi de Page*

Afin de déterminer les différences discernées par les sujets, la loi de Page a été appliquée d'où :

$$L= 2956$$

La valeur de  $\lambda$  étant de **477**,  $L$  est donc supérieur à  $\lambda$ , les produits sont donc perçus comme différents.

✿ **Loi de FRIEDMAN**

Afin de voir si différences sont significatives, la loi de FRIEDMAN a été utilisée d'où

$$F = 33,95$$

La valeur de  $F$  est supérieure à  $z = 7,81$ , alors les produits sont significativement différents.

✿ **Test du plus petit écart**

En employant les formules relatives au test du plus petit écart, une différenciation deux à deux des produits a pu être effectuée. La valeur critique calculée est la suivante :

$$\delta = 49,02$$

Le tableau suivant montre la comparaison des échantillons :

Tableau LII: Comparaison des lotions pour le test 3 selon le Test du plus petit écart

PRODUITS	Rang i	Rang j	Rang i-j	Valeur critique	$ R_i - R_j  = x$	Différence Significative
902 vs 146	223	145	78	49,02	$x > \delta$	Oui
902 vs 243	223	162	61	49,02	$x > \delta$	Oui
902 vs 612	223	165	58	49,02	$x > \delta$	Oui
902 vs 371	223	220	3	49,02	$x < \delta$	Non
371 vs 146	220	145	75	49,02	$x > \delta$	Oui
371 vs 243	220	162	58	49,02	$x > \delta$	Oui
371 vs 612	220	165	55	49,02	$x > \delta$	Oui
612 vs 146	173	145	20	49,02	$x < \delta$	Non
612 vs 243	173	162	3	49,02	$x < \delta$	Non
243 vs 146	162	145	17	49,02	$x < \delta$	Non

Les échantillons 902 et 146 ; 902 et 243 ; 902 et 612 ainsi que les échantillons 371 et 146 ; 371 et 243 ; 371 et 612 autrement dit les 2 derniers échantillons sont perçus comme significativement différents des trois premiers ce qui a permis de classer en deux groupes distinct par le test de DUNCAN.

Tableau LIII: Résultat du test de classement 3 sur les lotions

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES	
902	3,656	A	
371	3,475	A	
612	2,836		B
243	2,656		B
146	2,377		B

Ces deux échantillons ont la même concentration d'huile essentielle de girofle et de *mandravasarotra* à un seuil de 0,12% chacun. À ce seuil donc, la synergie de ces huiles essentielles est clairement décelée par les jurys.

### 3.2.2.2. Les tests d'acceptabilité

Rappelons que le test d'acceptabilité a été effectué en sollicitant les sujets d'attribuer une note de 1 (très mauvais) à 5 (très bon). Les notations ont été faites en fonction de l'appréciation de l'odeur. Les résultats ont ensuite été convertis en valeur numérique puis traité par ANOVA à un facteur. Le test de DUNCAN effectué à un seuil de 5% a ensuite permis de regrouper les échantillons qui ne sont pas significativement différents. Les 3 types de tests suivants ont été effectués

- **Test 1** : test d'acceptabilité sur les échantillons de lait et de lotion dont le conservateur utilisé est le *mandravasarotra* incorporé à 4 concentrations différentes (tableau XII)
- **Test 2** : test d'acceptabilité sur les échantillons de lait et de lotion dont le conservateur est le girofle incorporé à 4 concentrations différentes
- **Test 3** : test d'acceptabilité sur les échantillons de lait et de lotion avec comme conservateur : girofle + *mandravasarotra* à 5 concentrations différentes.

#### a) Test d'acceptabilité 1

Le code des échantillons pour les laits démaquillants et les lotions sont représentés dans les tableaux suivants :

**Tableau LIV: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test d'acceptabilité 1 avec l'huile essentielle de *mandravasarotra***

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,12% d'HE	312
Échantillon 2 : 0,24% d'HE	527
Échantillon 3 : 0,32% d'HE	245
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	126

**Tableau LV: Code des échantillons de lotion pour le test de classement 3 avec l'huile essentielle de *mandravasarotra***

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,12% d'HE	234
Échantillon 2 : 0,24% d'HE	751
Échantillon 3 : 0,32% d'HE	410
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	531

- *Cas des laits démaquillants*

Tableau LVI: Résultats du test d'acceptabilité 1 des laits démaquillants

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES
527	3,066	A
245	3,377	A
312	3,393	A
126	4,131	A

Les moyennes varient de 3,066 à 4,131 donc de moyen à bon. On constate que les l'échantillon 126 à plus forte concentration d'huile essentielle de *mandravasarotra* et celle qui est le plus apprécié.

Les résultats des tests de classements montrent également qu'il n'existe pas de différence significative entre les échantillons.

- *Cas des lotions*

Tableau LVII: Résultats du test d'acceptabilité 2 des lotions

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES
531	3,311	A
410	3,557	A B
751	3,639	A B
234	3,820	B

Les moyennes des notes obtenues pour les quatre échantillons ne sont pas très éloignées et se situe entre moyen et bon mais l'interférence entre les groupes ne permet pas de donner une conclusion catégorique. On constate néanmoins que les sujets ont quand même fait la différence entre les concentrations extrêmes : l'échantillon 531 (0,48% d'HE de *mandravasarotra*) et 234 (0,12% d'HE). On note une légère préférence pour l'échantillon à plus forte concentration.

Si l'on se réfère aux résultats obtenus lors des tests de classement, les échantillons ont également été divisés en 2 groupes. Toutefois, pour le test de classement, le plus apprécié est celui à moindre concentration.

**b) Test d'acceptabilité 2**

Le code des échantillons pour les laits démaquillants et les lotions sont représentés dans les tableaux suivants

Tableau LVIII: Code des échantillons de lotion pour le test d'acceptabilité 2 avec l'huile essentielle de girole

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,06% d'HE	512
Échantillon 2 : 0,12% d'HE	251
Échantillon 3 : 0,24% d'HE	422
Échantillon 4 : 0,48% d'HE	347

- *Cas des laits démaquillants*

Le tableau suivant montre le regroupement des échantillons selon les moyennes obtenues lors des analyses.

Tableau LIX: Résultats du test d'acceptabilité 2 des laits démaquillants

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES	
202	3,705	A	
343	3,508	A	B
474	3,361	A	B
909	2,721		B

Les échantillons ont été répartis en deux groupes A et B. la moyenne des échantillons se situe entre mauvais et bon. Les échantillons étant présentés individuellement, les sujets préfèrent donc les produits avec une odeur légère. Vu que l'échantillon 202 à la plus faible concentration qui a obtenu la moyenne la plus élevée. D'après le tableau l'échantillon 202 et 909 (à 0,48% d'HE) sont significativement différents.

Les résultats du test de classement de ces échantillons montrent cependant qu'il n'existe pas de différence significative entre eux puisqu'ils ont tous été attribués à un seul groupe. Les échantillons les plus appréciées restent cependant ceux à plus faible concentration.

- *Cas des lotions*

Tableau LX: Résultats du test d'acceptabilité 2 des lotions

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES	
512	3,820	A	
251	3,233		B
422	3,164		B
347	2,820		B

D'après ce tableau, l'échantillon 512, celle à plus faible concentration d'huile essentielle d'huile essentielle de girofle (0,06%) est différente des 3 autres vue qu'elle a été classée dans un groupe à part. Les moyennes varient de 2,820 à 3,820 donc de moyen à bon ; les produits les plus appréciés restent toujours celles à faibles concentration d'huile essentielle.

On retrouve à peu près les résultats du test de classement l'échantillon 512 constituant un groupe à part, l'huile essentielle de girofle n'est donc tolérée qu'à faible concentration, que ce soit dans les lotions ou les laits démaquillants.

c) *Test d'acceptabilité 3*

Le code des échantillons pour les laits démaquillants et les lotions sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau LXI: Code des échantillons de lait démaquillant pour le test d'acceptabilité 3 avec l'huile essentielle de *mandravasarotra + girofle*

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,06% d'HE Girofle + 0,06% HE <i>mandravasarotra</i>	101
Échantillon 1 : 0,06% d'HE Girofle + 0,12% HE <i>mandravasarotra</i>	905
Échantillon 1 : 0,12% d'HE Girofle + 0,06% HE <i>mandravasarotra</i>	179
Échantillon 1 : 0,12% d'HE Girofle + 0,12% HE <i>mandravasarotra</i>	725
Échantillon 1 : 0,18% d'HE Girofle + 0,18% HE <i>mandravasarotra</i>	651

Tableau LXII: Code des échantillons de lotion pour le test de classement 3 avec l'huile essentielle de *mandravasarotra*

ÉCHANTILLONS	CODE
Échantillon 1 : 0,06% d'HE Girofle + 0,06% HE <i>mandravasarotra</i>	740
Échantillon 1 : 0,06% d'HE Girofle + 0,12% HE <i>mandravasarotra</i>	017
Échantillon 1 : 0,12% d'HE Girofle + 0,06% HE <i>mandravasarotra</i>	358
Échantillon 1 : 0,12% d'HE Girofle + 0,12% HE <i>mandravasarotra</i>	224
Échantillon 1 : 0,18% d'HE Girofle + 0,18% HE <i>mandravasarotra</i>	675

- *Cas des laits démaquillants*

Le tableau suivant montre le regroupement des échantillons selon les moyennes obtenues lors des analyses.

Tableau LXIII: Résultats du test d'acceptabilité 3 des laits démaquillants

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES	
101	2,738	A	
905	2,885	A	B
651	3,098	A	B
179	3,230		B
725	3,295		B

La valeur des moyennes obtenues se situe entre 2,738 et 3,295 et donc l'appréciation des produits est donc moyenne. L'échantillon 179 (12% d'HE Girofle + 0,06% HE *Mandravasarotra*)

est celui qui a obtenu la moyenne la plus élevée donc est celui le plus apprécié mais vu que les moyennes des notes obtenues sont très proches, les sujets n'ont pas cernés de grande différence entre l'odeur des échantillons.

Ces résultats ne confirment cependant pas les tests de classement dont la différence entre les produits n'est pas du tout significative, ces derniers ont été d'ailleurs classés en un seul groupe.

- ***Cas des lotions***

**Tableau LXIV: Résultats du test d'acceptabilité 3 des lotions**

MODALITÉ	MOYENNE ESTIMÉE	GROUPES		
017	2,738	A		
675	3,098	A	B	
224	3,197		B	
358	3,279		B	
740	3,754			C

Le test de DUNCAN a permis de classer les échantillons en 3 groupes, l'échantillon 740 (0,06% d'HE Girofle + 0,06% HE *mandravasarotra*) formant un groupe à part. En effet la majorité des jurys ont stipulé aimer les odeurs légères et douces.

Les résultats de ce test d'acceptabilité ne sont pas en accord avec les résultats du test de classement de ces mêmes échantillons où les échantillons sont seulement classés en deux groupes. Toutefois l'échantillon le plus apprécié reste celui à plus faible concentration.

**3.2.2.3. Discussions sur les analyses hédoniques**

Les résultats des analyses hédoniques ne sont généralement pas homogènes, vu que celles qui sont préférées en test de classement ne correspondent pas obligatoirement à celles qui ont obtenu des moyennes élevées en test d'acceptabilité.

La majorité des sujets ont précisé préférer des odeurs légères à des odeurs plus piquantes comme celle du girofle et ont pourtant attribué des notes supérieures aux produits à concentrations élevée et inversement. Cela peut probablement s'expliquer par le fait que les produits à classer sont au nombre de 4 et même 5 pour les mélanges d'huiles essentielles, la « fatigue sensorielle » apparaît assez vite chez les sujets, ce qui peut influer leur jugement.

D'autre part, pour les tests d'acceptabilité, les sujets ont souvent du mal à discerner la différence entre les odeurs, ce qui est peut-être du au fait que ce soit des sujets naïfs.

Le choix des échantillons pour les tests microbiologiques se sont faits à la fois en fonction du classement des huiles essentielles par les jurys, en tenant compte de l'absence de différences significatives entre les échantillons mais également en fonction de la tenue de ces derniers en vieillissement accéléré par l'intermédiaire du test de stabilité à l'étuve à 45°C.

### 3.3. Résultats des tests de stabilité à l'étuve.

Les tests de stabilités des échantillons avec les trois types de conservateurs testés (HE de girofle, HE de *mandravasarotra*, et HE girofle + *mandravasarotra*) se sont fait parallèlement avec un échantillon témoin qui contient les conservateurs actuellement utilisés dans les produits auxquels n'ont pas été ajoutés des additifs antioxydants.

Ces tests de vieillissement accéléré ont été effectués pendant une période de 60 jours à l'étuve réglée à 45°C et évalué selon les paramètres suivants : texture, couleur et odeur.

Au début du test les caractéristiques des laits démaquillants et des lotions sont les présentées dans le tableau suivant :

**Tableau LXV: Caractéristiques des produits pour le test de stabilité à l'étuve**

PRODUIT	TEXTURE	COULEUR	ODEUR
Lait démaquillant	Visqueuse	Jaune clair	Odeur caractéristique de l'huile essentielle de girofle
Lotion	Fluide	Jaune clair	Odeur caractéristique de l'huile essentielle de girofle

#### 3.3.1. Conservateur utilisé : huile essentielle de *mandravasarotra*

##### 3.3.1.1. Cas du lait démaquillant

Le tableau LXVI représente les résultats du test de vieillissement du lait démaquillant aux différentes concentrations d'huile essentielle de *mandravasarotra* ainsi que d'un échantillon témoin.

**Tableau LXVI: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des laits démaquillants pour l'huile essentielle de *mandravasarotra***

ECHANTILLON	TEXTURE	ODEUR	COULEUR
Échantillon 1 : témoin	J=49 jours: séparation de phase du produit	J=21 jours: Apparition d'odeur rance	J=22 jours : éclaircissement de la couleur J= 24 jours : dépôts jaunâtres sur les parois du flacon À J= 26 jours: couleur blanc laiteux
Échantillon 2 : 0,18% d'HE	J= 39 jours : texture très fluide J=51 jours: séparation de phase du produit	J=20 jours: Apparition d'odeur rance	J= 39 jours: éclaircissement de la couleur

Échantillon 3 : 0,24% d'HE	J=44 jours : texture très fluide J=40 jours: séparation de phase du produit	J= 25 jours: Apparition d'odeur rance	J= 39 jours: éclaircissement de la couleur
Échantillon 4 : 0,32% d'HE	À J=39 jours : texture très fluide J=39 jours: séparation de phase du produit	J=25 jours: Apparition d'odeur rance	J= 39 jours: éclaircissement de la couleur
Échantillon 5: 0,48% d'HE	À J=8 jours : texture très fluide J=9 jours: séparation de phase du produit	J=28 jours: Apparition d'odeur rance	J= 9 jours: jaune foncé au fond du flacon et plus clair à la surface (rupture de phase)

On constate d'après ce tableau que plus la concentration en huiles essentielles est élevée dans le lait, plus vite sa texture est modifiée. Si dans les échantillons à 0,18% d'H.E. la séparation de la phase grasse et la phase aqueuse n'apparaît qu'après 51 jours du début du test, la séparation des phases apparaît dès le 9<sup>ème</sup> jour pour les échantillons à 048% d'huile essentielle ; celui du témoin apparaissant au bout de 49 jours. Le comportement rhéologique de toutes les compositions est d'ailleurs influencé par la température et le principe actif utilisé. Par ailleurs, à mesure que l'on augmente la concentration d'huiles essentielles, le lait se fluidifie plus rapidement. En effet, l'augmentation de la température évoque une décroissance importante de la viscosité apparente des compositions, ou de leur consistance. [33].

D'autre part, on note l'apparition d'odeur rance pour tous les échantillons pendant la durée du test. Si pour le témoin cette odeur apparaît au bout de 21 jours (rappelons que le témoin ne contient pas d'antioxydant), elle apparaît au bout de 20 jours pour l'échantillon 2, et même à 28 jours pour l'échantillon à 0,48% d'huiles essentielles. Il en résulte donc que cette huile essentielle ne saurait être utilisée seule sans antioxydant.

On observe également que la couleur du produit s'éclaircit à mesure que le temps passe. On suppose que ce phénomène est le résultat des réactions chimiques survenant sur le produit par action de la température.

### 3.3.1.2. Cas des lotions

Les résultats du test de stabilité pour les lotions avec l'HE *mandravasarotra* sont présentés dans le tableau qui suit :

**Tableau LXVII: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des lotions pour l'huile essentielle de *mandravasarotra***

ECHANTILLON	TEXTURE	ODEUR	COULEUR
Échantillon 1 : témoin	J=39 jours: séparation de phase du produit	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 1jours Couleur jaune plus opaque À J= 30 jours : apparition de troubles blanchâtres

Échantillon 2 : 0,18% d'HE	J=13 jours: Texture plus consistante	Intensité de l'odeur décroît progressivement au cours de l'étude	J= 4 jours: Couleur jaune plus opaque
Échantillon 3 : 0,24% d'HE	J=8 jours: Texture plus consistante J=9 jours: séparation de phase	Intensité de l'odeur décroît progressivement au cours de l'étude	J= 4 jours : Couleur jaune plus opaque au fond et de plus en plus clair à la surface
Échantillon 4 : 0,32% d'HE	J=3 jours: séparation de phase	Intensité de l'odeur décroît progressivement au cours de l'étude	J= 4 jours : Couleur jaune plus opaque au fond et de plus en plus clair à la surface
Échantillon 5: 0,48% d'HE	À J=2 jours: séparation de phase	Intensité de l'odeur décroît progressivement au cours de l'étude	J= 1 jour : Couleur jaune plus opaque au fond et de plus en plus clair à la surface

On constate très vite une modification de la texture pour les lotions contenant l'huile essentielle de *mandravasarotra* comme conservateur. Si une rupture de phase est observée chez le témoin après 39 jours, elle apparaît après 13 jours chez l'échantillon 1 à 0,18% d'huile essentielle une durée qui décroît à mesure que la concentration d'huile essentielle augmente. On en déduit donc que plus la concentration en huile essentielle est élevée, moins les lotions sont stables.

Par contre, on ne constate pas un changement notable au niveau de l'odeur, même si son intensité décroît progressivement au cours du test. Et puisque les lotions contiennent une quantité très infime d'huile, on ne note pas l'apparition d'odeur rance dans le produit.

Par ailleurs, la couleur des échantillons devient rapidement opaque dès leur mise en étuve. Ceci est vraisemblablement dû aux principes actifs présents dans le produit et n'est aucunement dû à l'huile essentielle utilisée vu que l'on a effectué des tests de vieillissement sur des lotions ne contenant aucun conservateur suivant les mêmes conditions, et les résultats obtenus sont exactement les mêmes: la couleur des échantillons devient plus opaque dès leur entrée en étuve.

### 3.3.2. Conservateur utilisé : huile essentielle de girofle

#### 3.3.2.1. Cas du lait démaquillant

Les modifications observées au cours de l'étude sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau LXVIII: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des laits démaquillants pour l'huile essentielle de clou de girofle

ECHANTILLON	TEXTURE	ODEUR	COULEUR
Échantillon 1 : témoin	J=49jours : séparation de phase du produit	À J=21jours : Apparition d'odeur rance	À J=22 jours : éclaircissement de la couleur J= 24jours : dépôts jaunâtres sur les parois du flacon À J= 26jours : couleur blanc laiteux
Échantillon 2 : 0,06% d'HE	À J=44jours : texture très fluide J=49 : séparation de phase du produit	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 49jours : dépôts jaunâtres sur les parois du flacon
Échantillon 3 : 0,12% d'HE	À J=40jours : texture très fluide J=49jours : séparation de phase du produit	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 44jours : dépôts jaunâtres sur les parois du flacon
Échantillon 4 : 0,24% d'HE	À J=40jours : texture très fluide J=44jours : séparation de phase du produit	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 40jours : dépôts jaunâtres sur les parois du flacon
Échantillon 5: 0,48% d'HE	J=2jours : texture très fluide J=3jours : séparation de phase du produit	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 2jours : dépôts jaunâtres sous forme de plaque à la surface du produit et sur les parois du flacon

Les séparations des phases grasses et aqueuses apparaissent, pour les échantillons 1 et 2, au bout de 49 jours ; la même que celle du témoin. Par contre, à partir de 0,24% ce phénomène survient après 44 jours et il a lieu même au bout de 3 jours de test pour les échantillons à 0,48%. On en tire la même conclusion que précédemment, plus la concentration en huile essentielle est élevée, plus vite la séparation de phase a lieu.

Au niveau de l'odeur on n'observe aucun changement notable et aucune apparition d'odeur rance dans aucun des échantillons, l'huile essentielle de clou de girofle est donc un excellent antioxydant.

Pour ce qui est de l'apparition des dépôts jaunâtres sur les parois des flacons, elles correspondent aux dépôts de la phase huileuse du produit qui survient généralement juste avant la rupture des phases.

### 3.3.2.2. Cas de la lotion

Tableau LXIX: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des lotions pour l'huile essentielle de clou de girofle

ECHANTILLON	TEXTURE	ODEUR	COULEUR
Échantillon 1 : témoin	J=39 jours: séparation de phase du produit	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 1 jour : Couleur jaune plus opaque À J= 30 jours: apparition de troubles blanchâtres
Échantillon 2 : 0,06% d'HE	À J=44 jours: séparation de phase	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 1 jour : Couleur jaune plus opaque À J= 44 jours: apparition de troubles blanchâtres
Échantillon 3 : 0,12% d'HE	À J=26 jours: séparation de phase	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 1 jour : Couleur jaune plus opaque À J= 15 jours: apparition de troubles blanchâtres
Échantillon 4 : 0,24% d'HE	À J=22 jours: séparation de phase	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 1 jour : Couleur jaune plus opaque À J= 13 jours: apparition de troubles blanchâtres
Échantillon 5: 0,48% d'HE	À J=22 jours: séparation de phase	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 1 jour : Couleur jaune plus opaque À J= 13 jours: apparition de troubles blanchâtres

Si on constate une rupture de phase des produits qui survient plus vite à mesure que la concentration en huile essentielle de girofle augmente, elle est moins rapide par rapport aux lotions contenant le *mandravasarotra*. L'échantillon 2 est celui qui a été stable le plus longtemps.

De même que pour les échantillons testés avec l'huile essentielle de *mandravasarotra*, la couleur des échantillons à girofle devient rapidement opaque dès leur mise en étuve. Cela est donc ainsi à la composition des produits et non au conservateur testé vu que les produits sont conservateurs ont subi les mêmes changements.

### 3.3.3. Conservateur utilisé : huile essentielle de girofle + *mandravasarotra*

#### 3.3.3.1. Cas du lait démaquillant

Tableau LXX: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des laits démaquillants pour l'huile essentielle de clou de girofle + *mandravasarotra*

ECHANTILLON	TEXTURE	ODEUR	COULEUR
Échantillon 1 : témoin	J=49 jours: séparation de phase du produit	À J=21 jours: Apparition d'odeur rance	À J=22 jours : éclaircissement de la couleur J= 24 jours : dépôts jaunâtres sur les parois du flacon À J= 26 jours: couleur blanc laiteux
Échantillon 2 : 0,06% d'HE girofle + 0,06% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=44 jours : texture très fluide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude
Échantillon 3 : 0,06% d'HE girofle + 0,12% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=44 jours : texture très fluide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude
Échantillon 4 : 0,12% d'HE girofle + 0,06% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=44 jours : texture très fluide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude
Échantillon 5: 0,12% d'HE girofle + 0,12% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=44 jours : texture très fluide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude
Échantillon 6: 0,18% d'HE girofle + 0,18% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=40 jours : texture très fluide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude

On constate que la rupture des phases de ces échantillons s'est produite simultanément, sauf pour l'échantillon 6 ayant la concentration la plus élevée. Pour ce qui est des autres critères (odeur et couleur), aucun changement notable n'a été observé au cours des 60 jours d'étude.

Puisque les produits qui ont atteint une concentration de 0,48% pour les huiles essentielles de *mandravasarotra* et de girofle testés séparément ont eu du mal à rester stable longtemps, cette valeur n'a plus été atteinte pour le test du mélange de ces huiles essentielles comme conservateur.

Le mélange de ces deux huile essentielle semble donc être antioxydant du à la présence d'huile essentielle de clou de girofle qui a fait ses preuves lorsqu'il a été testé seul dans les laits démaquillants.

### 3.3.3.2. Cas des lotions

Tableau LXXI: Résultats du test de vieillissement accéléré à 45°C des lotions pour l'huile essentielle de clou de girofle + *mandravasarotra*

ECHANTILLON	TEXTURE	ODEUR	COULEUR
Échantillon 1 : témoin	J=39jours : séparation de phase du produit	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 1jour Couleur jaune plus opaque À J= 30jours : apparition de troubles blanchâtres
Échantillon 2 : 0,06% d'HE girofle + 0,06% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=44jours : produit très limpide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 2jours : Couleur jaune plus opaque
Échantillon 3 : 0,06% d'HE girofle + 0,12% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=44jours : produit très limpide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 2jours : Couleur jaune plus opaque
Échantillon 4 : 0,12% d'HE girofle + 0,06% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=44jours : produit très limpide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	J= 2jours : Couleur jaune plus opaque
Échantillon 5: 0,12% d'HE girofle + 0,12% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=44jours : produit très limpide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude
Échantillon 6: 0,18% d'HE girofle + 0,18% d'HE <i>mandravasarotra</i>	À J=44jours : produit très limpide	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude	Aucun changement notable pendant la durée de l'étude

On constate comme pour les laits démaquillants que la rupture des phases de ces échantillons. Pour ce qui est des autres critères (odeur et couleur), aucun changement notable n'a été observé au cours des 60 jours d'étude.

### 3.3.4. Discussions sur les tests de stabilité

D'une manière générale pour les deux types de produits, plus la concentration en huile essentielle est élevée, plus le produit devient rapidement instable et subit une rupture de sa phase

aqueuse et de sa phase lipidique. Plus la quantité en huile essentielle est élevée, plus le produit devient rapidement fluide et change de texture.

Pour les concentrations à 0,48% d'huile essentielle de *mandravasarotra*, on a remarqué que les produits sont rapidement sujets à une séparation de phase : au bout de 2 et 3 jours respectivement pour le lait et la lotion. De même pour les échantillons à girofle dont la texture n'a tenue que 3 jours à une concentration de 0,48% pour les laits démaquillant. Cette valeur n'a donc plus été atteinte pour la composition des mélanges des 2 huiles essentielles.

Pendant, les études de stabilité, on n'a constaté également aucune apparition d'odeur rance pour les échantillons contenant l'huile essentielle de girofle ; ce sont donc ces échantillons qui ont été choisis pour les tests microbiologiques en fonction des résultats des analyses sensorielles. Ainsi, l'huile essentielle de girofle a d'excellentes propriétés antioxydantes.

### 3.4. Résultats du « challenge test »

Vu que l'huile essentielle de *mandravasarotra* n'est pas un très bon antioxydant, il n'a pas été très rentable de réaliser le test d'efficacité microbien sur les échantillons contenant uniquement cette huile essentielle comme conservateur.

Compte tenu des résultats des analyses sensorielles combinées au test de stabilité, les échantillons suivants ont été soumis au «challenge test» :

Tableau LXXII: Présentation des produits soumis au «challenge test».

Conservateur utilisé	Produit testé	Concentration
Huile essentielle de girofle	Lait démaquillant	0,24%
	Lotion	0,12%
Huile essentielle de girofle + <i>mandravasarotra</i>	Lait démaquillant	0,18% + 0,18%
	Lotion	0,12% + 0,06%

#### 3.4.1. Résultat du « challenge test» sur l'huile essentielle de clou de girofle

Rappelons que les tests microbiologiques ont été effectués sur les 2 souches de microbes : *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

##### 3.4.1.1. Résultats sur les souches de *Staphylococcus aureus*

La suspension microbienne a été inoculée dans le produit en respectant le fait que le volume de l'inoculum ne doit pas dépasser 1% du volume du produit. Après avoir bien secoué le produit dans un flacon dans le but de répartir les microorganismes, le produit ensemencé a été réparti dans 6 tubes fermés hermétiquement afin de pouvoir effectuer les lectures à T=0jour ; T=2jours, T=7jours, T=14jours, T=28jours et le dernier tube ayant servi de réserve.

Rappelons que le critère d'appréciation de l'efficacité des conservateurs lorsqu'il s'agit de bactéries est une réduction de 2log en 48h de la population initiale et pas d'augmentation ultérieure.

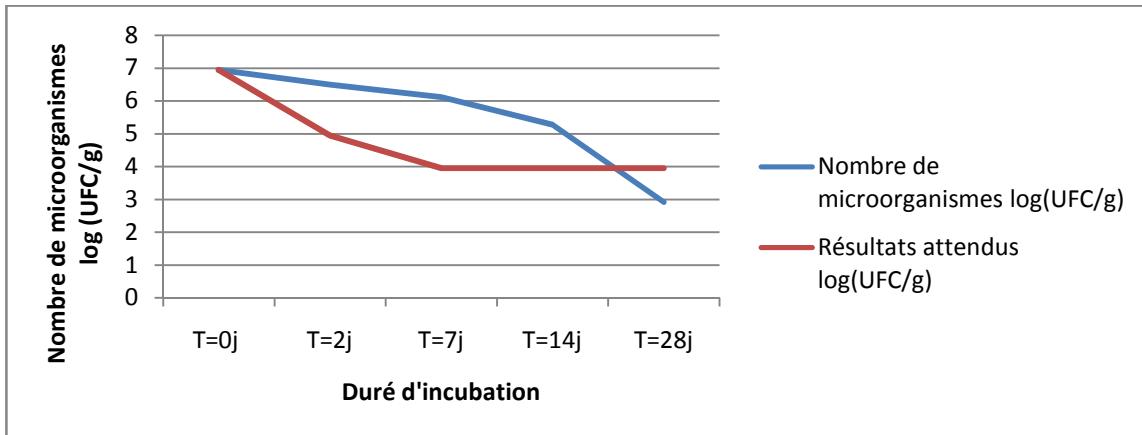
Les résultats des dénombrements de la population microbienne effectués après toutes les périodes précitées, ainsi que les résultats attendus par la norme européenne sont présentés dans les tableaux suivants.

- **Cas du lait démaquillant**

**Tableau LXXIII: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur *S. aureus* : cas du lait démaquillant**

	<b>T=0j</b>	<b>T=2j</b>	<b>T=7j</b>	<b>T=14j</b>	<b>T=28j</b>
<b>Nombre de microorganismes (UFC/g)</b>	$8,83 \times 10^6$	$3,15 \times 10^6$	$1,31 \times 10^6$	$1,90 \times 10^5$	$8,27 \times 10^2$
<b>Résultats attendus selon la norme (UFC/g)</b>	$8,83 \times 10^6$	$8,83 \times 10^4$	$8,83 \times 10^3$	-	-

Le graphe présentant la comparaison entre l'évolution de la population de *S. aureus* est présenté ci-après :



**Figure 8: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur *S. aureus* : cas du lait démaquillant**

Le nombre de microbes présent après 2 jours d'occupation est bien loin des valeurs attendues par la norme qui est  $10^2$  fois plus élevée. Et même si la population de *S. aureus* décroît en fonction du temps, les résultats obtenus sont loin de satisfaire les normes l'huile essentielle de girofle à une concentration de 0,24% dans les laits démaquillant n'est donc pas efficace contre *S. aureus*.

- **Cas de la lotion**

**Tableau LXXIV: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur *S. aureus* : cas de la lotion**

	<b>T=0j</b>	<b>T=2j</b>	<b>T=7j</b>	<b>T=14j</b>	<b>T=28j</b>
<b>Nombre de microorganismes (UFC/g)</b>	$5,36 \times 10^6$	$1,81 \times 10^6$	$3,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$3,00 \times 10^2$
<b>Résultats attendus selon la norme (UFC/g)</b>	$5,36 \times 10^6$	$5,36 \times 10^4$	$5,36 \times 10^3$	-	-

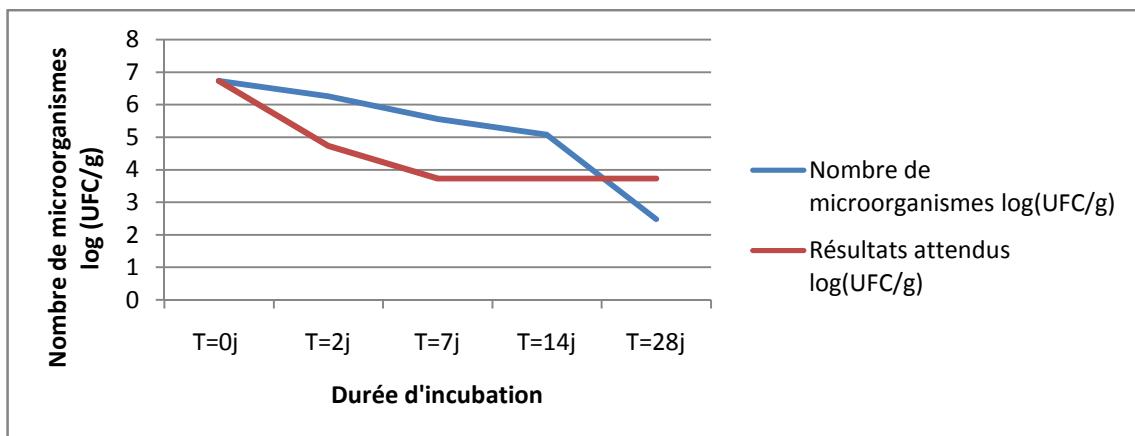


Figure 9: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur *S. aureus* : cas de la lotion

On peut en déduire d'après ce graphe que l'huile essentielle de girofle ne peut être qualifiée d'efficace contre *S. aureus* dans les lotions à une concentration de 0,12%. En effet 2 jours après l'ensemencement, l'effectif population s'élève encore à  $1,81 \times 10^6$  UFC/g alors qu'il aurait dû descendre à  $5,36 \times 10^4$ .

#### 3.4.1.2. Résultats sur les souches de *Candida albicans*

Le critère d'appréciation de l'efficacité des conservateurs lorsqu'il s'agit des fungis est une réduction de 2log en 14j de la population initiale et pas d'augmentation ultérieure.

Les tableaux suivants montrent l'évolution des populations de *Candida albicans* ensemencé dans les laits démaquillants et les lotions.

##### - Cas du lait démaquillant

Tableau LXXV: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur *C. albicans* : cas du lait démaquillant

	T=0j	T=2j	T=7j	T=14j	T=28j
Nombre de microorganismes (UFC/g)	$2,72 \times 10^6$	$3,63 \times 10^4$	9,09	9,09	0
Résultats attendus selon la norme (UFC/g)	$2,72 \times 10^6$			$2,72 \times 10^4$	-

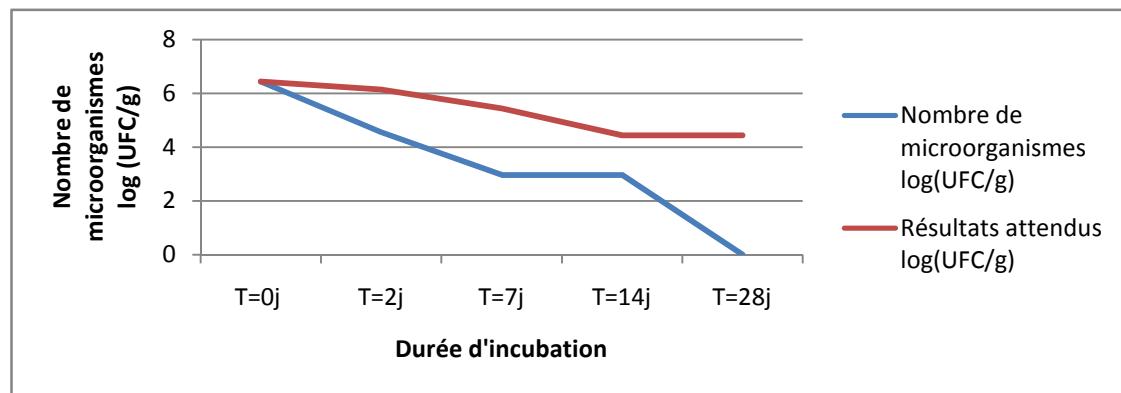


Figure 10: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur *C. albicans* : cas du lait démaquillant

On constate que par rapport aux résultats attendus après 14 jours d'incubation, la population de *C. albicans* a bel et bien diminué et se trouve en dessous du seuil stipulé par la norme. L'huile essentielle de clou de girofle est donc efficace contre *C. albicans* à une concentration de 0,24% dans le lait démaquillant.

- **Cas de la lotion**

Tableau LXXVI: Tableau LXXI: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur *C. albicans* : cas de la lotion

	<b>T=0j</b>	<b>T=2j</b>	<b>T=7j</b>	<b>T=14j</b>	<b>T=28j</b>
<b>Nombre de microorganismes (UFC/g)</b>	$1,81 \times 10^6$	$1,81 \times 10^3$	9,09	0	0
<b>Résultats attendus selon la norme (UFC/g)</b>	$1,81 \times 10^6$			$1,81 \times 10^4$	-

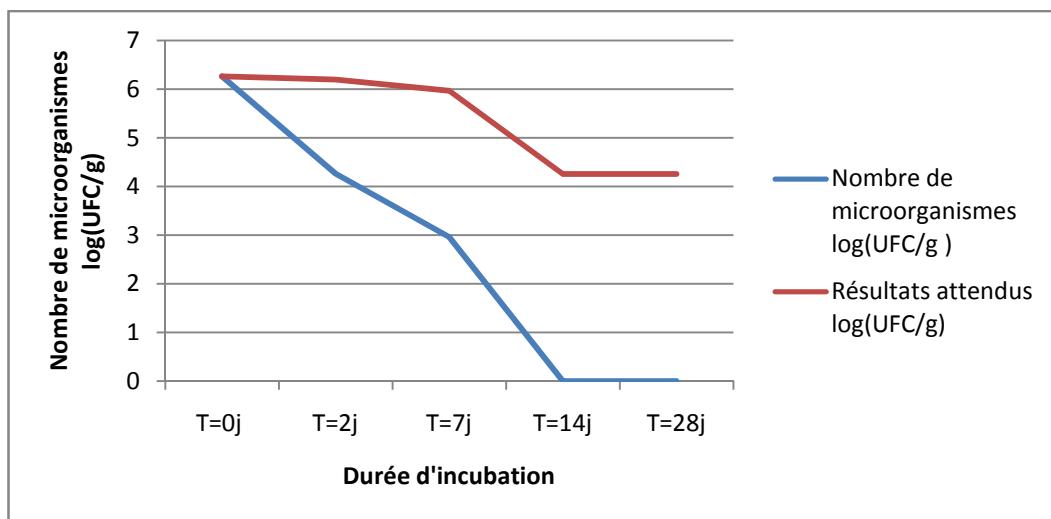


Figure 11: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle sur *C. albicans* : cas de la lotion

Le conservateur a été aussi efficace pour le cas des lotions à 0,12% d'huile essentielle de clou de girofle.

### 3.4.2. Résultats du «challenge test» sur l'huile essentielle de clou de girofle + *mandravasarotra*

#### 3.4.2.1. Résultats sur les souches de *Staphylococcus aureus*

Les résultats de l'activité de l'association de l'huile essentielle de girofle et de *mandravasarotra* sur *S.aureus* et *C. albicans* ensemencés dans les produits testés sont présentés ci-après :

- *Cas du lait démaquillant*

Tableau LXXVII: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + *mandravasarotra* sur *S. aureus* : cas du lait démaquillant

	<b>T=0j</b>	<b>T=2j</b>	<b>T=7j</b>	<b>T=14j</b>	<b>T=28j</b>
<b>Nombre de microorganismes (UFC/g)</b>	$2,77 \times 10^7$	$2,23 \times 10^6$	$5,81 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$6,36 \times 10^4$
<b>Résultats attendus selon la norme (UFC/g)</b>	$2,77 \times 10^7$	$2,77 \times 10^5$	$2,77 \times 10^4$	-	-

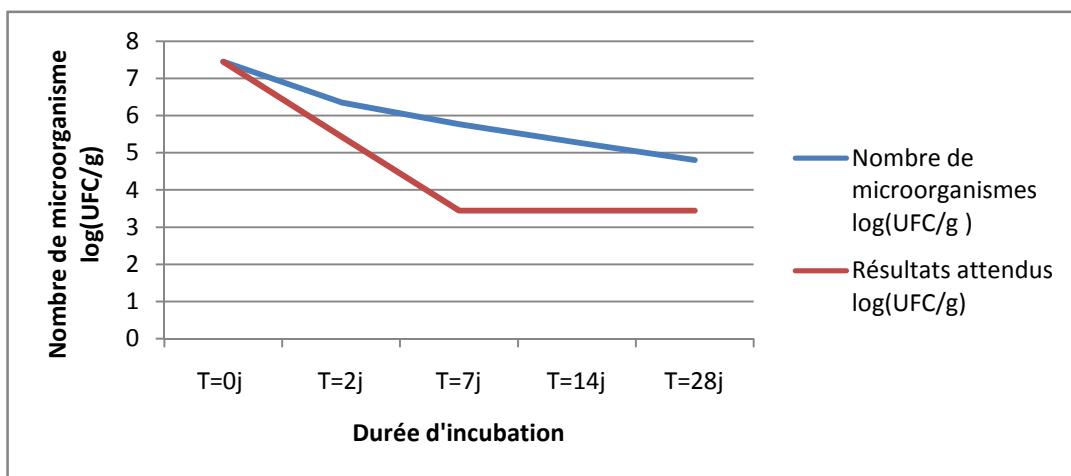


Figure 12: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + *mandravasarotra* sur *S. aureus* : cas du lait démaquillant

L'association des huiles essentielles de clou de girofle et de *mandravasarotra* de concentrations respectives 0,18% et 0,18% n'a pas non plus été efficace dans les laits démaquillants, car la population de *S.aureus* après 2 jours du début du test est de  $2,23 \times 10^6$  UFC/g alors qu'elle ne devrait pas dépasser  $2,77 \times 10^5$  UFC/g.

- *Cas des lotions*

Tableau LXXVIII: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + *mandravasarotra* sur *S. aureus*: cas de la lotion

	<b>T=0j</b>	<b>T=2j</b>	<b>T=7j</b>	<b>T=14j</b>	<b>T=28j</b>
<b>Nombre de microorganismes (UFC/g)</b>	$1,02 \times 10^8$	$8,17 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,23 \times 10^5$	$1,27 \times 10^4$
<b>Résultats attendus selon la norme (UFC/g)</b>	$1,02 \times 10^8$	$1,02 \times 10^6$	$1,02 \times 10^5$		

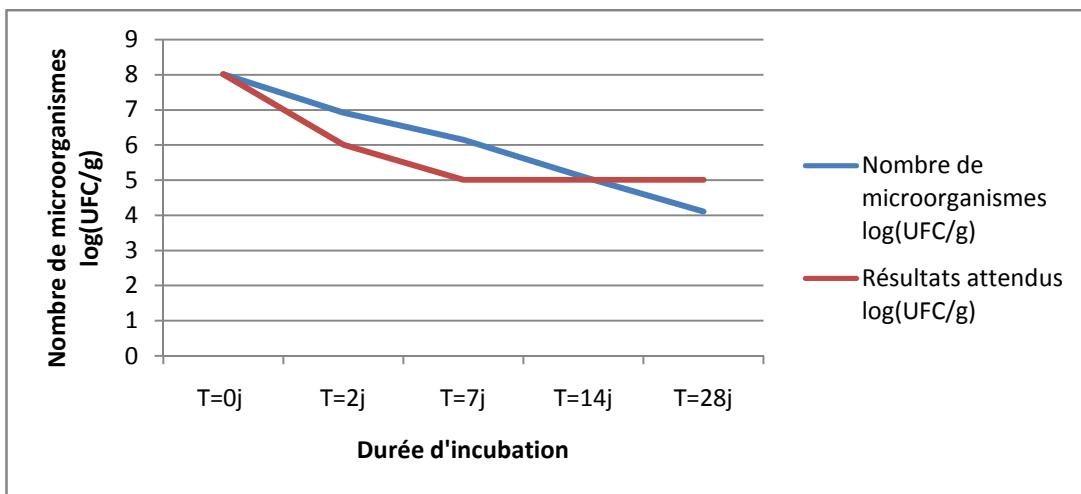


Figure 13: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + *mandravasarotra* sur *S. aureus* : cas de la lotion

De même que pour les échantillons de laits démaquillants, la population d *S. aureus* après 2 jours d'incubation a une valeur très élevée qui est très loin du seuil stipulé par la norme européenne. L'association des 2 huiles essentielles ne sont donc pas efficaces sur *S.aureus* à la concentration de 0,12% d'HE de girofle et 0,06% d'HE de *mandravasarotra*.

#### 3.4.2.2. Résultats sur les souches de *Candida albicans*

##### - Cas du lait démaquillant

Tableau LXXIX: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + *mandravasarotra* sur *C. albicans* : cas du lait démaquillant

	T=0j	T=2j	T=7j	T=14j	T=28j
Nombre de microorganismes (UFC/g)	$7,45 \times 10^5$	$8,45 \times 10^4$	$3,63 \times 10^3$	9,09	0
Résultats attendus selon la norme (UFC/g)	$7,45 \times 10^5$			$7,45 \times 10^3$	-

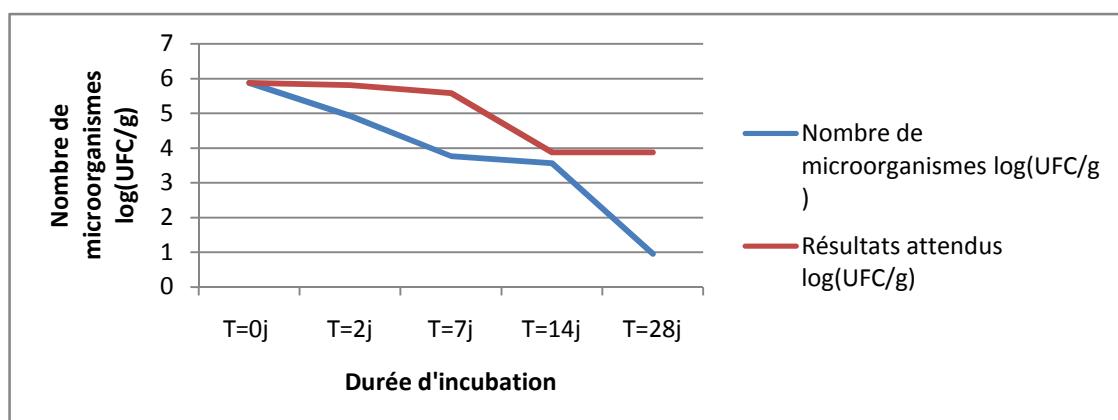


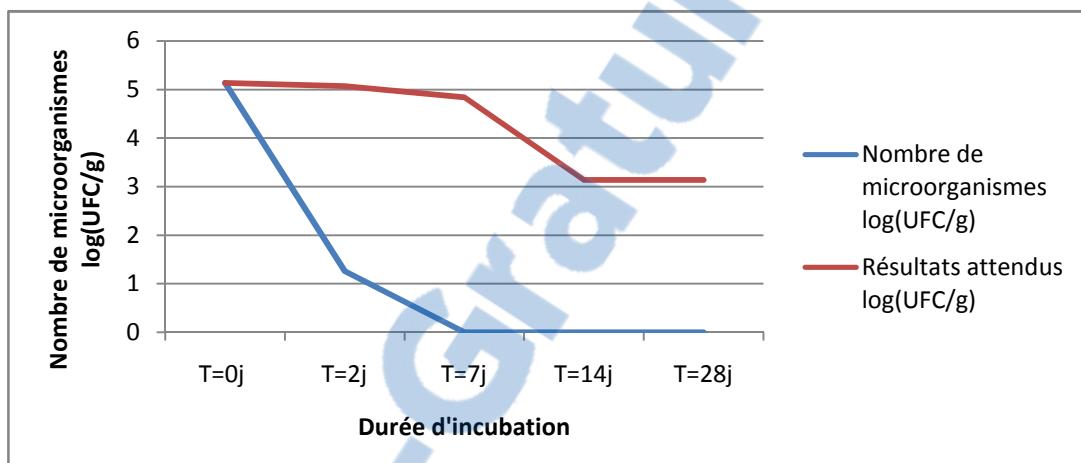
Figure 14: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + *mandravasarotra* sur *C. albicans* : cas de la lotion

On peut dire qu'ici le conservateur a été efficace sur *C. albicans* car si la valeur stipulée par la norme est de  $7,45 \times 10^3$  UFC/g après 14 jours d'incubation, la valeur obtenue a été de 9,09 UFC/g.

- **Cas de la lotion**

**Tableau LXXX: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + *mandravasarotra* sur *C. albicans* : cas de la lotion**

	<b>T=0j</b>	<b>T=2j</b>	<b>T=7j</b>	<b>T=14j</b>	<b>T=28j</b>
<b>Nombre de microorganismes (UFC/g)</b>	$1,36 \times 10^5$	18,18	0	0	0
<b>Résultats attendus selon la norme (UFC/g)</b>	$1,36 \times 10^5$			$1,36 \times 10^3$	



**Figure 15: Résultat du «challenge test» de l'huile essentielle de girofle + *mandravasarotra* sur *C. albicans* : cas de la lotion**

Le mélange des huiles essentielles a donc été efficace sur les lotions vu qu'on a remarqué une diminution notable de la population initiale et aucune augmentation ultérieure pendant le test d'efficacité microbien.

### 3.4.3. Discussions sur les résultats du «challenge test»

D'une manière générale, la population de microorganismes a diminuée dans tous les cas : que ce soit avec l'huile essentielle de girofle ou mélangée avec l'huile essentielle de *mandravasarotra*.

Toutefois, on constate avec les souches de *Staphylococcus aureus* que même si la population initiale a été réduite au cours du temps, les normes de la pharmacopée européenne sont loin d'être satisfaites vu qu'elle envisageait une diminution de 2log par rapport à la population initiale. A une concentration de 0,24% dans les laits et 0,12% dans les lotions, l'huile essentielle de girofle à elle seule n'est pas efficace pour éliminer ces bactéries. De même pour l'association de l'huile essentielle de clou de girofle et de *mandravasarotra* à des concentrations respectives de 0,18% + 0,18% et 0,12% + 0,06% dans les laits et lotions.

Vis-à-vis des souches de *Candida albicans* par contre, les résultats obtenus sont satisfaisantes pour l'huile essentielle de girofle utilisée seule ou en association avec le

*mandravasaratra*. En effet si la norme exige une diminution de 2log en 14jours et pas d'augmentation ultérieure, les résultats obtenus sont en dessous de valeurs attendues.

Par rapport à la composition de ces huiles essentielles, elles contiennent en effet les composantes antibactériennes mentionnées par la littérature. Toutefois, puisque le seuil maximal des CMI et des CMB n'ont pas pu être atteint en raison de l'instabilité des produits cosmétiques à une concentration élevée d'huile essentielle et que ces huiles essentielles contiennent certains composants allergènes comme l'eugénol, le limonène et le linalol (annexe n°10), augmenter la concentration au-delà de celles qui ont déjà été testées constituerait un risque pour le consommateur vu que ces produits sont destinés à être en contact avec la peau. D'autant plus que les moyennes obtenues pendant les tests d'acceptabilité des analyses sensorielles sur les produits ne se situent pas entre assez agréable et agréable. Du point de vue microbiologique, une augmentation des concentrations serait recommandée mais par rapport aux résultats du test de vieillissement à l'étuve, plus la concentration est élevée, plus vite les produits subissent une séparation de phase.

### 3.5. Résultats des enquêtes sociodémographiques (détails cf annexe VII)

72 personnes ont été soumises aux questionnaires d'enquête dont 22% sont des hommes et 78% des femmes. Tous ont déclaré utiliser des cosmétiques et 71% des individus enquêtés affirment vérifier la composition de leurs produits.

En ce qui concerne les cosmétiques naturels, 75% avouent porter un intérêt pour ces produits par raison de sécurité, par peur des effets secondaires que peuvent engendrer les produits de synthèse ou par souci pour l'environnement.

Vu que les produits « sans parabène » sont très prisés depuis la lancée des produits « bio », le sondage sur la connaissance des consommateurs malgaches inclus dans le questionnaire des produits « sans parabène » a montré que 47% n'en ont jamais entendu parler et parmi ceux qui en ont été informés, 43% en ont déjà utilisé.

Parmi les individus enquêtés, 54% seraient intéressés par les produits contenant des conservateurs naturels dont 75% seraient près à augmenter leur budget d'achat pour ces produits cosmétiques. En effet, certains estiment que ces produits leur feront sentir en sécurité et diminueraient le risque de cancer de la peau.

### 3.6. Recommandations

Depuis l'expansion du mouvement « cosmétique bio » et depuis l'apparition des controverses sur le parabène, la sécurité d'emploi des produits est devenu une priorité pour les consommateurs de produits cosmétiques dans le monde. Même si le phénomène n'a pas encore provoqué le même engouement à Madagascar, certains consommateurs utilisent des produits sans parabène pour garantir leur sécurité.

Dans cette approche il est vraiment nécessaire de continuer des études approfondies sur les conservateurs qui seraient efficaces et standards pour différents types de produits cosmétiques. Du

point de vu microbiologique, augmenter les concentrations en huiles essentielles éliminerait les microorganismes plus rapidement, seulement, ces derniers auront du mal à se conserver longtemps étant donné que les résultats plus haut montrent que plus la concentration est élevée, moins le produit est stable. Si cette étude n'a donc porté que sur l'efficacité des huiles essentielles en tant que conservateur, il serait judicieux d'explorer d'autres voies comme des extraits de plantes ayant des propriétés microbiologiques.

Au niveau de la production des produits, le respect des BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) serait le premier atout pour garantir l'obtention de produits cosmétiques sains et dépourvus de microorganismes. Il est donc nécessaire de maîtriser les points critiques dans la fabrication afin de garantir la qualité des produits. Mais en amont, des techniques de contrôles microbiologiques sont à conseiller pour vérifier si les taux de conservateurs incorporés dans les produits sont suffisants pour garantir son innocuité pendant un temps précis. Il est donc conseillé de mettre au point la technique du challenge test et l'appliquer aux différents produits cosmétiques pour déterminer réellement leur véritable efficacité.

D'autre part, les tests de vieillissement accéléré à l'étuve permettent de déceler rapidement la dégradation du produit. Ces tests devraient donc être systématique dans le volet « recherches et développement » afin de déterminer la DLUO exacte des produits cosmétiques. Toutefois, malgré des normes internes établies par certains laboratoires comme quoi 30 jours à l'étuve serait équivaut à 6 mois à température ambiante. Une étude poussée sur la durée réelle de conservation des produits à partir du test de vieillissement serait à entreprendre afin de déterminer sa stabilité au cours du temps ; étude dans laquelle différents paramètres comme la viscosité, pH, etc. devraient être mesurés régulièrement à partir des matériels adéquats.

Ces études nécessiteraient bien évidemment plus d'investissements de la part de l'entreprise vu que les coûts sont onéreux et surtout en microbiologie, mais c'est un mal nécessaire afin de garantir une meilleure qualité et afin d'actualiser par la même occasion l'entreprise.

### CONCLUSION PARTIELLE III

Par l'intermédiaire des analyses chromatographiques, on a donc pu vérifier que les huiles essentielles choisies contiennent bien les composantes recherchées comme ayant des pouvoirs antimicrobiens.

Bien que l'on remarque une légère incohérence sur les résultats des analyses sensorielles vu l'infidélité des sujets entre le test de classement et le test d'acceptabilité pour ce qui des préférences sur les concentrations proposées, elle a été d'une aide précieuse dans le choix des concentrations en analyses microbiologiques.

Par ailleurs, les tests de vieillissement ont été un outil avantageux afin d'avoir un aperçu des pouvoirs antioxydants des huiles essentielles et de cerner à quelles concentrations ces huiles essentielles influent notablement sur la stabilité du produit.

Les analyses microbiologiques ont permis à leur tour de vérifier si les huiles essentielles réduisent considérablement (selon les valeurs requises par les normes) la population microbienne initialement inoculée dans les produits.

Enfin, les enquêtes sociodémographiques ont permis de connaître l'intérêt que portent les consommateurs sur les produits cosmétiques naturels et sans conservateurs de synthèse.

# *Conclusion*

## CONCLUSION GENERALE

Le désir de santé et de bien être a toujours été une préoccupation chez l'homme. Dès lors, il a essayé par différentes manières d'embellir sa peau par des cosmétiques. Toutefois la sécurité que procurent les produits est devenue depuis un certain temps une revendication et parfois même une exigence chez les consommateurs. C'est dans cette voie qu'est née l'étude des conservateurs à base de plante qui pourraient être utilisés dans les produits cosmétiques (cas des huiles essentielles de *mandravasarotra* et de clou de girofle) afin de combler ce désir de sécurité.

Les analyses CPG ont permis de doser la quantité des composants actifs dans les huiles essentielles et les concentrations trouvées sont respectivement pour les huiles essentielles de thym, de clous de girofle et de *mandravasarotra* : 56,8% de thymol ; 87,0% d'eugénol et 47,9% de 1,8-cinéole. Ces valeurs sont conformes et même supérieures aux résultats déjà trouvés et aux normes pour le cas du thymol et du 1,8-cinéole ; ce qui confirme l'hypothèse 1 émise comme quoi les huiles essentielles choisies contiennent effectivement les composantes antimicrobiennes recherchées.

Par l'intermédiaire des analyses sensorielles, un classement des produits proposés à concentration croissante d'huile essentielle a pu être obtenu, bien que souvent les différences soient non significatives on a pu déterminer que les sujets ont tendance à préférer les odeurs plus douces et plus légères. Pour ceux dont les différences sont non significatives, le choix s'est porté sur les concentrations plus élevées.

Il a tout de même fallu tenir compte des tests de vieillissement à l'étuve à 45°C qui ont montré que plus la concentration en huile essentielle est élevée, plus le produit devient rapidement instable et est sujet à des ruptures de phase. On a noté qu'à partir de la concentration 0,48% tant en huile essentielle de clou de girofle que de *mandravasarotra*, la rupture de phase est apparu au bout de quelques jours seulement et surtout pour le cas des laits démaquillants. Les huiles essentielles influent également sur la viscosité de ces derniers.

La vérification de l'efficacité des conservateurs sur des souches de microbes par l'intermédiaire du challenge test ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- les concentrations d'huiles essentielles testées sont inefficaces contre les bactéries *Staphylococcus aureus* si l'on se réfère aux normes qui exigent une diminution de 2log de la population initiale de microbe.

- les huiles essentielles de girofle clous utilisées seules ou en synergie avec l'huile essentielle de *mandravasarotra* sont efficaces contre les souches de *Candida albicans* étant que la norme exigeait une diminution de 2log en 14jours et pas d'augmentation ultérieure, la diminution de la population de *Candida albicans* au cours des 28 jours de tests ont satisfaits pleinement ces critères.

Cependant, vu que ces conservateurs n'ont pas pu réduire la population de *Staphylococcus aureus* d'après les normes ils ne sont donc pas efficaces à ces concentrations incorporées dans les produits cosmétiques ; l'hypothèse 2 émise au début de l'investigation est donc rejetée.

Mais étant donné que l'étude ne s'est portée sur seulement 2souches de microorganisme, les recherches pourraient encore être étendues sur d'autres microorganismes d'altération proposée par la norme comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus niger*. Et si les expériences se sont portées uniquement sur des huiles essentielles, l'étude pourrait encore s'élargir sur d'autres types d'extraits en tant que conservateurs naturels.

*Références  
Bibliographiques*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### BIBLIOGRAPHIES

1. BONNARD N., BRONDEAU M-T, JARGOT D., FALCY M., SCHNEIDER O. ; 2008 ; 2-phénoxyéthanol ; Fiche toxicologique ; n° 269 ; Institut National de Recherches et de Sécurité
2. CHIVOT M. MARTINI C. PEYREFITTE G. ; 1995 ; Cahier d'esthétique-cosmétique ; EDITION SIMEP ; Paris
3. CORRE C., DALVAI J., DAMPFHOFFER M., LAMBERLIN M., TERRASSON R. ; 2009 ; Les parabènes : quelle problématique pour la santé publique ?; École des Hautes Études en Santé Publique
4. DELARRAS C. ; 2007 ; Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire ; Editions TEC&DOC ; Editions Médicales Internationales ; Lavoisier ; P. 475
5. FONDRAZ M., THIRION M. ; 2007, Une famille remarquable: le formaldéhyde
6. FU Y. ZU Y., CHEN L., SHI X., WANG Z., SUN S., EFFERTH. T; 2007; Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination; Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, China.
7. HULIN V. MATHOT A., MAFART P., DUFOSSÉ L; 1998 ; Les propriétés antimicrobiens des huiles essentielles et composés d'arômes ; Science des aliments ; An International Journal of Food Science and Technology ; Vol 18, n° 6 ; Lavoisier
8. ISO 18415 ; 2007 Cosmétiques- Microbiologie- Détection des micro-organismes spécifiés et non spécifiés
9. JUDE A. 2004 ; Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ? ; Huiles, corps gras et produits cosmétiques ; Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 11, Numéro 6, 414-8
10. PENOEL D., FRANCHOMME P. ; 1995 ; L'aromathérapie exactement, Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles ; Éditions Roger Jollois ; P 446
11. POUILLOT A. POLLA B.S.; 2006 ; Conservateurs en cosmétologie : mise au point sur les parabènes ; Journal de médecine Esthétique et de chirurgie dermatologique ; Volume XXXIII, n°151
12. RANDRIAMAHAZO V. ; 2009 ; Contribution à la caractérisation des huiles essentielles de *Cinnamosma fragrans* Baillon : composition chimique et activités antibactériennes ; Mémoire de fin d'études ; Département Industries Agricoles et Alimentaires ; école Supérieure des Sciences Agronomiques ; P.77

13. RANDRIANASOLO I. ; 1996 ; Contribution a l'étude de la fertilisation du thym (*thymus vulgaris*) et de la valorisation de son huile essentielle, Mémoire de fin d'étude ; Département Agriculture ; École Supérieure Des Sciences Agronomiques ; P.54
14. RASOARAHONA F. H. ; 2011 ; Standardisation de bases parfumantes en vue de l'utilisation en cosmétique : cas de l'arôme vanille ; Département Génie Chimique ; Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de diplôme d'études approfondies ; École Supérieure Polytechnique ; Université d'Antananarivo
15. RAVELO T.; 2011; Evaluation de l'effet conservateur des extraits de *Thymus vulgaris L.*, *Rosmarinus officinalis L.*, et *Piper nigrum L.* sur un exemple de produit carné ; Mémoire de fin d'étude ; Option Agroalimentaire ; Athénée Saint Joseph Antsirabe (ASJA)
16. RAVOHITRANIAINA H. ; 2003 ; Contribution à la valorisation de *Aloe macroclada* de Madagascar en cosmétique : cas des produits de soins capillaires ; Mémoire de fin d'étude ; École Supérieure des Sciences Agronomiques, Département Industries Agricoles et Alimentaires ; P.86
17. RAZAFIMAMONJISOA D. ; 2011 ; Variabilités chimiques et activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Cinnamosma spp.* (Alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette) ; Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat Option Industries Agricoles et Alimentaires, Département Industries Agricoles et Alimentaires ; École Supérieure des Sciences Agronomiques ; Université d'Antananarivo
18. ROULIER G. ; 1990 ; Les huiles essentielles pour votre santé, Traité d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plante ; Éditions Dangles ; P.335
19. STIENS R. ; 2008 ; La vérité sur les cosmétiques : LEDUC S. EDITIONS ; Paris

## WEBIOGRAPHIES

20. Agence Nationale de l'Environnement de Haute-Normande ; 2009 ; La face cachée des cosmétiques ; consulté le 23.11.11 sur <http://www.arehn.asso.fr>
21. ANONYME ; 2010 ; Altération des cosmétiques ; consulté le 08.11.11 sur <http://cosmetique-yrs.e-monsite.com>
22. ANONYME ; 2011 ; Conservateurs et parabène ; consulté le 16.11.11 sur <http://www.dermaptene.com>
23. ANONYME ; 2011 ; conservateur des cosmétiques bio ; consulté le 27.11.11 sur <http://www.caseo.fr>
24. ANONYME ; 2010 ; Cosmétique ; consulté le 25/11/2010 ; <http://www.wikipedia.org>
25. ANONYME ; 2010 ; Cours de chromatographie ; Master de Chimie 1<sup>ère</sup> année ; Faculté des sciences d'Orsay ; consulté le 12.08.12 sur <http://www.masterchimie1.u-psud.fr>

26. ANONYME ; 2011 ; Fiche technique de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* ; consulté le 17.10.11 sur <http://www.aroma-zone.com>
27. ANONYME ; 2008 ; Le Giroflier ; consulté le 10.08.12 sur <http://www.agriculture.gov.mg>
28. ANONYME ; Nouveau précis d'esthétique cosmétique ; Les cosmétiques et leurs composants consulté le 23.11.11 sur <http://terminalf.risc.cnrs.fr>
29. BENJILALI B. *et al*; 1986; Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé ; Plantes médicinales et phytothérapie ; Tome XX ; n°2 ; consulté le 09.01.12 sur <http://plantearomatiquemedicinale.unblog.fr>
30. BOURKHISS M. *et al* ; 2007 ; Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc ; Département de chimie, Faculté des Sciences, Université Moulay ; consulté le 06.03.12 sur <http://www.afriquescience.info>
31. CLAUSTRIAUX J-J ; 2001 ; Considération sur l'analyse statistique des données sensorielles ; Unité de Statistique et Informatique ; Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux consulté le 29.07.11 sur <http://www.bib.fsagx.ace.be>
32. CTCPA Centre Technique de la Conservation des Produits Alimentaires Vieillissement accéléré des produits alimentaires ; 2011 ; consulté le 02/05/12 sur <http://ogi.ctcpa.eu>
33. GEORGIEVA S., KARSHEVA M., ALEXNADROVA S.; 2010; Étude des émulsions cosmétiques aux extraits naturels par des méthodes rhéologiques (effet de la température) ; Revue de Génie Industriel ISSN 1313-8871 ; Université de Technologie Chimique et de Métallurgie, Sofia, Bulgarie consulté le 29.07.11 sur <http://www.revue-genie-industriel.info>
34. HOMEOPHARMA ; 2012 ; Présentation de l'HOMEOPHARMA ; consulté le 12.08.12 sur <http://www.madagascar-homeopharma.com>
35. LEPOITTEVIN J-P. ; 2006 ; Cosmétiques peut-on parler de produits toxiques ?; 27è Cours d'actualisation en dermato-allergologie du GERDA ; Université Louis-Pasteur Toulouse ; consulté le 15.11.11 sur <http://www.gerda-assoc.com>
36. MAISON A., PASQUIER E. ; 2008 ; Le point des connaissances sur le formaldéhyde ; Institut National de Recherches et de Sécurité ; consulté le 23.11.11 sur <http://www.inrs.fr>
37. NOUDJOUR M. ; 2010 ; Extraction de l'huile essentielle de *Thymus Fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne ; Magister en Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques ; Option Industrie Pharmaceutique ; Université M'HAMED BOUGARA GOUMERDES FACULTE DE HYDROCARBURE ET DE LA CHIMIE consulté le 20.10.11 sur <http://www.unbb.dz>

38. RNF Réseau Normalisation et Francophonie ; 2011 ; Normes et certification pour les instituts de beauté et les cosmétiques, N°01/11 ; consulté le 26.10.11 sur <http://www.lernf.org>
39. ROUX D. ; 2008 ; Conseils en aromathérapie 2<sup>e</sup> édition ; consulté le 17.10.11 sur <http://books.google.fr>
40. TESSIER T. MADET N. ; 2004 ; Compte rendu de TP de chromatographie : Chromatographie en phase gazeuse ; Université de Créteil-Paris XII consulté le 12.08.12 sur <http://julientap.free.fr>

## SUPPORTS DE COURS

41. BENOIT C. ; 2008 ; Travaux dirigés d'Analyse Sensorielle, cours de 4<sup>ème</sup> année, Département Industries Agricoles et Alimentaires ; École Supérieure des Sciences Agronomiques ; Université d'Antananarivo
42. RAMANOELINA P. ; 1997 ; Industries des Extraits Aromatiques ; Cours de 5<sup>ème</sup> Année ; Département Industries Agricoles et Alimentaires ; École Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo
43. RAMANOELINA P. ; 2011 ; Méthodes d'analyses et contrôle II ; Cours de 5<sup>ème</sup> Année Département Industries Agricoles et Alimentaires ; École Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo
44. RANDRIANTINA R. 2010 ; Analyses Sensorielles ; Cours de 4<sup>ème</sup> Année ; Département Industries Agricoles et Alimentaires ; École Supérieure des Sciences Agronomiques ; Université d'Antananarivo
45. RAONIZAFINIMANANA B. ; 2010 ; Français Technique ; Cours de 4<sup>ème</sup> Année ; Département Industries Agricoles et Alimentaires ; École Supérieure des Sciences Agronomiques ; Université d'Antananarivo
46. RAZAFINDRAJAONA J.M. ; 2009 ; Techniques microbiologiques de base ; Cours de 3<sup>e</sup> Année ; Département Industries Agricoles et Alimentaires ; École Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo
47. RAZAFINDRAJAONA J.M. ; 2010 ; Introduction à la recherche ; Cours de 4<sup>e</sup> Année ; Département Industries Agricoles et Alimentaires ; École Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo

# *Parties Expérimentales*

## PARTIES EXPERIMENTALES

### PARTIE EXPERIMENTALE I : Hydrodistillation de l'huile essentielle de thym

#### ➤ Matériaux

- Hydrodistillateur
- Ballon 2000ml
- Eau distillée

#### ➤ Mode opératoire

- Pesar la matière première
- Mettre dans le ballon
- Remplir le tout d'eau
- Poser sur la chauffe ballon
- Monter l'appareil d'hydrodistillation
- Effectuer l'extraction
- Laisser décanter
- Recueillir l'huile essentielle dans un flacon



Figure 16: Hydrodistillation du thym (Cliché: Auteur, 2011)

➤ **Résultats obtenus**



**P (thym)= 173,4921g**

**P (HE obtenue) = 0,2142g**

**Rendement = 0,12%**

Figure 17: Huile essentielle de thym (Cliché: Auteur, 2011)

## PARTIE EXPERIMENTALE II : Analyse par chromatographie en phase gazeuse

### ➤ Conditions opératoires

- Colonne: capillaire en silice fondu DB-WAX, L = 30m,
- Programmation de température de colonne : 60°C (4,5 mn) à 220°C (3°C/mn).
- Gaz vecteur : hydrogène 0,25 bar en tête de colonne

### ➤ Identification par calcul des IK (Indice de Kovats)

La chromatographie en Phase Gazeuse permet de séparer en pics les constituants d'une huile essentielle, qui seront identifiés par le calcul des IK ou Indices de Kovats. On entend par IK, une interpolation (logarithmique en analyse isotherme, linéaire en programmation de température) du temps de rétention réduit du pic correspondant par rapport à ceux des paraffines linéaires paires encadrant ce pic.

La formule de calcul est la suivante :

$$IK = 100n + \frac{t'R(X) + t'R(C_n)}{t'R(C_{n+2}) - t'R(C_n)}$$

**n**: Nombre d'atomes de la paraffine C<sub>n</sub>

**t'R** : Temps de rétention réduit

**X** : Composer à analyser

**C<sub>n</sub>** : Paraffine à n atomes de carbone

**C<sub>n+2</sub>** : Paraffine à n+2 atomes de carbone

Les indices calculés sont ensuite comparés avec ceux de la littérature pour des analyses effectuées dans des conditions similaires (type de phase et mode de programmation de température essentiellement).

# *Annexes*

## ANNEXE I : QUELQUES ILLUSTRATIONS DE L'ETUDE



Figure 18: Hydrodistillation de l'huile essentielle de thym (Cliché: Auteur, 2010)

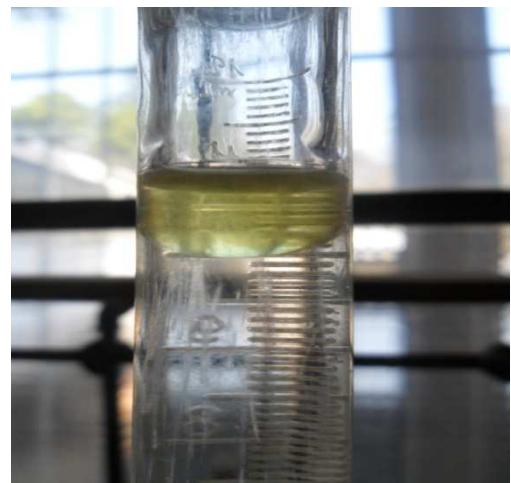


Figure 19: Huile essentielle de *Thymus vulgaris* (Cliché: Auteur, 2011)

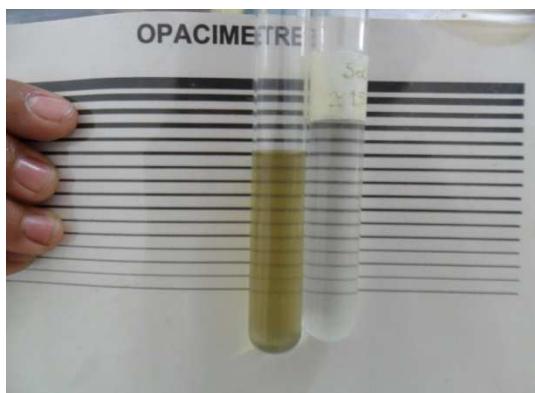


Figure 20: Préparation de la solution de Mac FARLAND (Cliché: Auteur, 2012)



Figure 21: Échantillons de lait et lotions pour le challenge test (Cliché: Auteur, 2012)

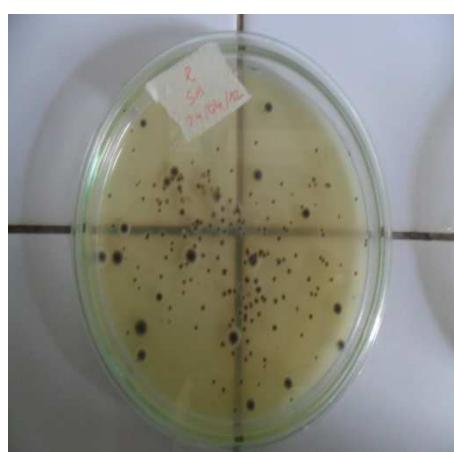


Figure 22: Colonies de *Staphylococcus aureus* (Cliché: Auteur, 2012)

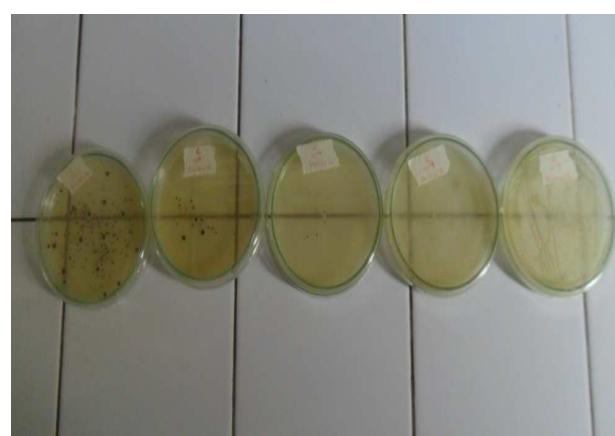


Figure 23: Dénombrement de *Staphylococcus aureus* (Cliché: Auteur, 2012)

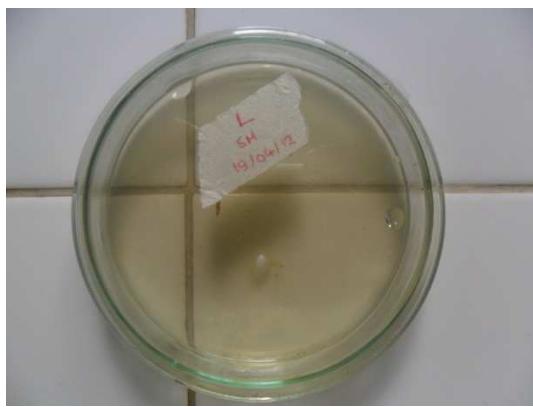


Figure 24 : Colonies de *Candida albicans*  
(Cliché: Auteur, 2012)

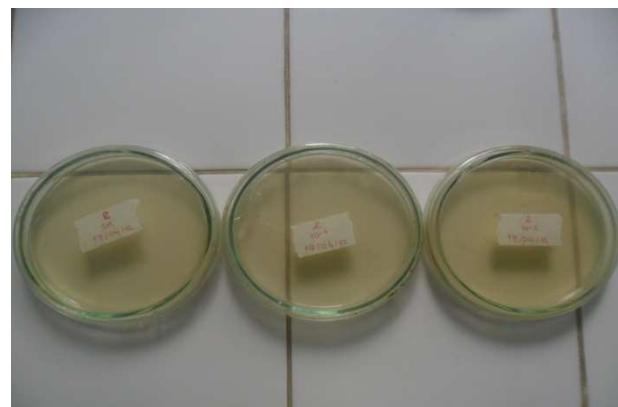


Figure 25: Dénombrement des colonies de *Candida albicans*  
(Cliché: Auteur, 2012)



Figure 26: Épreuve d'analyse sensorielle  
(Cliché: Auteur, 2012)



Figure 27: Épreuve d'analyse sensorielle  
(Cliché ; Auteur, 2012)



Figure 28: Échantillons des laits démaquillants pour le test de stabilité  
(Cliché : Auteur, 2012)



Figure 29: Échantillons des lotions pour le test de stabilité (Cliché: Auteur, 2012)

## **ANNEXE II : PRESENTATION DE L'INSTITUT D'ACCUEIL HOMEOPHARMA [34].**

### **I. Présentation générale de la société**

#### **I.1. Historique**

HOMEOPHARMA est un établissement pharmaceutique fondé en 1992 par Jean Claude RATSIMIVONY, Docteur en Psychologie et en Sciences Cognitive, Naturopathe et Iridologue, Phyto-Aromathérapeute, accompagné de son épouse, Docteur en pharmacie. Agréé par le ministère de la santé, HOMEOPHARMA est spécialisé dans la phytothérapie, l'aromathérapie, la médecine traditionnelle rénovée et l'homéopathie.

Et depuis, HOMEOPHARMA a dispensé des formations à plus de 1000 médecins, pharmaciens, dentistes et vétérinaires, tradipraticiens et masseurs, et propage leurs produits et formations dans toute l'île.

#### **I.2. Présentation de l'institution d'accueil : HOMEOPHARMA**

En héritant des pratiques ancestrales depuis plus de 200 ans et en puisant dans une source de savoir alliant tradition et science, HOMEOPHARMA œuvre et innove sans cesse dans le domaine du bien-être et de la santé. Etant donné que la médecine traditionnelle de la Grande île a, depuis l'époque des ancêtres, dévoilé le secret de nombreuses plantes à vertus exceptionnelles, l'institut propose des produits et remèdes, utiles et pratiques, entièrement naturels, contribuant à la santé et au confort de la vie quotidienne dont :

- une gamme complète de médicaments homéopathiques
- une gamme complète d'huiles essentielles ( classiques et nouvelles)
- des préparations végétales et thés médicinaux pour infusions
- des baumes à essence de plantes
- une gamme d'huiles corporelles et de massages à base de plantes fraîches
- des compléments nutritionnels
- des eaux florales et des savons végétaux
- des bains aromatiques
- des parfums d'ambiance

##### **a. Activités**

A travers le pays, des milliers d'autres plantes sont utilisées traditionnellement depuis toujours pour soulager petits et grands maux quotidiens. Depuis une dizaine d'années,

HOMEOPHARMA donne une nouvelle dimension à cette tradition. Cette société utilise déjà actuellement 1500 plantes dans ses produits, soit environ 10 % seulement de celles qu'elle a hérité d'une lignée ininterrompue depuis presque 200 ans des grands Maîtres et Tradipraticiens. Recherches et innovations se poursuivent chaque année sur les autres plantes.

HOMEOPHARMA assure ses productions de la plantation aux produits finis. Répartie dans plusieurs endroits de l'Ile, elle plante, cueille et récolte sur 600 ha de forêt, encadre les paysans dans un endroit participatif au développement de la région et tout en procurant du travail aux communautés, à la protection et au renouvellement des ressources végétales aidant ainsi à préserver l'environnement et sa biodiversité.

#### **b. Les instituts et centre de formation**

HOMEOPHARMA dispose d'Instituts de Soins et de Massages répartis dans toute l'île, qui dispensent des conseils gracieusement par des spécialistes pour l'utilisation de ses produits auprès du public.

HOMEOPHARMA dispense également dans ses centres des formations aux professionnels de la santé (médecins, pharmaciens, dentistes, vétérinaires, infirmiers, sage-femme, kinésithérapeutes) mais aussi aux thérapeutes et public intéressés par la médecine naturelle : homéopathie, phyto-aromathérapie, massage traditionnel, psychothérapie.

#### **c. Les garanties qualités de l'HOMEOPHARMA**

L'HOMEOPHARMA est reconnue pour la qualité de ses produits mais aussi par l'origine naturelle de leur majorité. A cet effet, la société possède plusieurs garanties :

- Certification par Ecocert International
- Certification Label « Nature » par l'Université de Rutgers (USA)

HOMEOPHARMA coopère également avec les universités de Madagascar

#### **d. Les ressources humaines de l' HOMEOPHARMA**

La société, au nombre de 4 personnes en 1992, est passée à 496 personnes en 2012. Avec quelques centaines de saisonniers. Pluridisciplinaires, 2 pharmaciens, 45 médecins phyto-aromathérapeutes, 4 chimistes, 4 ingénieurs agronomes, 2 polytechniciens, 1 psychologue , 4 informaticiens et une quarantaine de masseuses etc. travaillent actuellement au sein des laboratoires HOMEOPHARMA.

### **e. Les moyens scientifiques**

- Le laboratoire de diagnostic médical et biologique (LADIMEB) qui retrace un programme de soins naturels avant, pendant et après, gage d'une approche scientifique et de la sécurisation de l'utilisation des plantes.

- Laboratoire de recherche et développement qui travaille avec assiduité sur l'élaboration des produits.

- Le comité scientifique, base de toutes les recherches scientifiques est présidé par le Directeur Scientifique. Il est composé d'une équipe de scientifiques : pharmacologues, biochimistes, médecins, médecins biologistes, ethnobotaniste, microbiologiste, cosmétologue. La diversité des formations de l'équipe permet une meilleure complémentarité et collaboration dans le travail. Le rôle du Comité Scientifique est de travailler autour de la recherche scientifique sur les plantes aromatiques et médicinales. Il a également pour mission de garantir l'efficacité, la sécurité et la qualité des produits HOMEOPHARMA aux clients. Le Comité Scientifique abrite le noyau scientifique et technique du laboratoire HOMEOPHARMA.

Le Comité Scientifique a plusieurs missions : étudier d'un point de vue scientifique les plantes de Madagascar, écrire des revues scientifiques sur les travaux réalisés, établir et rédiger un cahier scientifique des produits HOMEOPHARMA, mettre en place son propre laboratoire d'analyses des produits, etc.

### **f. Le laboratoire de recherches et développement**

Le Service Recherche et Développement est un service sous la Direction Scientifique et son Responsable fait également partie du Comité Scientifique. Actuellement, le Service est au nombre de 5 personnes. Il met au point la conception de nouveaux produits, des formules avec des principes actifs d'origine naturelle. Avec son équipe, le laboratoire de recherches et développement s'attèle en permanence sur la formulation de produits innovants, efficaces et adaptés aux attentes des consommateurs et travaille avec le Service Marketing et la Production.

### ANNEXE III : DESCRIPTION DES MICROORGANISMES TESTÉS

#### 1. *Staphylococcus aureus* [24].

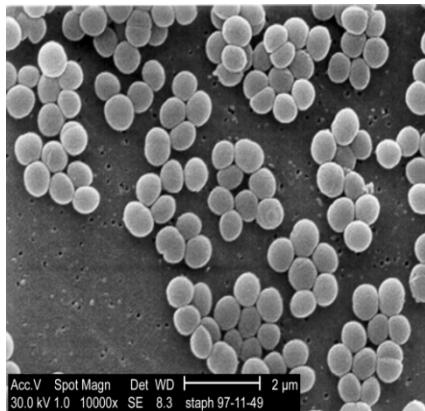
##### a. Classification

Le tableau suivant présente la classification de l'espèce *S. aureus*.

Tableau LXXXI: Classification de l'espèce *Staphylococcus aureus* [24].

Règne	Bacteria
Division	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	<i>Staphylococcus</i>

##### b. Description



*S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin) Gram positif et catalase positif. C'est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques). *S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin). Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom.

Figure 28: *Staphylococcus aureus* [24].

*S. aureus* est une bactérie pathogène opportuniste chez l'homme qui peut également souvent être présente sur la peau d'individus sains chez lesquels elle n'engendre apparemment aucune maladie. C'est un micro-organisme spécifié dont la présence est indésirable dans les produits cosmétiques. (ISO 18415 Version corrigée 2007-12-01 Cosmétiques- Microbiologie- Détection des micro-organismes spécifiés et non spécifiés)

## 2. *Candida albicans* [24].

### a. Classification

Le tableau suivant présente la classification de l'espèce *S. aureus*.

Tableau LXXXII: Classification de l'espèce *Candida albicans* [24].

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Saccharomycetes
Ordre	Saccharomycetales
Famille	Saccharomycetaceae
Genre	<i>Candida</i>

### b. Description [8]. [24].

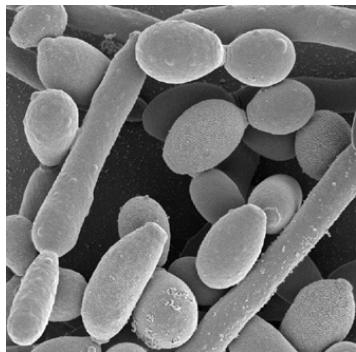


Figure 29: *Candida albicans* [27].

Levure qui forme des colonies convexes et d'aspect crémeux, de couleur blanche à beige, à la surface d'un milieu gélosé non sélectif. *Candida albicans* est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique. C'est une levure trouvée dans des produits cosmétiques.

## ANNEXE IV : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE [40]. [43].

### 1. Définition

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode séparative parmi les plus employées car elle allie rapidité et efficacité de séparation. Elle permet d'analyser qualitativement et quantitativement des mélanges complexes de gaz ou de composés qui peuvent être volatilisés sans être décomposé. Cette méthode permet la séparation comme les autres techniques chromatographique par une suite d'équilibre entre une phase gazeuse (phase mobile qui entraîne les échantillons à analyser) et une phase liquide (chromatographie de partage) ou solide (chromatographie d'adsorption).

Pour concurrencer l'utilisation de l'HPLC, la CPG offre :

- Une grande adaptabilité par un grand choix de phases stationnaires, de températures, et de débit de phase mobile ainsi que sa composition (azote, argon, hélium, hydrogène, ...)
- L'utilisation de méthodes physiques de détection très sensibles (de l'ordre du picogramme)
- L'automatisation assurant l'utilisation de très nombreux échantillons.

### 2. Matériel

Dans tout processus chromatographique, on note la présence de trois composants [43].:

- Une phase fixe répartie uniformément qui constitue la colonne chromatographique
- Une phase mobile qui balaye continuellement la colonne
- Un produit à analyser ou soluté qui se trouve réparti entre les deux phases précédentes par le jeu d'interaction diverses.

Le schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse est rendu sur la figure suivante.

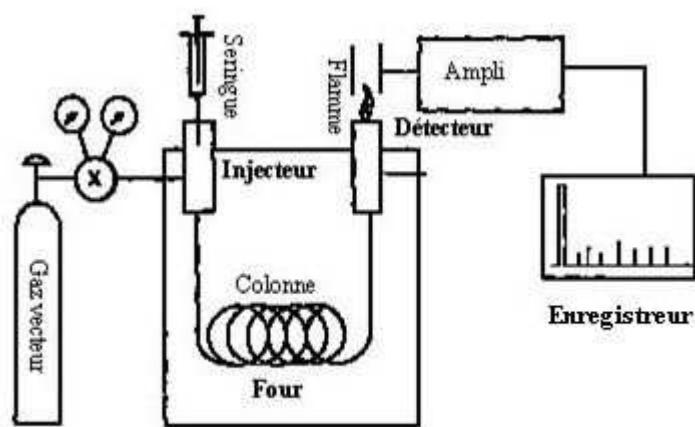


Figure 30: Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse [25].

Le principe de la séparation repose sur la différence d'affinité entre les composés pour la phase mobile et la phase stationnaire.

Un composé qui aura plus d'affinité pour la phase mobile, aura peut d'interaction avec la phase stationnaire et sera donc moins ralenti par celle-ci et sera donc élué plus rapidement qu'un

composé qui aura plus d'affinité avec la phase stationnaire et sera plus souvent en interaction avec la phase stationnaire qu'avec la phase mobile.

## ANNEXE V : PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DES HUILES ESSENTIELLES SELECTIONNEES

- #### - Profil chromatographique de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*)

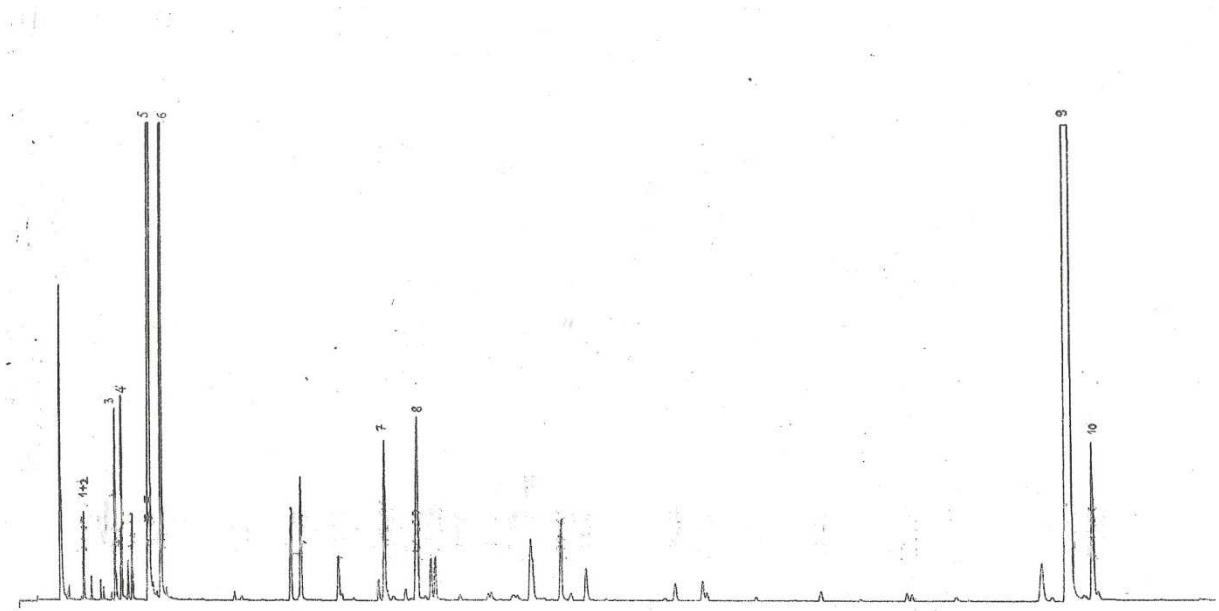


Figure 31: Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

- Profil chromatographique de l'huile essentielle de girofle clou (*Eugenia caryophyllata*)

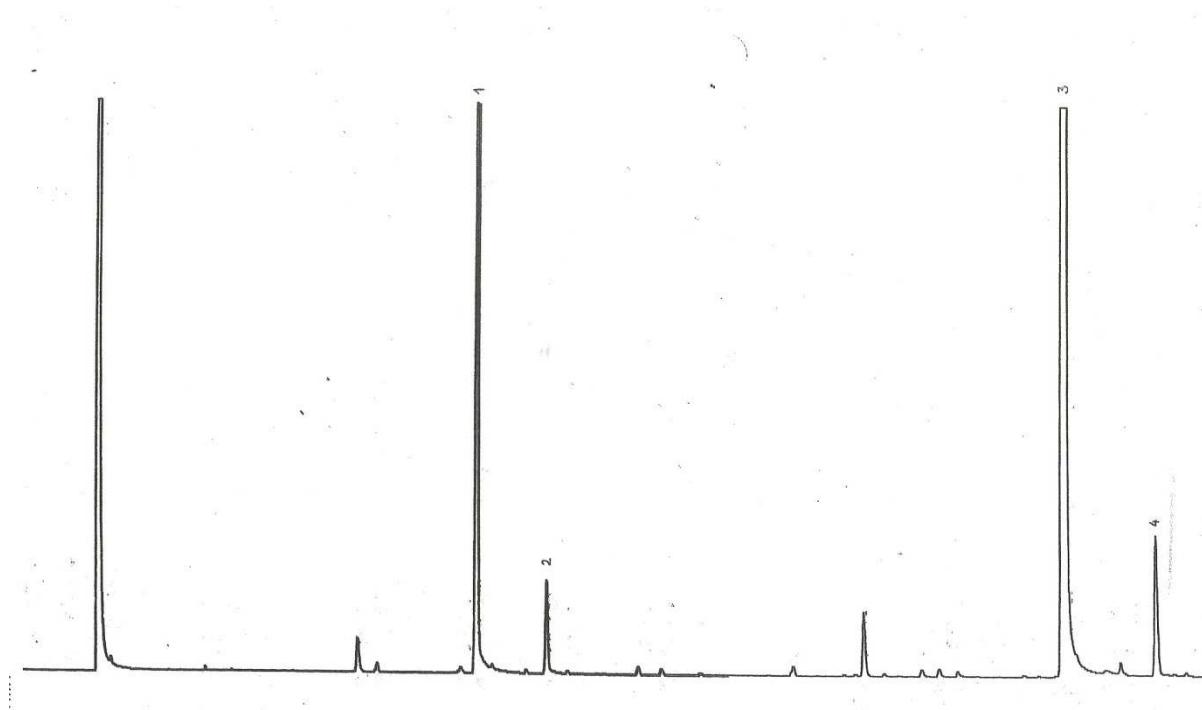


Figure 32: Profil chromatographique de l'huile essentielle de girofle clou (*Eugenia caryophyllata*)

- Profil chromatographique de l'huile essentielle de *mandravasarotra* (*Cinnamosma fragrans*)

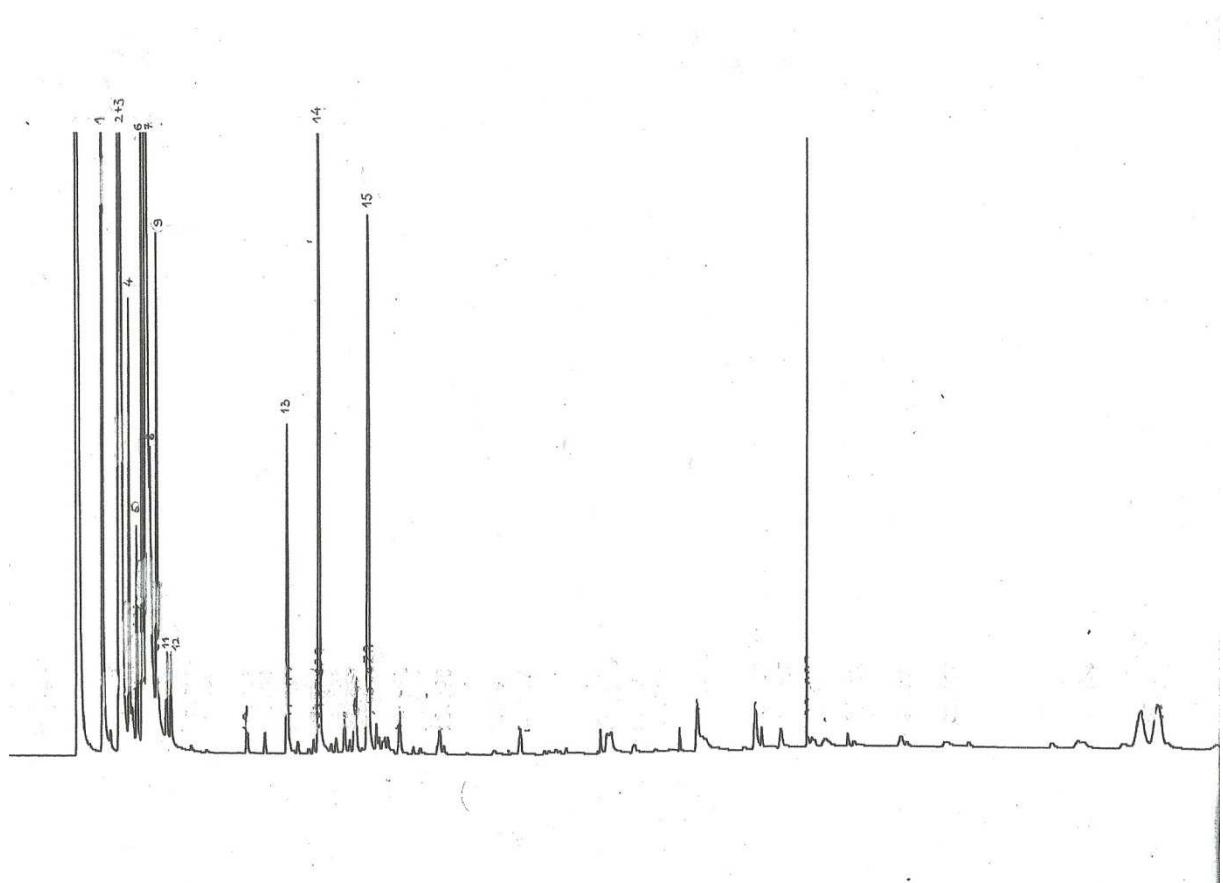


Figure 33: Profil chromatographique de l'huile essentielle de *mandravasarotra* (*Cinnamosma fragrans*)

## ANNEXE VI : QUESTIONNAIRE D'ENQUETES DES ANALYSES SOCIODEMOGRAPHIQUES

### ENQUÊTE SUR LA CONSOMMATION DES PRODUITS COSMETIQUES SANS CONSERVATEUR DE SYNTHESE A MADAGASCAR

Ce questionnaire est strictement anonyme et confidentiel

\*Obligatoire

Haut du formulaire

---

Vous êtes \*

- Un homme
- Une femme

Vous êtes agés \*

- de moins de 18 ans
- de 18 à 25 ans
- de 26 à 33 ans
- de 34 à 41 ans
- de 42 à 50 ans
- de plus de 50 ans

Utilisez-vous des produits cosmétiques ? \* Un cosmétique est une substance ou un mélange destiné à être mis en contact avec diverses parties superficielles du corps humain, en vue de les nettoyer, protéger, parfumer, maintenir en bon état, de modifier leur aspect ou d'en « corriger » l'odeur.

- OUI
- NON

Quel(s) type(s) de produit(s) cosmétique(s) utilisez-vous ? \*

- les produits d'hygiène : démaquillant, dentifrice, déodorant, gel douche, savon, shampoing, bain de bouche, etc.

- les produits de soin du visage : crème antiride, crème de jour, crème de nuit, crème hydratante, eau florale, gommage, lait, masque de beauté, baume pour les lèvres, etc.
- les produits capillaires : après-shampoing, défrisant, gel, huile, laque, masque, teinture, etc.
- les produits de maquillage : anti-cerne, autobronzant, ligneur (eyeliner), fond de teint, mascara, poudre, produit pour blanchir la peau, rouge à lèvres, vernis à ongles, etc.
- les parfums : eau de Cologne, eau de toilette parfum, eau de parfum, etc.
- les produits solaires : crèmes, huiles ou lotions après-soleil et solaires etc.
- les produits pour le rasage et les produits dépilatoires : après-rasage, crème dépilatoire, mousse à raser, etc.
- les produits de soin du corps : huile, lait, gommage, crème pour les mains, etc.
- Autre :

A quelle fréquence utilisez-vous les cosmétiques cités précédemment ? \*

- Plus d'une fois par jour
- Une fois tous les deux ou trois jours
- Une fois par semaine
- Une fois par mois
- Vous n'utilisez pas de cosmétiques

Les produits cosmétiques que vous utilisez sont \*

- des produits locaux
- des produits importés
- les deux en même temps

Quelle(s) est (sont) la (les) raison(s) de votre choix? \* Si vous utilisez des produits locaux, importés ou les deux en même temps

Sur quel critère choisissez-vous vos cosmétiques ? \* Veuillez cocher dans l'ordre de vos préférences selon les critères suivants : les prix, les propriétés, l'odeur ou le parfum et l'emballage et le design (par exemple 1 : emballage ; 2 : odeur ; 3 : prix ; 4 : propriétés ; 5: composition)

	1	2	3	4	5
Prix	<input type="checkbox"/>				
Emballage et design	<input type="checkbox"/>				
Odeur	<input type="checkbox"/>				
Propriétés	<input type="checkbox"/>				
Composition	<input type="checkbox"/>				

Avez-vous pour habitude de vérifier la composition de vos produits cosmétiques ? \*

- OUI
- NON

Etes-vous particulièrement intéressé par les cosmétiques naturels ou cosmétiques biologiques ? \*  
Si oui, référez vous à la question suivante

- OUI
- NON

Pourquoi vous intéressez-vous aux cosmétiques naturels ou cosmétiques biologiques?

Avez-vous connaissance des produits cosmétiques avec mention « sans parabène » ? \* Si oui, référez-vous à la question suivante

- OUI
- NON

En avez-vous déjà utilisé ? \*

- OUI
- NON

Que pensez-vous des produits cosmétiques sans conservateurs de synthèse? \*

Seriez-vous intéressé par des produits cosmétiques utilisant des conservateurs naturels et sans conservateurs de synthèse ? \*

- OUI
- NON
- Vous êtes indifférent

Seriez-vous prêt à augmenter votre budget pour l'achat de cosmétique avec des conservateurs naturels ? \* Si oui, référez-vous à la question suivante

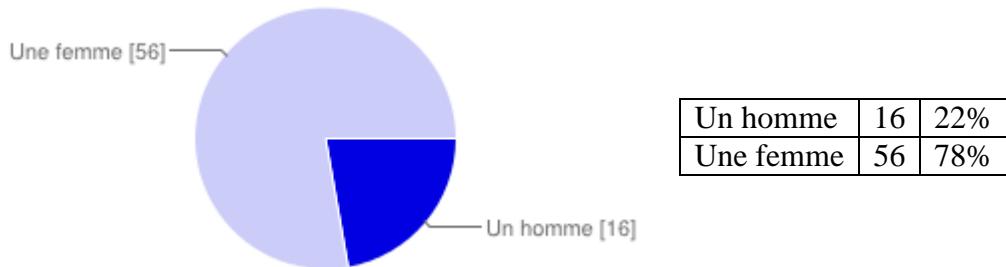
- OUI
- NON

De quel ordre de prix seriez-vous prêt à augmenter votre budget?

- inférieur à 5%
- 5 à 10%
- 10 à 15%
- 15 à 20%
- 20 à 25%
- 25 à 30%
- 30 à 35%
- 35 à 40%
- supérieur à 40%

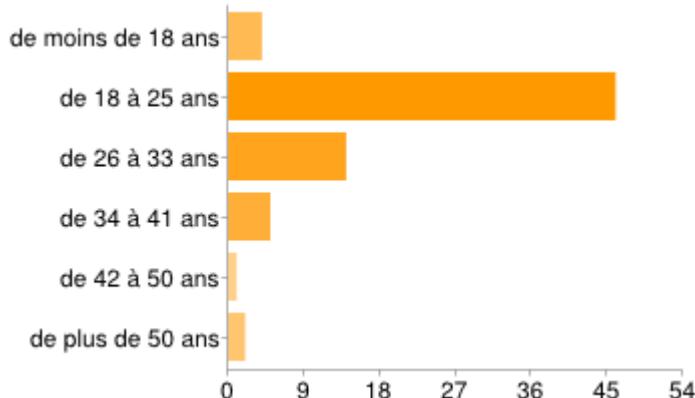
## ANNEXE VII : DETAILS DES RESULTATS DE L'ENQUETE SUR LA CONSOMMATION DES PRODUITS COSMETIQUES SANS CONSERVATEUR DE SYNTHESE A MADAGASCAR

Vous êtes

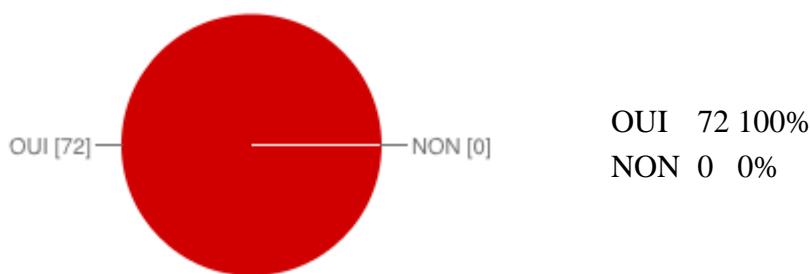


Vous êtes âgés

de moins de 18 ans	4	6%
de 18 à 25 ans	46	64%
de 26 à 33 ans	14	19%
de 34 à 41 ans	5	7%
de 42 à 50 ans	1	1%
de plus de 50 ans	2	3%



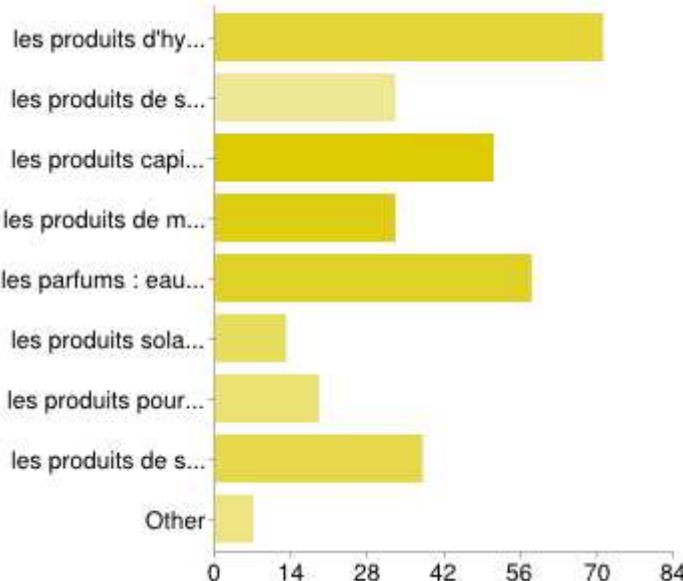
Utilisez-vous des produits cosmétiques ?



Quel(s) type(s) de produit(s) cosmétique(s) utilisez-vous ?

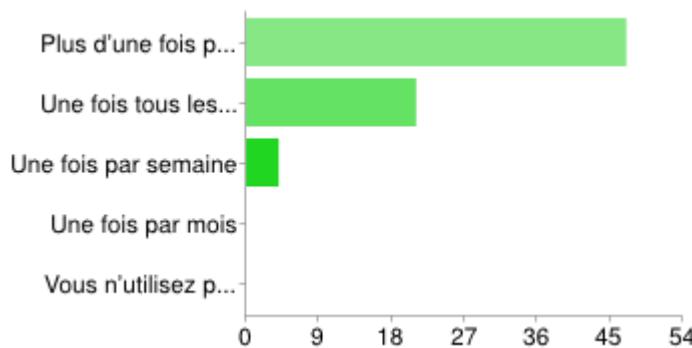
les produits d'hygiène : démaquillant, dentifrice, déodorant, gel douche, savon, shampoing, bain de bouche, etc.	71	99%
les produits de soin du visage : crème antiride, crème de jour, crème de nuit, crème hydratante, eau florale, gommage, lait, masque de beauté, baume pour les lèvres, etc.	33	46%
les produits de maquillage : anti-cerne, autobronzant, ligneur (eyeliner), fond de teint, mascara, poudre, produit pour blanchir la peau, rouge à lèvres, vernis à	33	46%

ongles, etc.		
les parfums : eau de Cologne, eau de toilette parfum, eau de parfum, etc.	58	81%
les produits solaires : crèmes, huiles ou lotions après-soleil et solaires etc.	13	18%
les produits pour le rasage et les produits dépilatoires : après-rasage, crème dépilatoire, mousse à raser, etc.	19	26%
les produits de soin du corps : huile, lait, gommage, crème pour les mains, etc.	38	53%
Autres	7	10%



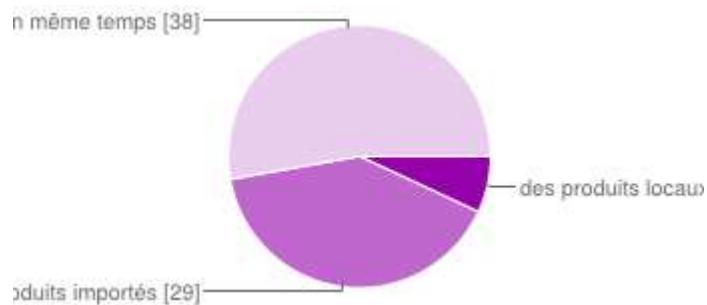
A quelle fréquence utilisez-vous les cosmétiques cités précédemment ?

Plus d'une fois par jour	47	65%
Une fois tous les deux ou trois jours	21	29%
Une fois par semaine	4	6%
Une fois par mois	0	0%
Vous n'utilisez pas de cosmétiques	0	0%



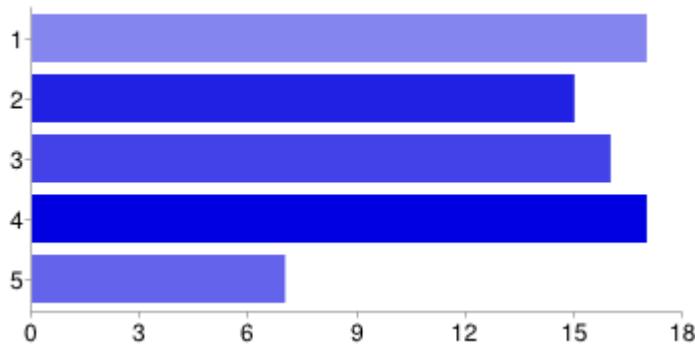
Les produits cosmétiques que vous utilisez sont :

des produits locaux	5	7%
des produits importés	29	40%
les deux en même temps	38	53%



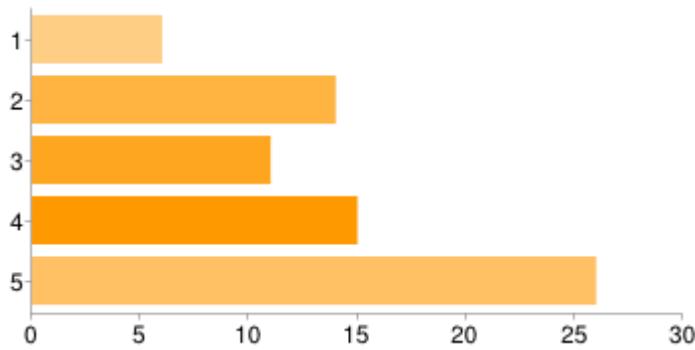
#### Sur quel critère choisissez-vous vos cosmétiques ? – Prix

1	17	24%
2	15	21%
3	16	22%
4	17	24%
5	7	10%



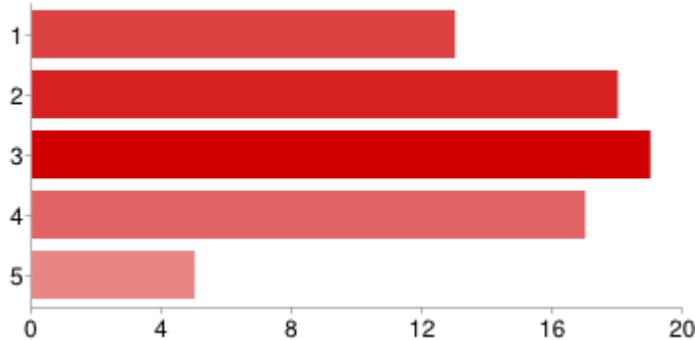
#### Sur quel critère choisissez-vous vos cosmétiques ? - Emballage et design

1	6	8%
2	14	19%
3	11	15%
4	15	21%
5	26	36%



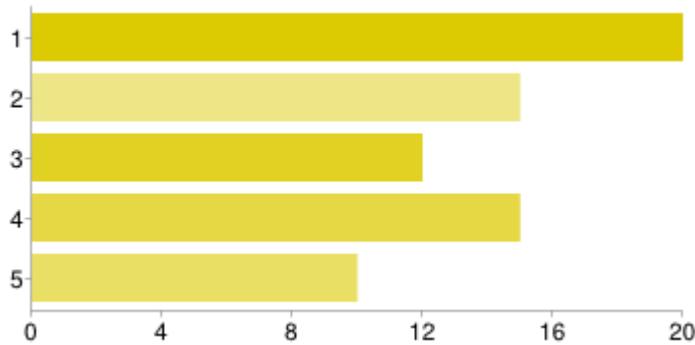
Sur quel critère choisissez-vous vos cosmétiques ? – Odeur

1	13	18%
2	18	25%
3	19	26%
4	17	24%
5	5	7%



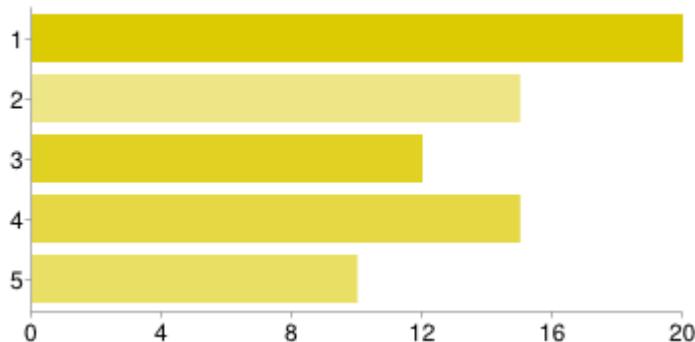
Sur quel critère choisissez-vous vos cosmétiques ? – Propriétés

1	20	28%
2	15	21%
3	12	17%
4	15	21%
5	10	14%

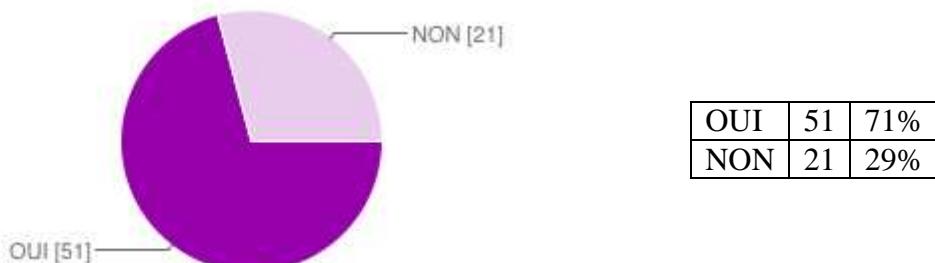


Sur quel critère choisissez-vous vos cosmétiques ? – Composition

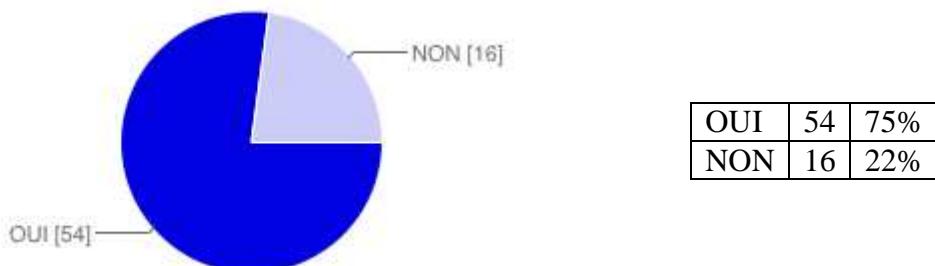
1	15	21%
2	17	24%
3	11	15%
4	14	19%
5	15	21%



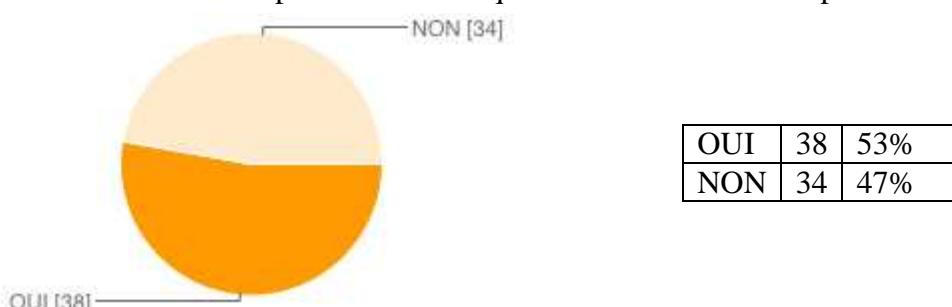
Avez-vous pour habitude de vérifier la composition de vos produits cosmétiques ?



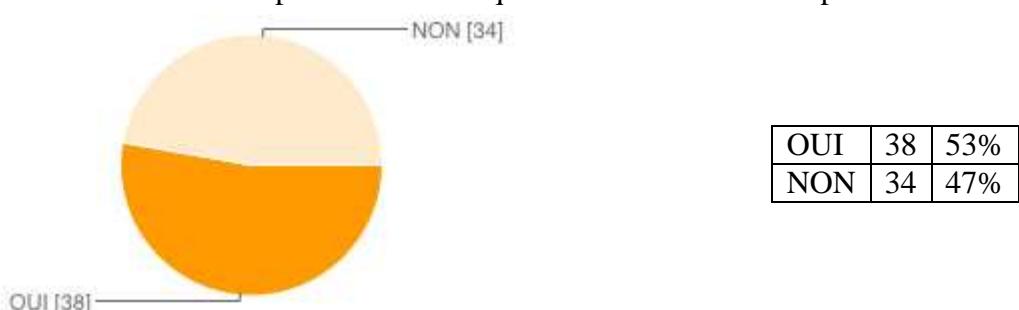
Êtes-vous particulièrement intéressé par les cosmétiques naturels ou cosmétiques biologiques ?



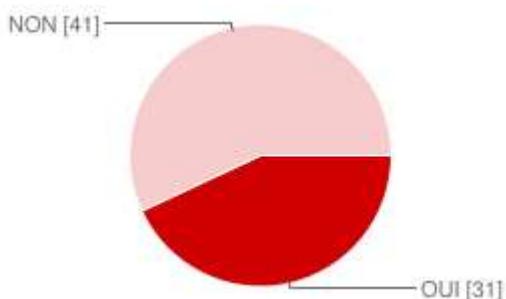
Avez-vous connaissance des produits cosmétiques avec mention « sans parabène » ?



Avez-vous connaissance des produits cosmétiques avec mention « sans parabène » ?

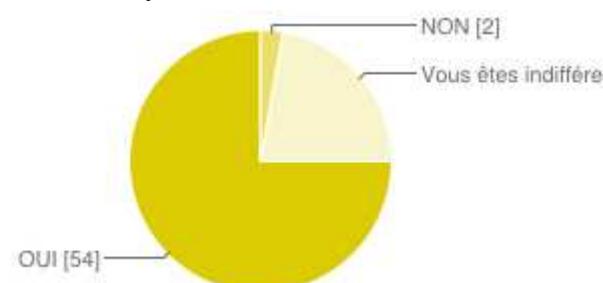


En avez-vous déjà utilisé ?



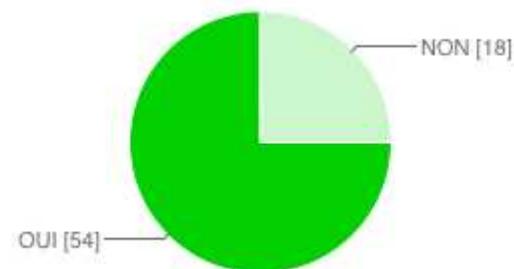
OUI	31	43%
NON	41	57%

Seriez-vous intéressé par des produits cosmétiques utilisant des conservateurs naturels et sans conservateurs de synthèse ?



OUI	54	75%
NON	2	3%
Vous êtes indifférent	16	22%

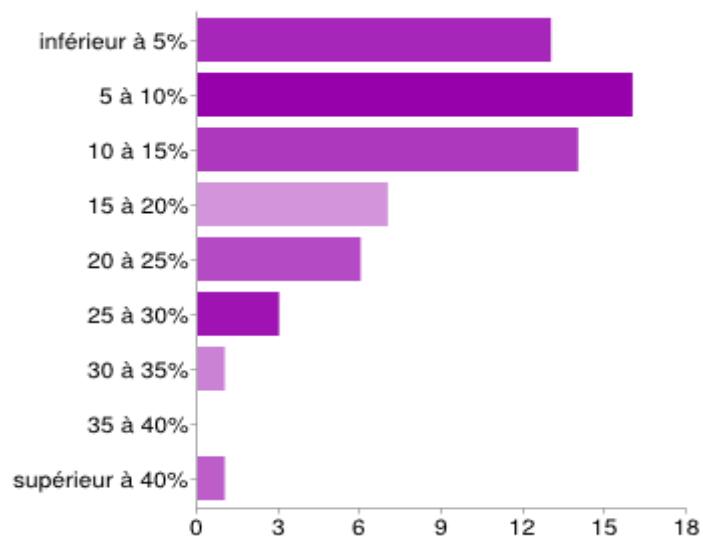
Seriez-vous prêt à augmenter votre budget pour l'achat de cosmétique avec des conservateurs naturels ?



OUI	54	75%
NON	18	25%

De quel ordre de prix seriez-vous prêt à augmenter votre budget?

inférieur à 5%	13	18%
5 à 10%	16	22%
10 à 15%	14	19%
15 à 20%	7	10%
20 à 25%	6	8%
25 à 30%	3	4%
30 à 35%	1	1%
35 à 40%	0	0%
supérieur à 40%	1	1%



## ANNEXE VIII : BULLETIN D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

- Bulletin d'analyse de l'huile essentielle de l'huile essentielle de thym



ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Département Industries Agricoles et Alimentaires

ESSA-IAA



Antananarivo

### BULLETIN D'ANALYSES

Echantillon : Huiles essentielles  
Nom scientifique : *Thymus vulgaris*  
Nom vernaculaire : Thym  
Société : RANDRIANARIVO Miaranalisoa  
 Antananarivo

Analyses demandées : CPG  
Reçu le : 07 août 2012  
Résultats à livrer le : 10 août 2012  
Opérateurs : Mme N. Raoelison

#### 1.- CONDITIONS OPERATOIRES :

Colonne capillaire en silice fondue DB-WAX 30m ; programmation 60 à 220°C, à 3°C/mn ; gaz vecteur : hydrogène, 0,25 bar en tête de colonne.

#### 2.- RESULTATS :

Profil chromatographique joint

Tableau 1 : Composition chimique de l'échantillon d'huile essentielle de Thym – MIARANALISOA  
 (composition donnée en % relative)

N° pic	Constituant	Echantillon	Norme T 75 – 349 1992
1+2	$\alpha$ -thuyène+ $\alpha$ -pinène	0,46	1,1 – 3,7
3	Myrcène	1,01	1,0 – 2,8
4	$\alpha$ -terpinène	1,12	0,9 – 2,6
5	$\gamma$ -terpinène	14,51	5,0 – 10,3
6	p-Cymène	7,01	15,0 – 28,0
7	Linalol	1,90	4,0 – 6,2
8	$\beta$ -Caryophyllène	3,02	0,6 – 1,8
9	Thymol	56,82	36,0 – 55,0
10	Carvacrol	2,68	1,2 – 4,0

#### 3.- CONCLUSION :

L'échantillon de thym présente les constituants trouvés dans l'huile essentielle de Thymus zygis de la Norme AFNOR T 75 – 349, avec le Thymol comme constituant majoritaire (56,8 %), et un monoterpène en proportion notable :  $\gamma$ -terpinène (14,5 %). Les valeurs de ces constituants sont supérieures à celles données par la Norme

Le Chef du Département



- Bulletin d'analyse de l'huile essentielle de clou de girofle



ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Département Industries Agricoles et Alimentaires



Antananarivo

### BULLETIN D'ANALYSES

Echantillon : Huiles essentielles

Analyses demandées : CPG

Nom scientifique : *Eugenia caryophyllata*

Reçu le : 07 août 2012

Nom vernaculaire : Girofle clous

Résultats à livrer le : 10 août 2012

Société : RANDRIANARIVO Miaranalisoa

Opérateurs : Mme N. Raoelison

Antananarivo

#### 1.- CONDITIONS OPERATOIRES :

Colonne capillaire en silice fondue DB-WAX 30m ; programmation 60 à 220°C, à 3°C/mn ; gaz vecteur : hydrogène, 0,25 bar en tête de colonne.

#### 2- RESULTATS

- Profil chromatographique joint
- Résultats – Interprétation :

**Tableau 1 : Composition chimique de l'échantillon d'huile essentielle de Girofle clous – MIARANALISOA**  
(Résultats exprimés en % relative)

Pic n°	Constituant	Echantillon	Norme AFNOR NFT 75-207
1	$\beta$ - caryophyllène	8,07	2 - 7
2	$\alpha$ - humulène	0,99	-
3	EUGENOL	86,99	75 - 87
4	Acétate d'eugényle	1,75	8 - 15

#### 3.- REMARQUES - OBSERVATIONS

L'échantillon présente les constituants habituellement trouvés dans l'huile essentielle de Girofle clous  
Avec comme constituant principal l'Eugenol à une teneur (87 %) conforme à la Norme (75 – 87 %).



- Bulletin d'analyse de l'huile essentielle de *mandravasarotra*



ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Département Industries Agricoles et Alimentaires



Antananarivo

### BULLETIN D'ANALYSES

Echantillon : Huiles essentielles

Nom scientifique : *Cinnamosma fragrans*

Nom vernaculaire : Mandravasarotra

Société : RANDRIANARIVO Miaranalisoa  
Antananarivo

Analyses demandées : CPG

Reçu le : 07 août 2012

Résultats à livrer le : 10 août 2012

Opérateurs : Mme N. Raelson

#### 1.- CONDITIONS OPERATOIRES :

Colonne capillaire en silice fondue DB-WAX 30m ; programmation 60 à 220°C, à 3°C/mn ; gaz vecteur : hydrogène, 0,25 bar en tête de colonne.

#### 2.- RESULTATS :

Profil chromatographique joint

Tableau 1 : Composition chimique de l'échantillon d'huile essentielle de Mandravasarotra – MIARANALISOA  
(composition donnée en % relative)

N° pic	Constituant	Echantillon	Résultats déjà trouvés*
1	$\alpha$ -pinène	5,31	4,86
2	$\beta$ -pinène	5,81	6,69
3	Sabinène	7,58	9,19
4	Myrcène	2,39	2,78
5	$\alpha$ -terpinène	1,16	0,46
6	Limonène	3,70	11,55
7	1,8-cinéole	47,93	42,28
8	Cis- $\beta$ -ocimène	-	1,42
9	$\gamma$ -terpinène	2,23	0,92
10	Trans- $\beta$ -ocimène	-	0,88
11	p-Cymène	0,43	-
12	Terpinolène	0,46	-
13	Linalol ?	1,97	-
14	Terpinène-4ol	5,22	2,73
15	$\alpha$ -terpinol	4,42	3,00

\* sur des échantillons analysés au laboratoire

#### 3.- CONCLUSION :

Le profil chromatographique est globalement analogue aux échantillons de Mandravasarotra déjà analysés au Laboratoire, avec le 1,8-cinéole comme constituant majoritaire (47,9 %), et des monoterpènes en proportion notable : sabinène (7,6 %), limonène (3,7 %),  $\beta$ -pinène (5,8 %) et  $\alpha$ -pinène (5,3 %).

On remarquera également la présence d'un pic correspondant probablement au linalol en concentration non négligeable (2,0 %) ; le linalol a été signalé dans l'huile de Mandravasarotra dans des travaux récents. A signaler également la présence d'autres produits oxygénés tels que Terpinène-4ol (5,2 %) et  $\alpha$ -Terpinol (4,4 %).



Le Chef du Département

Pr. B. RAONIZAFINIMANANA

CAMPUS UNIVERSITAIRE AMBOHITSAINA - B.P. 175, ANTANANARIVO 101  
TEL. (261) 20 - 22 228 67 (P. 223-224) - FAX. (261) 20 - 22 344 83 E-MAIL : JEANRAS@DTS.MG

Rapport-gratuit.com

## ANNEXE IX : QUESTIONNAIRE DES ANALYSES SENSORIELLES

### - Test de classement

Misy santiona efatra (4) manoloana anao. Fofony izy ireo (izay amin'ny ankavia no fofonina voalohany mankany amin'ny ankavanana). Alaharo araka izay fitiavanao azy ireo santiona ireo dia soraty eo ambanin'ny kaody ny tarehimarika mifanaraka @ filaharany. Ka izay tianao indrindra amin'izy 4 no mitondra ny laharana "1" ary izay tsy tianao indrindra no mitondra ny laharana "4".

Misaotra anao hanaraka ny fomba fanoratana eo ambony taratasy araka ny nazavaina anao teny ampiandohana.

512

251

422

347

--	--	--	--

Mba hamarino azafady ny antony nandaharanao ireo fofona tsirairay ireo ka soraty eo ambanin'ny kaody tsirairay ny valiny. Misaotra anao hanoratra ao anatin'ny efajoro ihany.

512

--

251

--

422

--

347

--

### - Test d'acceptabilité

N°: .....

Izaho dia:  Lahy

Vavy

Taona: .....

≤ 15	16 - 25	26 - 30	31 - 45	46 - 60	≥ 60
------	---------	---------	---------	---------	------

Misy santiona efatra manoloana anao. Hamariho ny fahitanao ny fitiavanao ny herin'ny fofony. Asio lakroa mifanandrify @ valiny tsirairay.

512

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Ratsy

Ratsiratsy

Sady tsy ratsy  
no tsy tsara

Tsaratsara

Tsara

- **Détermination du seuil de détection**

Code sujet : .....

Vous avez, placés devant vous, cinq (5) échantillons de concentration croissante de l'huile essentielle que vous avez préalablement sentie. Veuillez les sentir un à un de gauche à droite.

A partir que quelle échantillon retrouvez-vous l'odeur de l'huile essentielle préalablement sentie ? (Veuillez inscrire le code de l'échantillon dans la case ci-dessous)

Veuillez ensuite évaluer cet échantillon. Que pensez-vous de l'odeur de cet échantillon ? (sur une odeur de 1 à 5, veuillez cocher la note que vous lui attribuez)

1	2	3	4	5
Désagréable	Assez désagréable	Ni agréable ni désagréable	Assez agréable	Agréable

## ANNEXE X : ALLERGÈNES ET COSMÉTIQUE

Les produits cosmétiques sont étiquetés de la même manière dans tous les pays membres de la communauté européenne. La liste des ingrédients apparaît sur les produits ou sur leur emballage secondaire depuis 1997 et les ingrédients sont annoncés sous leur forme INCI (Nomenclature Internationale des Ingrédients cosmétiques), ce qui assure un haut niveau de clarté et de transparence. Les parfums ou compositions aromatiques et leurs ingrédients étaient référencés sous le terme unique "parfum". Depuis le 7ème amendement de la Directive Européenne adopté le 27 Février 2003 un complément a été apporté concernant les substances susceptibles de provoquer des allergies.

Ainsi au delà de 10 ppm dans les produits non rincés et de 100 ppm dans les produits rincés l'étiquetage doit mentionner les substances suivantes:

### LISTE DES 26 SUBSTANCES CONCERNÉES :

ALPHA-ISOMETHYL IONONE  
AMYL CINNAMAL  
AMYL CINNAMYL ALCOHOL  
ANISE ALCOHOL  
BENZYL ALCOHOL  
BENZYL BENZOATE  
BENZYL CINNAMATE  
BENZYL SALICYLATE  
BUTYLPHENYL METHYLPROPIONAL  
CINNAMAL  
CINNAMYL ALCOHOL  
CITRAL  
CITRONELLOL  
COUMARIN  
EUGENOL  
EVERNIA PRUNASTRI  
EVERNIA FURFURACEA  
FARNESOL  
GERANIOL  
HEXYL CINNAMAL  
HYDROXYCITRONELLAL  
HYDROXYISOHEXYL 3-CYCLOHEXENE CARBOXALDEHYDE  
ISOEUGENOL  
LIMONENE  
LINALOOL  
METHYL 2-OCTYNOATE

Ces substances se retrouvent généralement dans des extraits végétaux, huiles essentielles ou compositions parfumantes.

## ANNEXE XI : PROTOCOLE D'ANALYSE POUR LES EPREUVES HEDONIQUES

La présente étude consiste à étudier les conservateurs à base de plante qui peuvent être utilisés dans les cosmétiques. Deux huiles essentielles ont été retenues dont l'huile essentielle de clou de girofle (*Eugenia caryophyllus*) et l'huile essentielle de Mandravasarotra (*Cinnamosma fragrans*).

Les essais ont été effectués sur des produits cosmétiques qui contiennent une proportion élevée en phase aqueuse dont un lait démaquillant (88% d'eau) et une lotion (92% d'eau).

Les conservateurs ont été incorporés à quatre (4) concentrations différentes pour les deux types de produits. La détection du seuil de tolérance de ces huiles essentielles a été déterminée par des analyses sensorielles sur des jurys entraînés. Par ailleurs, des analyses hédoniques sur des sujets naïfs permettront de sélectionner parmi les produits élaborés ceux qui seront finalement retenus.

### 1. Généralités

L'analyse sensorielle consiste à analyser les propriétés organoleptiques des produits par les organes des sens, à savoir la vue, l'ouïe, le goût, l'odorat et le toucher. D'après STONE et SIDEL, 1995: « L'analyse sensorielle est une méthode scientifique pour évoquer, mesurer, analyser et interpréter les réponses obtenues à partir de produits ayant été évalués par les organes des sens ».

### 2. Organisation pratique de l'analyse sensorielle

#### A. ANALYSE DU SEUIL DE DETECTION DES HUILES ESSENTIELLES DANS LES PRODUITS COSMETIQUES

Les essais ont été effectués sur des produits cosmétiques qui contiennent une proportion élevée en phase aqueuse dont un lait démaquillant (88% d'eau) et une lotion (92% d'eau).

Les conservateurs ont été incorporés à quatre (4) concentrations différentes pour les deux types de produits. Toutefois le seuil de tolérance de ces huiles essentielles ne saurait être déterminé que par des analyses sensorielles sur des jurys entraînés.

##### a) Les sujets

Puisque l'on cherche à déterminer des différences au niveau des caractéristiques organoleptiques des produits qui contiennent des concentrations croissantes en huiles essentielles, l'épreuve requerra quinze (15) à vingt (20) juges entraînés.

Les juges seront donc constitués du comité scientifique de l'HOMEOPHARMA et des étudiants au sein du département Industries Agricoles et Alimentaire à l'École Supérieure des Sciences Agronomiques.

### **b) Le test**

Avant l'épreuve proprement dite, des explications et des consignes seront fournis aux sujets sur le déroulement des tests et le remplissage des questionnaires. Ces derniers seront ensuite amenés à sentir chacun un échantillon d'huile essentielle pour en mémoriser l'odeur.

Chaque juge effectuera ensuite 4 types de test

- Premier test : détection du seuil de perception de l'huile essentielle dans des échantillons d'une lotion dépourvue de bases parfumantes
- Deuxième test : détection du seuil de perception de l'huile essentielle dans des échantillons d'une lotion qui contient des bases parfumantes
- Troisième test : détection du seuil de perception de l'huile essentielle dans des échantillons d'un lait démaquillant dépourvu de base parfumante
- Quatrième test : détection du seuil de perception de l'huile essentielle dans des échantillons d'un lait démaquillant dépourvu de base parfumante

Pour chaque test, cinq (5) échantillons de concentration croissante en huile essentielle seront placés de gauche à droite devant le sujet. Celui-ci devra sentir un à chaque échantillon et marquer dans le questionnaire à partir de quel échantillon il percevra l'odeur de l'huile essentielle préalablement sentie.

Chaque test sera espacé d'une pause de cinq minute afin d'éviter la fatigue sensorielle des juges.

### **c) Les échantillons**

Pour chaque test, les échantillons à préparer sont les suivantes

- Un échantillon de produit témoin qui ne contient pas d'huile essentielle
- Un échantillon de produit à une concentration en huile essentielle de 0,06%
- Un échantillon de produit à une concentration en huile essentielle de 0,12%
- Un échantillon de produit à une concentration en huile essentielle de 0,24%
- Un échantillon de produit à une concentration en huile essentielle de 0,48%

#### d) Le local

Les épreuves sensorielles se dérouleront dans la salle de réunion de l'HOMEOPHARMA Antsakaviro.

#### e) Matériels utilisés

##### - Les questionnaires

L'effectif des membres du comité scientifique s'élevant à 8, le nombre de questionnaire requis est **32** car chaque sujet effectuera 4 tests.

##### - Les flacons

- Flacons qui contiennent les échantillons d'huile essentielle : 8
- Flacons pour le premier test :  $5 \times 8$  sujets = 32 flacons
- Flacons pour le deuxième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 flacons
- Flacons pour le troisième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 flacons
- Flacons pour le quatrième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 flacons

##### - Les étiquettes

- Flacons qui contiennent les échantillons d'huile essentielle : 8
- Étiquettes pour le premier test :  $5 \times 8$  sujets = 32 étiquettes
- Étiquettes pour le deuxième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 étiquettes
- Étiquettes pour le troisième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 étiquettes
- Étiquettes pour le quatrième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 étiquettes

En résumé, le tableau suivant montre un récapitulatifs des matériels requis pour les épreuves d'analyse sensorielle du comité scientifique

Tableau LXXXIII: Matériels requis pour les analyses du seuil de détection

Matériels	Nombre
Questionnaires	32
Flacons	136
Étiquettes	136

## B. EPREUVES HEDONIQUES

### a) Les sujets

Puisque l'on cherche à déterminer des préférences parmi les produits qui contiennent des concentrations croissantes en huiles essentielles, l'épreuve requerra au minimum 60 sujets naïfs.

### b) Le test

Avant l'épreuve proprement dite, des explications et des consignes seront fournis aux sujets sur le déroulement des tests et le remplissage des questionnaires. Ces derniers seront ensuite amenés à sentir chacun les échantillons mis à leur disposition.

Chaque juge effectuera ensuite 2 types de test

- Premier test : l'épreuve de classement dans laquelle le juge classera du moins agréable au plus agréable les échantillons de lait démaquillant à différentes concentrations en huile essentielle placés devant lui
- Deuxième test : l'épreuve de classement dans laquelle le juge classera du moins agréable au plus agréable les échantillons de lotion à différentes concentrations en huile essentielle placés devant lui
- Troisième test : le test d'acceptabilité de chaque échantillon où le sujet évaluera un à un les échantillons de lait démaquillant et attribuera à chacun d'eux une note allant de 1 à 5 (du moins agréable au plus agréable) en justifiant les raisons de son choix.
- Quatrième test : le test d'acceptabilité de chaque échantillon où le sujet évaluera un à un les échantillons de lait démaquillant et attribuera à chacun d'eux une note allant de 1 à 5 (du moins agréable au plus agréable) en justifiant les raisons de son choix.

Remarque : les deux premiers tests se dérouleront ensemble dans la même journée, tandis que les deux derniers se feront ultérieurement.

Chaque test sera espacé d'une pause de cinq minute afin d'éviter la fatigue sensorielle des juges.

### c) Les échantillons

Pour chaque test, les échantillons à préparer sont les suivantes

- Un échantillon de produit à une concentration en huile essentielle de 0,06%
- Un échantillon de produit à une concentration en huile essentielle de 0,12%
- Un échantillon de produit à une concentration en huile essentielle de 0,24%

- Un échantillon de produit à une concentration en huile essentielle de 0,48%

#### d) Le local

Les épreuves sensorielles se dérouleront dans la salle de réunion de l'HOMEOPHARMA Antsakaviro.

#### e) Matériels utilisés

- Les questionnaires

L'effectif requis est au minimum 60 pour chaque test.

Pour le premier test : 60 questionnaires

Pour le deuxième test : 60 questionnaires

Pour le troisième test :  $60 \times 4 = 240$  questionnaires

Pour le quatrième test :  $60 \times 4 = 240$  questionnaires

- Les flacons

Les sujets effectueront le test par vague de 8

- Flacons pour le premier test :  $5 \times 8$  sujets = 32 flacons
- Flacons pour le deuxième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 flacons
- Flacons pour le troisième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 flacons
- Flacons pour le quatrième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 flacons

- Les étiquettes

- Étiquettes pour le premier test :  $5 \times 8$  sujets = 32 étiquettes
- Étiquettes pour le deuxième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 étiquettes
- Étiquettes pour le troisième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 étiquettes
- Étiquettes pour le quatrième test :  $5 \times 8$  sujets = 32 étiquettes

En résumé, le tableau suivant montre un récapitulatifs des matériels requis pour les épreuves d'analyse sensorielle du comité scientifique

Tableau LXXXIV: Matériels requis pour les épreuves hédoniques

Matériels	Nombre
Questionnaires	600
Flacons	128
Étiquettes	128

## ANNEXE XII : PROTOCOLE DE REALISATION DESMANIPULATIONS EN MICROBIOLOGIE POUR LE CHALLENGE TEST

### CULTURE EN MILIEU SOLIDE DE *Candida albicans*

#### 1. Préparation de l'inoculum

Les levures sont issues d'une culture de 48h à 20-25°C sur gélose Sabouraud pour *C. albicans*. Pour préparer la solution pour la suspension bactérienne, le diluant utilisé est une solution de peptone (1g/l) et de chlorure de sodium (9g /l).l'opacité de la solution est comparée avec une des solutions étalon de la gamme de solution de Mac Farland pour obtenir une concentration proche de  $1,5 \times 10^8$  Ufc/ml (figure 1). Lorsque les suspensions sont ajustées, elles sont immédiatement utilisées pour l'inoculation du produit.



Figure 34: Ajustement de l'inoculum (Cliché : Auteur, 2012)

#### 2. Contamination de la matrice

Pour chaque micro-organisme, un récipient de produit à examiner est ensemencé avec la suspension préparée précédemment, afin d'obtenir un inoculum de  $10^5$  –  $10^6$  germes viables par ml ou par g de préparation. Le volume de l'inoculum introduit ne doit pas dépasser 1% du volume du produit (0,5% pour la Pharmacopée américaine).

- Quantité inoculée pour le lait corporel

$$P_L = 31,86 \text{ g}$$

$$P_{\text{microorganisme}} = 0,30 \text{ g} \leq 1\% P_L$$

- Quantité inoculée pour la lotion

$$P_L = 47,23 \text{ g}$$

$$P_{\text{microorganisme}} = 0,45 \text{ g} \leq 1\% P_L$$

Pour assurer une répartition homogène, il faut mélanger soigneusement en agitant le produit dans son récipient. Le produit est ensuite maintenu à 20 - 25°C, et des dénombrements sont

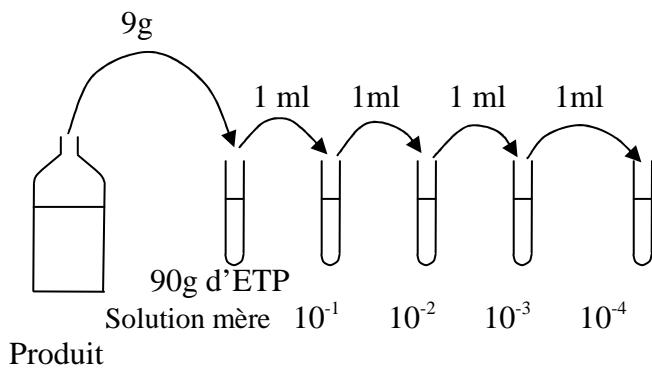
réalisés après 2, 7, 14 et 28 jours de conservation. Toutefois pour tenir compte de la quantité exacte de microorganismes inoculés dans le produit, un dénombrement est effectué immédiatement après l'inoculation.

Après que l'inoculum soit bien réparti dans le récipient contenant le produit, ce dernier est réparti dans 5 tubes à essais stériles recouverts par des cotons enveloppés dans des compresses puis par un papier en aluminium. De cette manière, un tube à essai correspond respectivement à une lecture effectuée à  $T = 0, 2, 7, 14$  et  $28$  jours de conservation.

### 3. Dénombrement en milieu solide de *Candida albicans*

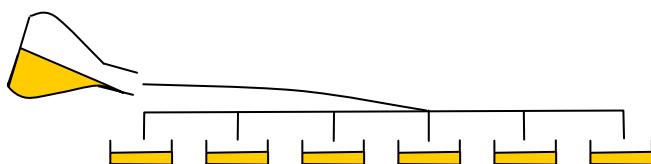
#### ♣ Manipulations :

- Stérilisation des embouts nécessaires pour l'utilisation de la micropipette.
- Stérilisation dans l'étuve des boîtes de pétri et des pipettes pour la manipulation
- Dilution décimale jusqu'à  $10^{-4}$  avec les tubes à essai remplis d'eau peptonée à l'aide d'une micropipette en restant à moins de 30cm du Bec Bunsen :



Prélever ; toujours à l'aide d'une micropipette ; 0,1ml ou  $100\mu\text{l}$  de chaque dilution et le verser dans chaque boîte de pétri.

- Verser le milieu en surfusion dans les 6 boîtes de pétri vides préalablement stérilisées (dont l'une servira de témoin).



- Couvrir les boîtes et homogénéiser en agitant légèrement. Faire passer rapidement la flamme du Bec Bensen dans la boîte. Recouvrir et entourer de film alimentaire.
- Incuber à  $20$  à  $25^\circ\text{C}$ .

## CULTURE EN MILIEU SOLIDE DE *Staphylococcus aureus*

### 1. Préparation de l'inoculum

Les bactéries sont issues d'une culture 18-24h à 30-35°C sur Baird Parker. Pour préparer la solution pour la suspension bactérienne, le diluant utilisé est une solution de peptone (1g/l) et de chlorure de sodium (9g/l). L'opacité de la solution est comparée avec une des solutions étalon de la gamme de solution de Mac Farland pour obtenir une concentration proche de  $1,5 \times 10^8$  Ufc/ml (figure 1). Lorsque les suspensions sont ajustées, elles sont immédiatement utilisées pour l'inoculation du produit.



Figure 35: Ajustement de l'inoculum (Cliché : Auteur, 2012)

### 2. Contamination de la matrice

Pour chaque micro-organisme, un récipient de produit à examiner estensemencé avec la suspension préparée précédemment, afin d'obtenir un inoculum de  $10^5$  –  $10^6$  germes viables par ml ou par g de préparation. Le volume de l'inoculum introduit ne doit pas dépasser 1% du volume du produit (0,5% pour la Pharmacopée américaine).

- Quantité inoculée pour le lait corporel

$$P_L = 26,52 \text{ g}$$

$$P_{\text{microorganisme}} = 0,22 \text{ g} \leq 1\% P_L$$

- Quantité inoculée pour la lotion

$$P_L = 41,51 \text{ g}$$

$$P_{\text{microorganisme}} = 0,38 \text{ g} \leq 1\% P_L$$

Pour assurer une répartition homogène, il faut mélanger soigneusement en agitant le produit dans son récipient. Le produit est ensuite maintenu à 20 - 25°C, et des dénombvements sont

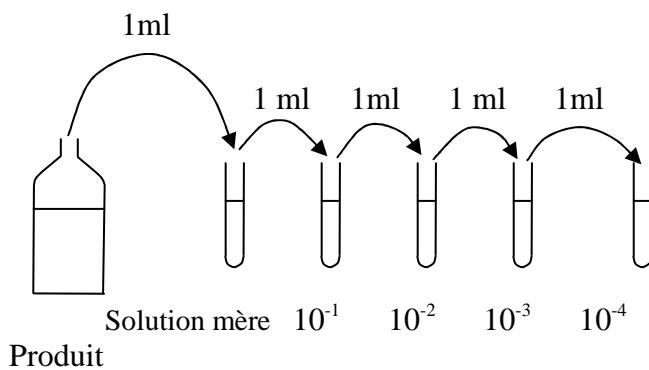
réalisés après 2, 7, 14 et 28 jours de conservation. Toutefois pour tenir compte de la quantité exacte de microorganismes inoculés dans le produit, un dénombrement est effectué immédiatement après l'inoculation.

Après que l'inoculum soit bien réparti dans le récipient contenant le produit, ce dernier est réparti dans 5 tubes à essais stériles recouverts par des cotons enveloppés dans des compresses puis par un papier en aluminium. De cette manière, un tube à essai correspond respectivement à une lecture effectuée à  $T = 0, 2, 7, 14$  et  $28$  jours de conservation.

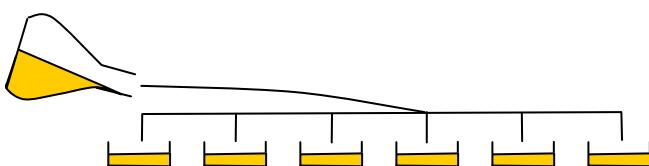
### 3. Dénombrement en milieu solide de *Staphylococcus aureus*

#### ♣ Manipulations :

- Stérilisation des embouts nécessaires pour l'utilisation de la micropipette.
- Stérilisation dans l'étuve des boîtes de pétri et des pipettes pour la manipulation
- Dilution décimale jusqu'à  $10^{-4}$  avec les tubes à essai remplis d'eau peptonnée à l'aide d'une micropipette en restant à moins de 30cm du Bec Bunsen :



- Verser le milieu en surfusion dans les 6 boîtes de pétri vides préalablement stérilisées (dont l'une servira de témoin).



- Ensemencer à l'aide d'une micropipette à la surface des milieux de culture à boîte de pétri 0,1ml de chaque dilution.
- Étaler à l'aide d'une anse de platine pour répartir l'inoculum sur toute la surface du milieu.
- Couvrir les boîtes et faire passer rapidement la flamme du Bec Bensen dans la boîte. Recouvrir et entourer de film alimentaire.
- Incuber à 20 à 25°C.



UNIVESITE D'ANTANANARIVO  
ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES



Monique Miaranalisoa  
RANDRIANARIVO  
Lot VI 23 C Ambatoroka  
Antananarivo 101  
[alisoarandrianarivo@yahoo.fr](mailto:alisoarandrianarivo@yahoo.fr)

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome  
Option Industries Agricoles et Alimentaires

**Étude des conservateurs naturels pour les produits cosmétiques : cas de l'huile essentielle de girofle clous (*Eugenia caryophyllata*) et de mandravasarotra (*Cinnamosma fragrans*)**

## RESUME

L'étude des conservateurs à base de plante dans les produits cosmétiques a été réalisée. Pour ce faire, les huiles essentielles de *mandravasarotra* (*Cinnamosma fragrans*) et de clous de girofle (*Eugenia caryophyllata*) ont été incorporées à différentes concentrations dans deux types de produits : un lait démaquillant et une lotion.

Les résultats des CPG de ces huiles essentielles confirment la présence des composantes antimicrobiennes à savoir le 1,8-cinéole à 47,9% dans l'huile essentielle de *mandravasarotra* ainsi que l'eugénol à 86,99% dans l'huile essentielle de girofle clous. Les analyses sensorielles ainsi que les tests de vieillissement à 45°C ont permis de faire un choix sur les concentrations en huile essentielles à expérimenter pour le « challenge test ».

L'huile essentielle de girofle clous utilisée seule à 0,24% dans les laits et 0,12% dans les lotions, ou en synergie avec l'huile essentielle de *mandravasarotra* à (0,18%+0,18%) dans les laits et (0,12%+0,06%) dans les lotions ont été efficaces contre *Candida albicans*, par contre elles n'ont pas réussi à réduire la population de *Staphylococcus aureus* selon les valeurs exigées par les normes.

**Mots clés** : cosmétique, huile essentielle, *Cinnamosma fragrans*, *Eugenia caryophyllata*, conservateur, challenge test

## ABSTRACT

The study of plant-based preservatives in cosmetic products was performed. To do this, the essential oils of *mandravasarotra* (*Cinnamosma fragrans*) and Clove (*Eugenia caryophyllata*) were incorporated at different concentrations in two types of products: cleansing milk and lotion.

The results of GPC of these essential oils confirm the presence of antimicrobial compounds namely 1,8-cineole to 47.9% in the essential oil of *mandravasarotra*, and eugenol to 86.99% in the essential oil clove nails. Sensory analyzes and aging tests at 45 ° C allowed making a choice on the concentrations of essential oil to test for the "challenge test".

The essential oil of clove nails used alone to 0.24% in milk and 0.12% in lotions, or synergistically with the essential oil of *mandravasarotra* to (0.18%+0.18%) in milk and (0.12%+0.06%) in lotions were effective against *Candida albicans*, but they have not succeeded in reducing the population of *Staphylococcus aureus* according to the values required by the standards.

**Keywords**: cosmetics, essential oil, *Cinnamosma fragrans*, *Eugenia caryophyllata*, conservative, challenge test

## FAMINTINANA

Natao ny fikarohana momba ireo laro fitahirizana vita avy amin'ny zava-maniry hitahirizana ny tambatra kosmetika. Ny menaka voafantina avy amin'ny mandravasarotra (*Cinnamosma fragrans*) sy ny voan-jirofo (*Eugenia caryophyllata*) no voafantina tamin'izany ary nafangaro tamin'ireo tambatra kosmetika "lait démaquillant" ary lotion tamin'ny taha maromaro avy amin'ny maivana makany amin'ny mahery.

Ny taha 0,24% sy 0,12% ny menaka voan-jirofo izay natsofoka irery tao anaty "lait démaquillant" sy ny "lotion" ary ny taha (0,18%+0,18%) ary (0,12%+0,06%) ny menaka voan-jirofo nafangaro tamin'ny mandravasarotra dia hita fa nandaitra tamin'ny *Candida albicans*, saingy tsy nandaitra tamin'ny *Staphylococcus aureus* raha ny sanda ara-dalàna no jerena.

**Teny manan-danja**: kosmetika, menaka voafantina, *Cinnamosma fragrans*, *Eugenia caryophyllata*, laro fitahirizana, challenge test