



# Soutien analytique et technique à la mise en conformité des petites exploitations du secteur PPAM pour s'adapter à l'évolution de la réglementation

## Projet « COS20 »

~ ~ ~

## Rapport final

**Projet soutenu et financé à 70 % par :**



# Tables des matières

1	Lexique des termes employés dans la suite du rapport.....	3
2	Contexte et historique .....	3
3	Objectifs de l'étude COS20 .....	4
4	Matériel et méthodes.....	4
5	Résultats .....	9
6	Problématiques rencontrées .....	33
7	Liste des livrables.....	33
8	Conclusion .....	33
9	Annexe 1 : Détail du calendrier réalisé.....	34
10	Annexe 2 : Problématiques pratiques.....	36

# 1 Lexique des termes employés dans la suite du rapport

**Massif** : désigne la zone organisationnelle à laquelle est rattaché un producteur SIMPLES (il existe 12 massifs). Les massifs ont un fonctionnement propre pour l'organisation des contrôles par pairs, le recrutement de nouveaux producteurs et la vie locale du syndicat. Ils se réunissent 2 à 3 fois par an.

**MH** : sigle utilisé pour « macérat huileux ».

**Producteurs SIMPLES** : désigne tous les producteurs et productrices de plantes médicinales qui respectent le cahier des charges SIMPLES et sont soumis au contrôle annuel par pairs.

**Réplicats** : désigne des échantillons différents correspondant exactement au même mode opératoire. La multiplication du nombre de réplicats permet une plus grande puissance statistique dans l'interprétation des résultats.

**Volontaires** : désigne les producteurs et productrices ayant été inclus·es dans l'étude à la suite d'une candidature volontaire.

## 2 Contexte et historique

Le Syndicat SIMPLES regroupe depuis 1982 des producteurs de plantes aromatiques et médicinales. Il propose un cahier des charges très strict en ce qui concerne la protection de l'environnement, la préservation des ressources floristiques, la qualité de la production et le respect du consommateur. En réponse à un fort besoin émanant du réseau, le Syndicat SIMPLES travaille depuis plusieurs années sur la réglementation cosmétique, pour suivre ses évolutions et accompagner ses adhérents dans leurs démarches. En 2019, un volet cosmétique a été intégré au Cahier des Charges du Syndicat, applicable à partir de 2021 avec 3 ans de transition pour se mettre en conformité. En parallèle, le Syndicat continue son travail pour apporter des aides techniques à ses adhérent·es et une optimisation des coûts inhérents à cette mise en conformité.

Le projet COS20 s'inscrit dans la continuité des travaux précédemment engagés pour les membres du Syndicat. En 2013, le Syndicat a été financé par FranceAgriMer pour la création d'une « mallette cosmétique » composée de documents de support techniques (profils toxicologiques, fiches techniques, modes opératoires, modèles de Dossier Information Produit) rédigés à partir de recherches bibliographiques. Grâce à un partenariat avec des évaluatrices de la sécurité, la mallette issue de ce travail permettait une mise en conformité facilitée pour les macérats huileux unitaires de 10 plantes avec une huile essentielle à moins de 1 % parmi la lavande fine ou le romarin. À l'époque, les analyses de produits n'avaient pas été incluses dans le financement et étaient prévues comme une deuxième étape dans le déroulement du projet pour compléter la mallette avec des données directes non bibliographiques. En 2019, le Syndicat a fait le point sur l'utilisation de cette mallette et recensé parmi ses adhérents un grand nombre de produits qui n'entraient pas dans le cadre initialement prévu.

Le non-respect de ce cadre a d'ailleurs conduit à l'arrêt du partenariat avec les évaluatrices du risque, ce qui a desservi les adhérent·es. Il a paru alors nécessaire de repenser les outils techniques créés, en les refondant à partir de données toxicologiques des macérations traditionnellement produites (en complément des données bibliographiques).

L'étude envisagée au départ était très vaste incluant des études sur la présence de pesticides dans les cosmétiques ainsi que des analyses sur les hydrolats, parfois utilisés dans les cosmétiques. Les coûts d'analyse se sont avérés exponentiels au regard du nombre d'échantillons, de plantes à étudier et de molécules à rechercher. Le comité de pilotage a par conséquent fait le choix de restreindre l'étude à la recherche des molécules d'intérêt au sein des macérats huileux obtenus suivant les protocoles usuels des producteurs SIMPLES. En parallèle une étude systématique de l'impact des différents modes de fabrication des extraits sur leur oxydation a été effectué (paramètre important pour la sécurité du produit). De plus grâce à la participation de toxicologues au sein du groupe de pilotage, il a été possible de mettre en place des partenariats uniques avec des laboratoires publiques de recherche permettant de réduire ainsi les coûts d'analyse et de bénéficier d'expertise innovante. Ces choix se sont avérés fructueux puisque les résultats donneront lieu à publication. Ce rapport montre dès à présent des résultats originaux qui permettront aux producteurs d'optimiser leur protocole de macération, ceci grâce à une meilleure connaissance de plusieurs paramètres conditionnant la sécurité et l'efficacité des produits contenant ces extraits.

Grâce au soutien de FranceAgriMer, ce programme à la logistique complexe a pu voir le jour. Le calendrier de la mise en place de cette étude est détaillé dans l'annexe 1.

### 3 Objectifs de l'étude COS20

L'étude a pour objectif de comparer différents modes opératoires de production d'extraits lipidiques artisanaux de plantes (ci-après appelés macérats huileux ou MH) au regard de la stabilité oxydative et de la composition en métabolites secondaires de plantes. À partir des résultats, nous souhaitons pouvoir déterminer quels modes opératoires ont les meilleurs rendements d'extraction, lesquels préservent le mieux de la peroxydation lipidique, et dans quels cas il peut être pertinent d'utiliser l'huile essentielle de la plante plutôt que son extrait lipidique (selon les principes actifs recherchés).

À terme, nous souhaitons que les données produites par l'étude servent de référence pour l'évaluation sécurité de produits cosmétiques correspondant. En publiant les résultats, nous souhaitons faciliter l'accès des producteurs aux évaluations (diminution des coûts). Cette étude fait également partie d'une démarche qualité interne puisque nous obtiendrons des informations sur les MH des producteurs SIMPLES qui ne sont pas disponibles dans la bibliographie – d'une part parce que les MH sont généralement peu étudiés, d'autre part parce que les modes opératoires utilisés ici sont traditionnels ce qui n'est pas le cas des modes opératoires des études scientifiques et industrielles.

## 4 Matériel et méthodes

### 4.1 Sélection des plantes étudiées

Les producteurs et productrices du Syndicat SIMPLES font chaque année de nombreux MH pour une utilisation principalement cosmétique (alimentaire parfois). Les modes opératoires, territoires, matières premières, intrants, matériel, etc. varient considérablement d'une personne à l'autre, c'est pourquoi l'analyse directe de ces MH, bien que très intéressante, ne pourrait pas fournir de résultats solides d'un point de vue scientifique pour en tirer des conclusions. Il a donc été décidé de mettre au point une étude expérimentale pour la production de MH à analyser.

Un premier travail bibliographique avait été mené entre 2013 et 2015 sur 10 plantes. À la suite d'un recueil de pratiques entre janvier et octobre 2019, 24 plantes ont été pré-sélectionnées pour l'étude COS20, et 11 ont été retenues (dont huit faisaient partie de la première étude bibliographique) :

- achillée millefeuille (*Achillea millefolium* L.),
- camomille romaine (*Chamaemelum nobile* (L.) All),
- consoude officinale (*Symphytum officinale* L.),
- hélichryse d'Italie (*Helicrysum italicum* (Roth) G. Don),
- laurier noble (*Laurus nobilis* L.),
- lavande officinale (*Lavandula angustifolia* Mill.),
- menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.),
- millepertuis (*Hypericum perforatum* L.),
- plantain (*Plantago lanceolata* L.),
- romarin (*Rosmarinus officinalis* L.),
- souci (*Calendula officinalis* L.).

La liste définitive des plantes sélectionnées a été établie en discussion collégiale au regard des fréquences de production et de la pertinence toxicologique pour l'évaluation sécurité. La pâquerette qui a fait partie de l'étude pour les travaux sur les peroxydes a été par la suite retirée pour des contraintes budgétaires.

### 4.2 Méthodologie pour la production des MH à analyser

Le mode opératoire général de production des MH était le suivant : cueillette et tri de la partie de plante à mettre en macération ( $\pm$  séchage le cas échéant) ; pesée, mise en huile et macération selon le mode opératoire spécifique ; filtration ; échantillonnage.

Des modes opératoires spécifiques ont été créés pour chaque plante. Ils définissent l'état et la partie de plante à mettre en huile, le type de macération, la durée de la macération, et le type d'huile à utiliser. En prenant en compte les questions financières, logistiques et scientifiques, le nombre de répliqués par plante et par mode opératoire a été fixé entre 3 au minimum et 5 au maximum.

Était également remis à chaque volontaire une charte à signer pour l'engagement mutuel à l'étude, un calendrier personnalisé ainsi qu'un document explicatif générique.

L'ensemble de ces documents constituent les « kits » qui ont été délivrés dans des pochettes carton aux volontaires, en complément du matériel et des matières premières fournies (voir pièce-jointe).

### 4.3 Matériels et matières premières

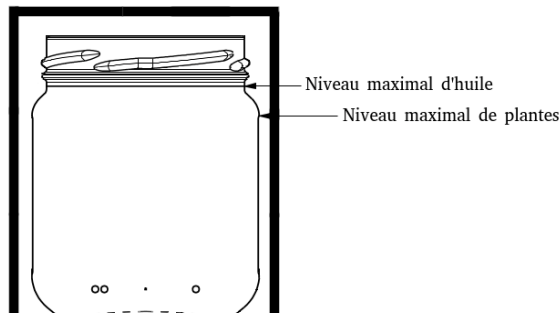
Deux types d'huiles ont été utilisés pour les MH :

- huile de tournesol oléique, agriculture biologique, obtenue par procédés mécaniques uniquement, produite dans la Drôme par EARL de Lierne (même lot pour tous les MH) ;
  - Composition en acides gras majoritaires : acide palmitique 3,9 %, a. stéarique 2,6 %, a. oléique 86,5 %, a. linoléique 3,4 %.
  - Indice de peroxyde : 7,7 meq de O<sub>2</sub>/kg.
- huile d'olive, agriculture biologique, obtenue par procédés mécaniques uniquement, produite en Espagne par Sororidad S.L. (Olivar de La Luna, même lot pour tous les MH).
  - Composition en acides gras majoritaires : acide palmitique 10 %, a. stéarique 3 %, a. oléique 75 %, a. linoléique 5,5 %.
  - Indice de peroxyde : 13,3 meq de O<sub>2</sub>/kg.

Verrerie :

- Macération dans des pots en verre transparent de 228mL (TO63) ;
- Filtration avec des filtres en fibres de cellulose naturelle et résine synthétique, exempt de chlore (papier à filtrer PRAT DUMAS réf. 314) à l'aide d'un entonnoir en verre ou inox (plastique pour certains volontaires) dans un flacon en verre brun de 200mL ;
- Si les macérations se sont faites en pot ouvert, le pot était recouvert d'une compresse de polyester non tissé non stérile 10x10cm Vliwasoft de la marque Velpeau (laboratoire Lohmann & Rausher), attachée autour du culot à l'aide d'un élastique en caoutchouc ;
- Les échantillons de MH étaient prélevés dans des flacons en verre brun de 15mL ; les échantillons d'huile essentielle ont été prélevés dans des flacons en verre brun de 5mL (1mL par flacon) ;
- Les occultants étaient des cylindres en carton épais de 5 mm environ et de 7,5cm de diamètre avec un côté fermé et un autre ouvert. Ils se posaient par-dessus le pot et restaient en place

Positionnement de l'occultant



pendant toute la durée de la macération (voir dessin ci-dessous). Ils empêchaient toute lumière d'atteindre le pot.

Les verreries ont été achetées chez Nevière ([pro.neviere.com](http://pro.neviere.com)), fournisseur de matériel pour professionnels de l'apiculture. Les filtres ont été achetés à la SARL PRAT DUMAS (partenaire du Syndicat SIMPLES pour les fournitures en gros aux producteurs). Les occultants ont été fabriqués dans des rouleaux de tissu en carton récupérés chez des artisans couturiers résidant à l'Usine Vivante (espace de coworking à Crest, siège du Syndicat SIMPLES). Les compresses non tissées ont été achetées auprès de la Pharmacie du Diois (75 avenue Sadi Carnot, 26150 Die).

## 4.4 Protocole

Plusieurs techniques de macérations ont été étudiées.

### 4.4.1 Etat de la plante

#### Frais/Sec :

**FRAIS** : La plante a été mise en huile dans les 2 heures suivant la récolte.

**SEC** : La plante a été complètement séchée avant d'être mise en huile.

Le ratio de plantes a été défini en fonction des pratiques des producteurs, de la littérature et des taux d'humidité des plantes. Il est de 18% en masse en frais et 8% en masse en sec pour l'achillée, la camomille et l'hélichryse. Pour la lavande c'est 15% quel que soit l'état de la plante. Pour la menthe poivrée c'est 37% en frais, et 8% en sec. Pour le romarin c'est 37% en frais et 15% en sec. Pour le laurier, c'est 52% en frais et 22% en sec. Pour le souci c'est 18% et 9% en sec. Pour le plantain c'est 15% en frais et 8% en sec. Enfin pour le millepertuis c'est 18% en frais uniquement.

### 4.4.2 Exposition à l'air :

#### Ouvert/fermé

**OUVERT** : Le pot est recouvert par une gaze attachée avec un élastique, ce qui permet les échanges d'air en protégeant le macérat de macro-contaminants extérieurs. Tous les soirs, soulever la gaze et agiter les plantes avec un agitateur en verre ou une spatule en inox, puis replacer la gaze. Tapoter le pot sur une surface dure pour faire remonter toutes les bulles d'air. Noter chaque agitation sur la fiche information correspondante

**FERMÉ** : Le pot est fermé hermétiquement par un couvercle. Les échanges gazeux avec l'extérieur ne sont pas possibles. Le pot n'est pas ouvert pendant toute la durée de la macération. Tous les soirs, le pot est retourné tête en bas trois fois (sans être secoué). Tapoter le pot sur une surface dure pour faire remonter toutes les bulles d'air. Noter chaque agitation sur la fiche information correspondante

Nota pour le bain marie : **OUVERT** : Le pot reste ouvert pendant toute la durée de la macération

### 4.4.3 Type de macération : Solaire/solaire occulté / température ambiante/bain marie

**SOLAIRE** : Le pot est exposé à la lumière directe du soleil pendant la durée quotidienne la plus longue possible. Le pot doit être placé à l'abri des intempéries et de l'humidité. Tous les soirs, le pot est rentré à l'intérieur dans une pièce sèche et tempérée.

**SOLAIRE OCCULTÉ** : Le pot est recouvert d'un occultant puis exposé à la lumière directe du soleil pendant la durée quotidienne la plus longue possible. Le pot doit être placé à l'abri des intempéries et de l'humidité. Tous les soirs, le pot est rentré à l'intérieur dans une pièce sèche et tempérée

**T° AMBIANTE** : Le pot est laissé à température ambiante et stable (entre 15 et 25°C) à l'abri de toute lumière pendant toute la durée de la macération

**BAIN-MARIE** : La macération s'effectue dans un pot mis au bain-marie à feu doux. Le pot est mis dans l'eau froide. Un thermomètre est placé à l'intérieur du pot. Une fois que l'huile a atteint les 45°C, couper le feu, sortir le thermomètre de l'huile et laisser le pot dans l'eau chaude. Répéter cette manipulation une fois par jour sur 3 jours consécutifs, le pot restant ouvert. Noter chaque jour l'heure du bain-marie et la température maximale mesurée dans le macérat

### 4.4.4 Type d'huile

Deux huiles ont été utilisés : olive et tournesol

Voir paragraphe 4.3

### 4.4.5 Durée de macération

Durée : 3jours/21jours/42 jours

Bain marie : Le temps entre la mise en huile des plantes et la filtration est précisément égal à 3 jours.

Tous les autres : 21 jours (sauf Laurier 42 jours)

## 4.5 Recrutement des volontaires

Le recrutement des personnes pour mettre en œuvre l'étude s'est fait parmi les producteurs SIMPLES uniquement (pour garantir le respect du cahier des charges) sur la base du volontariat en remplissant un questionnaire diffusé par mail après une première présentation à l'assemblée générale. Les objectifs de l'étude et les plantes étudiées étaient expliqués dans le mail de présentation, et le questionnaire permettait de savoir quelles plantes étaient habituellement produites et transformées par les volontaires. Chaque personne a ensuite été contactée par téléphone pour valider ses disponibilités et ses capacités de travail et de fourniture de matières premières. 23 personnes se sont portées volontaires, 18 ont été retenues au final (2 personnes retirées après l'explication du protocole,



et 3 personnes non retenues pour réduire la multiplicité des intervenants). Les volontaires ont fait les macérations de 2 plantes au minimum et 5 au maximum. Ils et elles ont été divisées en 2 groupes : le groupe des plantes à essence (dont l'huile essentielle est également analysée en comparaison avec la macération lipidique) et le groupe des plantes « sans essence ». 3 volontaires ont fait des macérats dans les deux groupes. Les analyses ont également été divisées selon ces deux groupes : les macérations du premier groupe (plantes à essence) ont été analysées par l'ICSN (CNRS de Gif-sur-Yvette), celles du second groupe par le département de pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Bruxelles (ULB, Belgique).

Une fois que le groupe final de 18 volontaires a été constitué, le matériel et les instructions ont été envoyées par colis ou distribuées en main propre à chaque personne.

## 5 Résultats

Ce paragraphe rassemble les différents résultats obtenus durant cette étude. Dans un premier temps seront présentés les résultats sur l'oxydation des huiles en fonction du protocole employé et de la plante mise en macération. Dans un second temps, nous présentons les résultats concernant les recherches de molécules d'intérêt. Les plantes sont alors divisées en deux groupes : celles contenant des huiles essentielles et les autres.

### 5.1 Peroxydation des macérations huileuses

Les analyses d'indices de peroxyde ont été réalisés par le laboratoire Lexva Analytique. On considère un indice de peroxyde élevé au-delà de  $15\text{meqO}_2/\text{kg}^1$ . La peroxydation lipidique conduit à la dégradation d'acides gras essentiels et des vitamines A et E. Certains composés de dégradation oxydative présentent une toxicité potentielle : monomères cycliques, polymères, furanes, 4-hydroxynonéal. La stabilité oxydative des huiles dépend de leur teneur en acides gras insaturés : l'huile de tournesol oléique choisie pour l'étude a une composition plus proche de l'huile d'olive qu'une huile de tournesol classique<sup>2</sup>.

Les analyses statistiques sur les résultats d'indices de peroxyde ont été faites sur le logiciel R<sup>3</sup> à l'aide de tests de Wilcoxon 2 à 2 (test non paramétrique car les données ne suivent pas une loi de distribution normale).

Pour l'analyse statistique des résultats de peroxydation lipidique, 25 échantillons ont été retirés a priori car le protocole n'avait pas été respecté (complètement exclus des analyses statistiques) et 84

<sup>1</sup> [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B19-1981%252FCXS\\_019f.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B19-1981%252FCXS_019f.pdf)

<sup>2</sup>Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage Article in OCL - Oilseeds and Fats, Crops and Lipids · March 2012. DOI: 10.1051/ocl.2012.0440

<sup>3</sup> <https://www.r-project.org/>

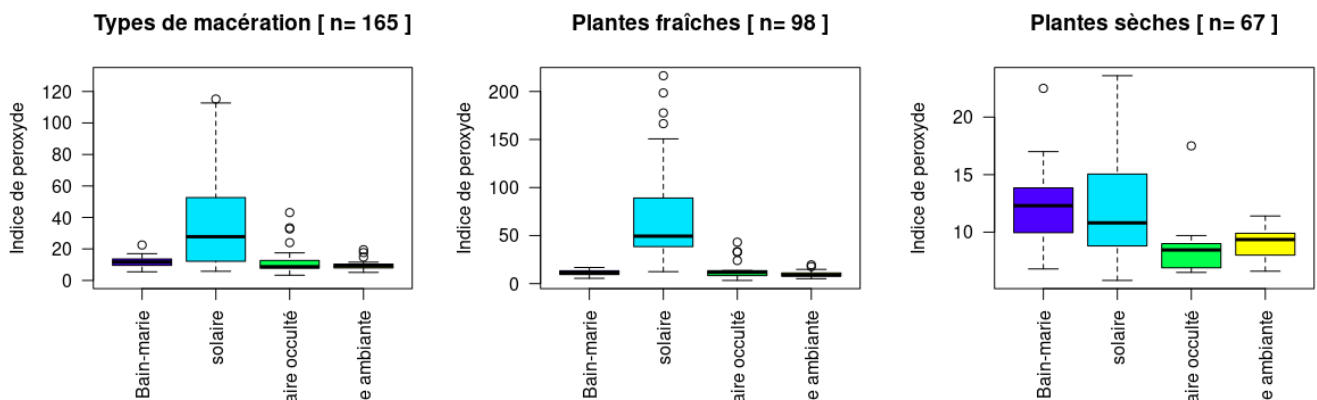
échantillons sont écartés des analyses globales car les informations recueillies mettent en avant un doute quand à ce respect (lorsque ce n'est pas précisé, l'analyse statistique est faite sur ce dernier jeu de données, le plus nettoyé). Pour chaque résultat présenté, le nombre d'échantillons sur lequel a été fait l'analyse est indiqué.

À propos de l'analyse statistique, voici le vocabulaire utilisé : « échantillon » désigne ici un macérat analysé ; variable désigne un facteur étudié chez les échantillons ; modalité désigne une valeur possible pour une variable. Ci-après seront étudiées les principales variables : le type de macération, l'état de la plante, l'huile, l'exposition à l'air, et la plante. Lorsqu'une différence est dite statistiquement significative, la p-value utilisée est inférieure à 0,001.

## 5.1.1 Type de macération

La variable « Type de macération » a quatre modalités : « Bain-marie », « solaire », « solaire occulté » et « température ambiante ». Pour éviter les biais dans l'analyse sur cette variable nous avons exclu les échantillons témoins (solaire uniquement), les échantillons dans l'huile d'olive ainsi que les échantillons de laurier (macérations solaires de 42 jours). La sélection a ensuite été divisée selon l'état de la plante : frais ou sec.

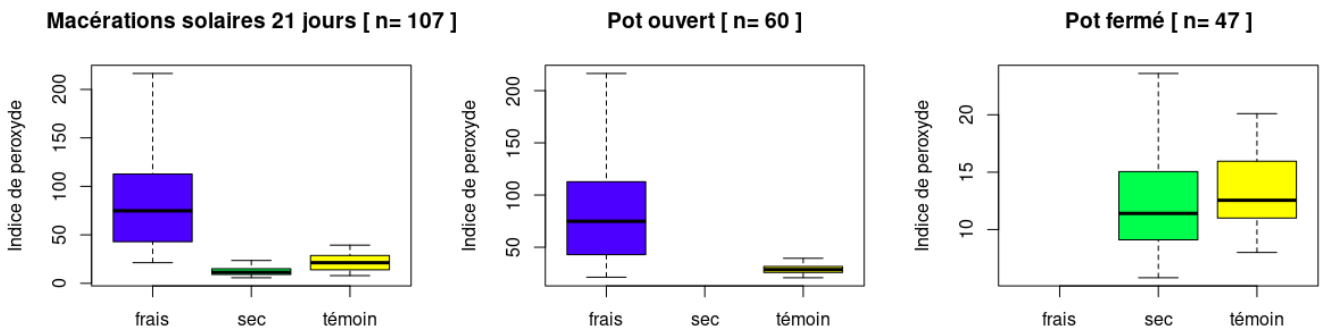
Les résultats des tests statistiques se lisent également au niveau graphique : la macération solaire augmente de façon statistiquement significative la peroxydation des macérats par rapport à tous les autres types de macération. Cependant lorsqu'on fait une sous-analyse selon l'état de la plante, on voit que cela reste valable pour les plantes fraîches uniquement (pas de différence statistiquement significative entre les types de macérations pour les plantes sèches). Nous n'observons pas de différence sur les autres types de macération entre eux.



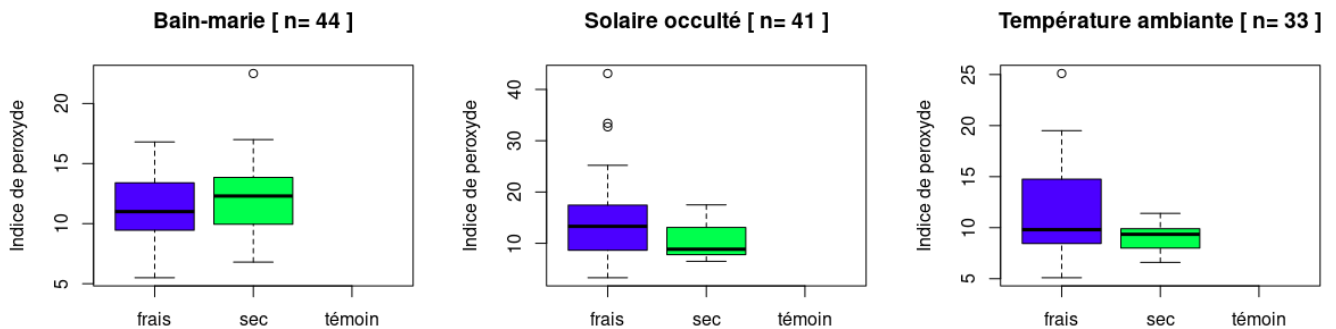
## 5.1.2 État

La variable « État » présente trois modalités : « frais », « sec » et « témoin ». Les échantillons « témoin » sont des pots d'huile sans plante mis dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons avec plante des macérations « solaire ». Pour éviter les biais liés aux types de macération et pouvoir interpréter les résultats des témoins, l'analyse sur la variable « État » a été séparée selon le type de macération.

Les résultats montrent que les plantes fraîches augmentent la peroxydation par rapport aux plantes sèches et à l'absence de plantes (témoins) dans les macérations solaires de 21 jours.

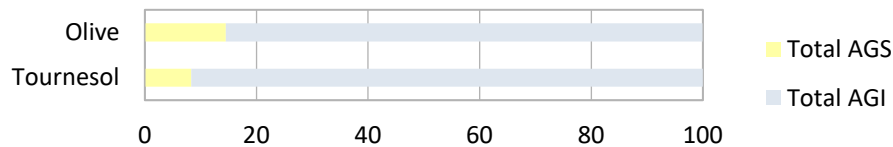


En revanche, concernant les autres types de macération, nous n'observons pas de différence statistiquement significative selon l'état de la plante.



### 5.1.3 Huile

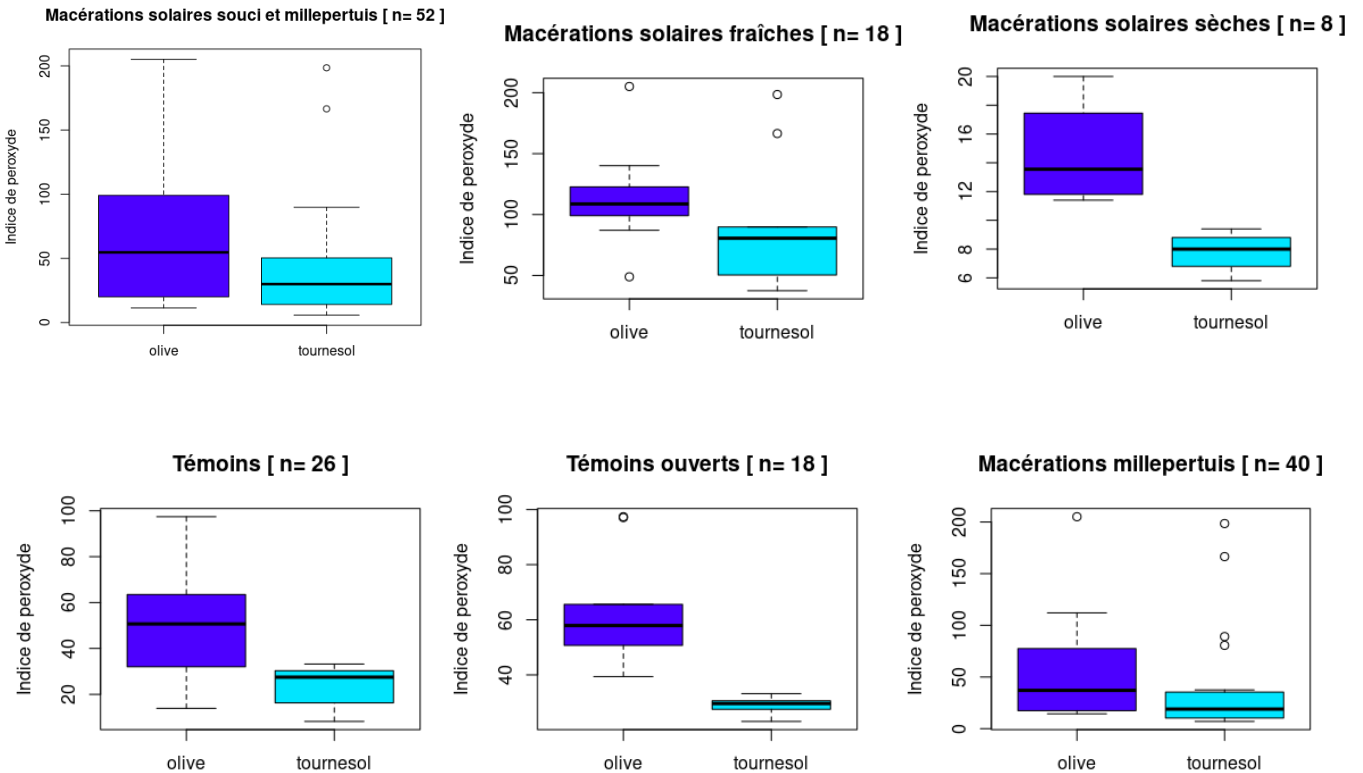
Les huiles utilisées présentait des différences de composition en acide gras et de taux de peroxyde. Nous n'avons pas pu obtenir les concentrations en tocophérol de ces huiles.



La variable « Huile » présente deux modalités : « tournesol » et « olive ». Les comparaisons d'huiles ont été faite uniquement sur le millepertuis et le souci. L'analyse statistique a été faite ici sur les données partiellement nettoyées.

Les résultats présentent une différence significative entre les deux huiles avec une p-value de 0,05. La p-value descend en-dessous de 0,01 lorsque l'analyse est faite uniquement sur les témoins.

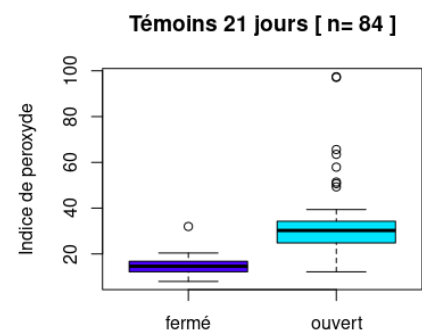
Ces résultats sont peu interprétables car fait sur 2 huiles seulement. On ne peut pas extrapoler la différence à toutes les huiles d’olive et toutes les huiles de tournesol. Les taux de peroxyde des huiles utilisées ont été mesurés et l’huile d’olive était initialement plus oxydée que l’huile de tournesol (13,3 meq de O<sub>2</sub>/kg contre 7,7). Pour ces deux huiles, certains échantillons de macérats huileux présentent des taux de peroxyde inférieurs à ceux mesurés sur les huiles seules : Effet de la conservation ou effet des plantes présentes dans le macérat ? Il n’est pas possible de conclure.



### 5.1.4 Exposition à l’air

La variable « Exposition à l’air » présente deux modalités : « ouvert » ou « fermé ». Pour étudier uniquement cette variable en évitant le biais lié à l’état de la plante (puisque les macérations avec plantes fraîches sont ouvertes et celles avec plantes sèches sont fermées), cette analyse a été faite uniquement sur les pots témoins de 21 jours (c’est-à-dire à l’exclusion des macérations de laurier et consoude), à partir des données partiellement nettoyées.

L’analyse statistique montre une différence statistiquement significative entre les modalités « ouvert » et « fermé ».

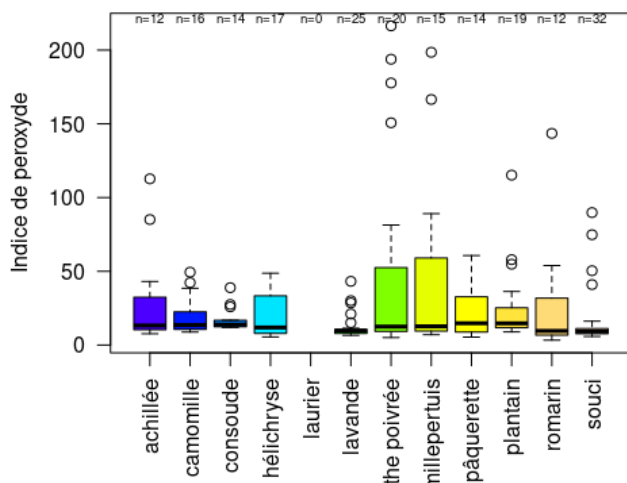


## 5.1.5 Plante

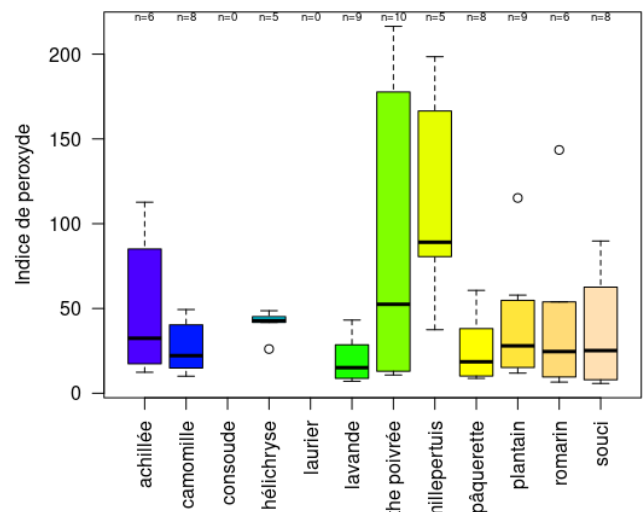
La variable « Plante » présente douze modalités : une pour chaque plante étudiée. L'analyse de cette variable a été faite sur les données partiellement nettoyées, sur données générales et en séparant les données selon le type de macération. Les échantillons témoins, dans l'olive, et le laurier ont été exclu de cette analyse.

Les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure à une différence entre les plantes quant à leur action sur la peroxydation lipidique.

Macérations hors témoins et olive [ n = 196 ]



Macérations solaires hors témoins et olive [ n = 74 ]



## 5.1.6 Synthèse

Les protocoles impliquant une macération solaire de plantes fraîches avec pot ouvert favorisent beaucoup plus l'oxydation que les autres protocoles. En revanche, en l'absence de plantes fraîches et lorsque l'exposition à l'air n'est pas possible, nous ne mettons pas en évidence de différence entre la macération solaire et les autres types de macération. Inversement, en l'absence de lumière directe du soleil, l'état de la plante ne semble pas impacter l'état oxydatif du macérat.

## 5.2 Résultats sur les plantes à huile essentielle

Cette étude a permis non seulement de préciser la composition biochimique de macérats huileux de sept plantes sélectionnées pour l'étude et de la comparer à celle d'un mélange huile végétale + huile essentielle. Pour chacune des plantes de l'étude, des modes opératoires ont été définis au préalable, en se basant sur les pratiques des producteurs SIMPLES. Pour chaque mode opératoire, les analyses biochimiques ont été corrélées à la mesure des peroxydes des échantillons de macérat huileux, afin d'essayer de définir un ou plusieurs modes opératoires optimum pour chaque espèce. Les modes opératoires ont ensuite été comparés avec les outils de la métabolomique statistique afin de repérer des différences selon les modes opératoires.

La composition de l'huile essentielle a été déterminée au préalable par GC-MS<sup>4</sup>, une technique qui ne permet pas l'analyse des macérats huileux. Ce préambule a permis notamment de préciser pour chaque espèce les principaux constituants ou groupe de constituants volatiles à rechercher préférentiellement dans les macérats ; d'autres ont été choisis parce qu'ils sont remarquables sur le plan toxicologique (allergène, CMR<sup>5</sup>) ; les constituants non volatils à rechercher ont été choisis en se basant les données de la littérature. La camomille romaine, l'achillée millefeuille et le laurier noble synthétisant habituellement des lactones sesquiterpéniques (non volatiles et non détectées par GC-MS<sup>6</sup>), il a par exemple été décidé de vérifier leur présence dans les échantillons de macérat huileux. Cette analyse préalable des huiles essentielles a permis également, non seulement de préciser quels types de composés pourraient être bien détectés par LC-MS<sup>7</sup> mais surtout de repérer quels groupes chimiques migraient le mieux dans l'huile végétale choisie pour l'étude.

### Limites de l'étude :

L'étude a permis de montrer qu'il existe pour chaque plante des différences significatives sur le plan de la composition biochimique des extraits selon les modes opératoires. Il apparaît également qu'un macérat huileux est clairement à distinguer d'une huile végétale à laquelle on a ajouté une huile essentielle.

L'étude a permis d'établir de grandes lignes concernant les migrations des constituants volatils ou non dans une huile végétale utilisable en cosmétique (les données habituelles de la recherche sont réalisées avec des solvants plus apolaires). Contrairement à l'analyse GC-MS il n'existe pas de banques de données standardisées en LC-MS. Les résultats varient d'une machine à l'autre et donc d'un laboratoire à l'autre et chaque laboratoire établit peu à peu ses propres données. Il est donc difficile d'affirmer de façon certaine la présence de certains constituants sans recours aux standards. La technique LC-MS détecte relativement bien les « grosses » molécules mais détecte moins bien certaines molécules, plus légères (groupe C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O notamment). En revanche, les molécules plus lourdes, éluées en fin d'analyse, sont moins bien détectées par GC-MS, ou du moins de façon plus incertaine. Afin d'étendre le spectre de métabolites pouvant être mis en évidence pour chaque plante, les 2 techniques apparaissent donc complémentaires pour l'étude de la métabolome des extraits huileux de plantes ou parties de plante.

On pourra regretter dans cette étude que l'un des groupes chimiques (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) qui comprend de nombreuses molécules intéressantes, que ce soit sur le plan de l'activité biologique ou toxicologique, soit mal détecté par LC-MS. On pourra également regretter que l'étude n'ait pas pu établir de courbe d'étalonnage pour les constituants majoritaires.

<sup>4</sup> Chromatographie en phase gazeuse

<sup>5</sup> CMR : Substances cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction

<sup>6</sup> Gas Chromatography – Mass Spectrometry,

<sup>7</sup> Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

Ci-dessous, on trouvera le détail par plantes de chaque analyse.

## 5.2.1 Achillée millefeuille (*Achillea millefolium* L.)

Les résultats sur l'oxydation font apparaître la nécessité de travailler en évitant le protocole « plantes fraîches+ exposition au soleil », pour l'achillée. Le tableau ci-dessous fait apparaître les différents principes actifs recherchés à la fois dans l'huile essentielle et dans le macérat. On notera l'absence des monoterpènes en particulier les allergènes (farnésol et linalol) dans les macérats alors qu'ils sont présents dans l'huile essentielle. A l'inverse, on trouve dans le macérat, des flavonoïdes aux vertus anti-inflammatoires et des lactones sesquiterpéniques, peu ou pas présents dans l'huile essentielle. Ces derniers présentent une certaine toxicité et nécessitent une vigilance sur ce macérat.

volatilité	famille biochimique	constituant ou groupe de constituants	huile essentielle entraînement à la vapeur d'eau	macérat huileux				proprités biologiques principales	% du groupe dans HE GC-MS
				plante sèche - solaire	plante sèche - bain -marie	plante fraîche - solaire	plante fraîche - bain-marie		
fraction volatile	monoterpène C10H16	alpha pinène, bêta pinène, sabinène	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS	non déteçté dans les macérats - bruit de fond					26 - 32% dans l'HE par GC-MS
	monoterpène C10H18O	eucalyptol, linalool qui a fait l'objet d'une étude spécifique	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS	non déteçté dans les macérats - bruit de fond				non précisé	1,9-3,9% dans l'HE par GC-MS
	cétone monoterpénique C10H14O	non précisé	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS	non déteçté dans les macérats					
	cétone monoterpénique C10H16O	camphre (bornéone) / thuyone?	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS	le pic principal n'apparait pas mais apparition d'un autre pic (non identifié)					0,9 -0,7% dans l'HE par GC-MS
	sesquiterpène et apparentés C14H16	chamazulène	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS	non déteçté dans les macérats					1 - 10,2% dans l'HE par GC-MS
	sesquiterpène C15H24	alpha-humulène, alpha-zingibérène, bêta-caryophyllène, bicyclogermacrène, germacrène D	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS	présent dans les macérats mais intensité faible				activité commune aux Sqterpènes : anti-inflammatoire	35,4 - 41,1% dans l'HE par GC-MS
	sesquiterpène C15H24O	oxyde de caryophyllène / sesquiterpène oxygène MW220	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS	présent dans les macérats mais intensité faible					5,1 - 4,3% dans l'HE par GC-MS
sesquiterpène C15H26O	farnésol	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS	non déteçté dans les macérats					non déteçté par GC-MS	
	lactones sesquiterpéniques	C15H18O3 achilline / leucodine / santonine	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS	Le pic déteçté dans les macérat est différent de celui déteçté dans les HE ; la déréplication par MetGem montre qu'il s'agirait de santonine, absent des échantillons HE				ascaricide	non déteçté par GC-MS
		C14H18O4 15 nor guaianolide	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non précisée	non déteçté par GC-MS
		groupe des guaianolides C15H16O3 lidbekia / 2oxo8déoxylygustrine / dehydroleucodine	déteçté dans les échantillons d'HE par LC-MS - signal faible	déteçté dans les macérats - plus abondant que dans les HE				cytotoxicité	non déteçté par GC-MS
		C22H24O7 achifolline	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non précisée	non déteçté par GC-MS
	flavonoïdes	lutéoline C15H10O6	non déteçté	déteçté dans les macérats - non confirmée par les standard mais bon indice par MetGem				antioxydant, destructeur de radicaux libres, agent préventif d'inflammation, comme composé aidant au métabolisme des glucides, et comme régulateur du système immunitaire.	non déteçté
		apigénine C15H10O5	non déteçté	déteçté dans les macérats - non confirmée par les standard mais bon indice par MetGem				antioxydant, antiinflammatoire, antiangiogénique, anti-allergique	non déteçté
recherche de composés d'intérêts	cétone monoterpénique C10H14O	non identifié	déteçté par LC-MS	non déteçté					
	cétone monoterpénique C10H16O	camphre (bornéone) / thuyone?	déteçté par LC-MS	non déteçté					0,9 -0,71 dans l'HE par GC-MS



## 5.2.2 Camomille romaine (*Chamaemelum nobile* (L.) All)

La macération solaire de camomille romaine oxyde plus que la macération en bain-marie. Le tableau ci-dessous rassemble les données concernant les principes actifs. Il semblerait que d'une façon générale, les esters de la camomille romaine aient une très faible affinité des esters avec l'huile de tournesol. Une HE de camomille romaine étant constituée à 90% d'esters, il en résulte une perte d'activité considérable du macérat camomille romaine versus un mélange huile végétale et huile essentielle. On notera que certains esters n'ont pas été extraits au bain-marie mais extraits dans les échantillons solarisés. La pinocarvone semble être détruite par la lumière.

volatilité	famille biochimique	constituant ou groupe de constituants	huile essentielle	macérat huileux				propriétés biologiques principales	% du groupe dans HE GC-MS
			entraînement à la vapeur d'eau	plante sèche - solaire	plante sèche - bain-marie	plante fraîche - solaire	plante fraîche - bain-marie		
fraction volatile	monoterpène C10H16	alpha pinène, E bêta ocimène, camphène	détecté dans les HE mais intensité faible	non détectés dans les macérats - bruit de fond					0,9 - 11,2% dans les échantillons
	ester C8H12O2	métacrylate de 2 méthyllalyle	détecté dans les HE mais intensité faible	non détectés dans les macérats - bruit de fond					0,0 - 1,2% dans les échantillons
	esters C8H14O2	angélate de propyle, 2 méthyl acrylate d'isobutyle	détecté dans les HE mais intensité faible	non détectés dans les macérats - bruit de fond				celle des esters monoterpéniques = spasmolytiques	1,4 - 3,7% dans les échantillons
	esters C8H16O2	isobutyrate d'isobutyle, isobutanoate d'isobutyle	bien détecté dans les HE	adduit [M+Na] bien détecté dans les macérats sauf dans les macérats secs de B et L de LMB // 1 pic en plus dans les macérats SB, SL, et FB					1,6 - 4,7% dans les échantillons
	cétone monoterpénique C10H14O	pinocarvone	bien détecté dans les HE	bruit de fond ?	semble détecté à très faible intensité	bruit de fond ?	semble détecté à très faible intensité	non précisée	3,3 - 4,2% dans les échantillons
	C10H16O alcool monoterpénique	trans pinocarvéol	détecté	détecté à faible intensité dans les échantillons					2,8 - 4,1% dans les échantillons
	C9H14O2 esters	angélate de méthallyle	bien détecté dans les HE	détecté mais faible intensité	non détecté	détecté mais faible intensité	non détecté		8,6 - 10,3% dans les échantillons
	C9H16O2 esters	angélate d'isobutyle, metacrylate d'iso-amyle, etc.	détecté mais faible intensité	non détecté				angélate d'isobutyle = antispasmodique.	31,5 - 66,2% dans les échantillons
	C9H18O2 esters	isobutyrate d'iso-amyle, etc.	détecté mais faible intensité	non détecté					2,7 - 3,7% dans les échantillons
	C10H16O2 esters	2 méthyl 2 buténoate de 2 méthyl-but-2-ényle	bien détecté dans les HE	non détecté					0,0 - 1,6% dans les échantillons
C10H18O2 esters	esters d'angélate	bien détecté dans les HE	non détecté					18,9 - 27,7% dans les échantillons	
C11H20O2 esters	angélate de 3 méthylpentyle	bien détecté dans les HE	non détecté					0,0 - 3,8% dans les échantillons	
fraction non volatile	lactones sesquiterpéniques	15 nor guaianolide C14H18O4	détecté à faible intensité dans les HE	absent ou détecté à l'état de traces				anti prolifératif ?	non détecté
		nobiline C20H26O5	non détecté ou à très faible intensité	présent dans les macérats				tonique amer - stimulation des sécrétions gastriques / activité in vitro cytotoxique / antitumorale	non détecté
		germacranolide	Non détecté dans les échantillons						
	flavonoïdes	lutéoline	non détecté	bien détecté dans les macérats quel que soit le mode opératoire				antioxydant, destructeur de radicaux libres, agent préventif d'inflammation, comme composé aidant au métabolisme des glucides, et comme régulateur du système immunitaire.	
apigénine		non détecté	bien détecté dans les macérats quel que soit le mode opératoire				antioxydant, antiinflammatoire, antiangiogénique, anti-allergique		

## 5.2.3 Hélichryse d'Italie (*Helicrysum italicum* (Roth) G. Don)

volatilité	famille biochimique	constituant ou groupe de constituants (concentration > 1% dans les échantillons d'HE)	huile essentielle entraînement à la vapeur d'eau	macérat huileux				propriétés biologiques principales	% du groupe dans HE GC-MS
				ambiante	bain-marie	solaire	solaire occulté		
fraction volatile	monoterpène C10H16	alpha pinène, bêta pinène, <b>limonène</b> , gamma terpinène	détecté par LC-MS	présents dans les macérats, intensité faible				alpha-pinène (28,2% et 30,7% par GS-MS dans BAL et MCA : activité anti-infectieuse, anti-oedémateuse, expectorant	2,4 - 31,4% dans les échantillons
	monoterpénol C10H18O	<b>linalool</b> , nérol	détecté par LC-MS	non détectés dans les macérats				non précisé (concentration faible dans les HE par GC-MS)	1,3 - 4,1% dans les échantillons
	esters monoterpéniques C12H20O2	acétate de néryle, acétate de linalyle	détecté par LC-MS	non détectés dans les macérats				<b>acétate de néryle absent des échantillons de macérat</b> mais présent dans les HE respectivement 39,7% (CMP) ; 31,7% (LMB) ; 21,8% (VFL) : Non précisée spécifiquement mais spasmolytique principalement en tant qu'ester monoterpénique	2,9 - 39,7% dans les échantillons
	sesquiterpène C15H22	alpha curcumène	détecté par LC-MS	présent mais plus d'isomères dans les HE que dans les macérats. <b>IL y a plus d'isomères dans les échantillons de macérats exposés à la lumière</b>				non précisée spécifiquement :	1,1 - 4,4% dans les échantillons
	sesquiterpène C15H24	gamma curcumène, bêta-caryophyllène, italicène, sélénène	bien détectés par LC-MS	présents dans les macérats, intensité faible				propriétés communes aux SQT : anti-inflammatoires, spasmolytiques	14,9 - 47,2% dans les échantillons
	C13H22O2	propanoate de néryle / italdione I	bien détectés par LC-MS	présents dans les macérats, intensité faible				Voir italdiones II et III	2,6 - 9,4% dans les échantillons
	C15H26O sesquiterpénol	alpha-eudesmol, bêta-eudesmol, guaïol, rosifoliol	bien détectés par LC-MS	non détectés dans les macérats				activités biologiques principales des SQTols : décongestionnants veineux et lymphatiques	0,1 - 6,9% dans les échantillons
	C14H24O2	italidone II	bien détecté par LC-MS	présents dans les macérats, intensité faible - peu de différences concernant les modes opératoires				italidiones I+II+III sont fibrinolytiques	1,2 - 8,2% dans les échantillons
C15H26O2	italidione III	détecté par LC-MS	présents dans les macérats, intensité faible - peu de différences concernant les modes opératoires				0,2 - 1,9% dans les échantillons		
fraction non volatile	dérivés du phloroglucinol : lactone en C5 type alpha pyrone - dérivés du phloroglucinol	arzanol C22H26O7	non détecté dans les HE	bien détecté dans les macérats				anti-inflammatoire	non détecté par GC-MS
		héliopyrone C17H20O6	détecté par LC-MS dans les HE mais intensité faible	bien détecté dans les macérats				augmentation de la pression caveuse dans le corps caveuse du pénis	non détecté par GC-MS
	flavonoïdes	lutéoline	non détecté	bien détecté dans les macérats - pas de différences significatives sur le plan du mode opératoire				antioxydant, destructeur de radicaux libres, agent préventif d'inflammation, comme composé aidant au métabolisme des glucides, et comme régulateur du système immunitaire.	non détecté par GC-MS
apigénine		non détectée dans les échantillons				antioxydant, anti-inflammatoire, antiangiogénique, anti-allergique	non détecté par GC-MS		

Les macérations d'hélichryse ne se sont faites qu'avec des plantes fraîches. Le tableau ci-dessus résume les principaux principes actifs extraits. On notera là encore l'écart entre la composition de l'huile essentielle et celle du macérat huileux. Les esters monoterpéniques acteurs biologiques importants comme certains sesquiterpènes réputés pour leur propriété anti-oedemateuse dans l'HE n'ont pas été détectés dans les macérats. Par contre on pourra retrouver dans les macérats des substances non volatiles telles que la lutéoline et de l'apigénine anti-oxydants, et l'arzanol qui possède des propriétés anti-inflammatoires intéressantes. Pour l'extraction, il conviendra de préférer un protocole à température ambiante ou au bain-marie.

## 5.2.4 Laurier noble (*Laurus nobilis* L.)

Le tableau ci-dessous donne l'analyse des principales molécules d'intérêt. Concernant le protocole de macération, il ne faut surtout pas utiliser de plantes fraîches pour le macérat solaire. Pourquoi ne pas imaginer la technique de macération solaire occultée, qui n'a malheureusement pas été testé lors de cette étude? Le principal problème est posé par la présence de méthyleugénol qui est classé CMR2B<sup>8</sup> et est interdit dans les produits cosmétiques sauf si c'est un constituant inévitable comme par exemple dans les huiles essentielles. Sa concentration dans le produit fini doit être inférieure à 0,0002% pour un produit sans rinçage. Par conséquent, il faudra s'attacher à utiliser un protocole permettant de rester à une teneur inférieure à ce seuil et envisager un dosage complémentaire.

---

<sup>8</sup> Cancérogène, mutagène, reprotoxique

volatilité	famille biochimique	constituant ou groupe de constituants	huile essentielle		macérats huileux		propriétés biologiques principales	% du groupe dans HE GC-MS	nombre de pics	remarques
			entraînement à la vapeur d'eau		plante sèche	plante fraîche				
fraction volatile	C10H14	p-cymène et autres molécules C10H14	détecté par LC-MS	présent dans les macérats		p-cymène = antalgique		0 - 1%	8 pics	8 pics !
	monoterpène C10H16	alpha pinène, bêta pinène, limonène, myrcène, sabinène, E bêta-ocimène	détecté par LC-MS	présent dans les macérats secs	non détecté			13 - 23 % dans les échantillons	6 pics	les monoterpènes du groupes sont mieux extraits si échantillons secs
	monoterpène C10H18O	alpha-terpinéol, linalol, eucalyptol, terpinène-4-ol	mal détecté par LC-MS	non détecté dans les macérats				40 - 56% dans les échantillons	1 seul pic	difficile de conclure - le groupe est mal détecté par GC-MS
	C10H12O2 (dérivé du phénylpropane)	eugénol	o	o < plusieurs pics	o < plusieurs pics			0 - 3% dans les échantillons	2 à 8 pics	
	C11H14O2 (dérivé du phénylpropane)	méthyl-eugénol	détecté par LC-MS	présent dans les macérats mais teneur plus faible par rapport aux HE - pas de variations significatives selon mode opératoire plante fraîche ou sèche				3 - 6% dans les échantillons	2 pics	substance classé CMR2B. interdit dans les produits cosmétiques sauf si constituant inévitable (HE). Concentration dans le produit fini < 0,0002% pour produit sans rinçage
	ester monoterpénique C12H20O2	acétate d'alpha-terpinyle, acétate de delta-terpinyle	mal détecté par LC-MS	non détecté dans les macérats	présent dans les macérats			11 - 17% dans les échantillons	2 pics	
	sesquiterpène C15H22	alpha curcumène	détecté par LC-MS	présent dans les macérats		propriétés communes aux Sqterpènes : anti-inflammatoire		non détecté par GC-MS dans les échantillons ? Sesquiterpènes non identifiés ?	11 pics	
	sesquiterpène C15H24	alpha-farnésène, germacrène D, bêta-caryophyllène, bêta-élémane, bicyclgermacrène, delta-cadinène	o	o (semble plus intense que dans le macérat frais)	o			2 - 8% dans les échantillons	5 pics	
	recherche de molécules d'intérêt tox	eucalyptol	détecté par LC-MS	non détecté dans les macérats		anti-catarral - voies respiratoires essentiellement		31 - 37% dans les échantillons		il semblerait que l'eucalyptol ne migre pas dans les macérats - non confirmé par le standard
	sesquiterpène C15H24O	oxyde de caryophyllène	détecté par LC-MS	détecté dans les macérats		non précisé		0 - 2% dans les échantillons	7 pics	
fraction non volatile	lactones sesquiterpéniques	laurénobiolide	détecté dans les HE par LC-MS	présent dans les macérats		responsable d'eczemas de contact		non détecté par GC-MS		prendre en compte leur présence dans les études éventuelles de préparations cosmétiques contenant HE laurier noble et/ou MH laurier noble.
		costunolide	détecté dans les HE (intensité variable)	présent dans les macérats - intensité variable		anti-angiogénique - anti-carcinogène		non détecté par GC-MS		
		désacétyl-laurénobiolide / artrémorin	détecté dans les HE	présent dans les macérats - intensité similaire		non précisé		non détecté par GC-MS		
		déhydrocostuslactone	détecté dans les HE	présent dans les macérats - intensité moindre		inhibiteur cyclo-oxygénase 2		non détecté par GC-MS		
	alcaloïdes aporphiniques	laurotétatine / boldine / isoboldine / nor-isocorydine	détecté en faible quantité dans les HE	non détecté dans les macérats		activité cytotoxique in vitro. Activité hypolipémiante et hypolipémiante de la lauroitsine		non détecté par GC-MS		absent des macérats
		cryptodoline		non détecté				non détecté par GC-MS		a priori absent des HE et des macérats
		lauroitsine	détecté dans les HE	détecté dans les macérats réalisés avec plantes sèches	détecté dans les macérats réalisés avec plantes fraîches - moins abondant que dans les MH plantes sèches.			non détecté par GC-MS		concentration dans les macérats plantes sèches > celle des macérats plantes fraîches
		actinodaphnine		non détecté				non détecté par GC-MS		a priori absent des HE et des macérats
		isocorydine		non détecté				non détecté par GC-MS		a priori absent des HE et des macérats
		flavonoïdes	lutéoline C15H10O6	non détecté par LC-MS dans les HE	présent dans les macérats			antioxydant, destructeur de radicaux libres, agent préventif d'inflammation, comme composé aidant au métabolisme des glucides, et comme régulateur du système immunitaire.		non détecté
apigénine C15H10O5	non détecté par LC-MS dans les HE		présent dans les macérats		antioxydant, antiinflammatoire, antiangiogénique, anti-allergique		non détecté		anti-oxydant potentiel pour la MH	
recherche de molécules d'intérêt sur le plan toxicologique	eucalyptol (1,8 cinéole)	détecté en faible intensité dans les HE par LC-MS	non détecté		anti-infectieux, tropisme voie respiratoire, expectorant		31 - 37% dans les échantillons		difficile de conclure si ce n'est que l'eucalyptol est mal détecté par LC-MS	
	méthyl-eugénol	o	o <	o <	< 0,0002% dans les produits non rincés.		3 - 6% dans les échantillons d'HE		le prendre en compte	

## 5.2.5 Lavande officinale (*Lavandula angustifolia* Mill.)

Vous trouverez ci-dessous le tableau résumant les résultats obtenus. Il conviendra de préférer la plante fraîche pour extraire le plus large spectre de molécules volatiles, notamment monoterpènes anti-fongiques (béta-phellandrène) et certains esters monoterpéniques (acétate d'octène-3-yle), absents des macérats réalisés avec des plantes sèches. L'extraction de l'apigénine semble indifférente au type d'extraction. Dans le cas d'un protocole utilisant la plante fraîche, la technique de macération solaire ne devra pas être utilisée.

volatilité	famille biochimique	constituant ou groupe de constituants	huile essentiel entrainement à la vapeur d'eau	macérat huileux - <i>Lavandula angustifolia</i>						% du groupe dans HE par GC-MS	Propriétés biologiques principales	Remarques d'ordre toxicologique	Conclusion sur la présence ou l'absence dans le macérat
				plante fraîche			plante sèche						
				température ambiante	solaire	solaire occulté	ambiante plante sèche	solaire plante sèche	solaire occulté plante sèche				
fraction volatile	cétone C8H16O	3-octanone	déteçté par LC-MS	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	0,2 - 2,2% dans les échantillons			Absent dans les macérats
	monoterpène C10H16	béta-phéllandrène, Z/E béta-ocimène	déteçté par LC-MS	présent mais intensité faible			non déteçté ou à l'état de traces			1,5 - 11,4% dans les échantillons	activité anti-infectieuse - le béta-phéllandrène est antifongique	risque de formation d'époxydes par auto-oxydation (lumière, O <sub>2</sub> , température)	Présent dans les macérats FRAIS
	groupe C10H18O	linalool, 1,8 cinéole, bornéol, terpinène 4-ol	déteçté mais faible intensité	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	23,5 - 42,4% dans les échantillons			mal déteçté par LC-MS
	esters monoterpéniques C10H18O2	acétate d'octène 3-yle	déteçté par LC-MS	déteçté mais intensité faible			non déteçté (bruit de fond)			0,5 - 2,7% dans les échantillons			Présent dans les macérats FRAIS
	ester monoterpénique C12H20O2	acétate de linalyle, acétate de lavandulyle	bien déteçté par LC-MS	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	non déteçté	30,5 - 45,5% dans les échantillons	spasmodique - anti-inflammatoire		Absent dans les macérats
	sesquiterpène C15H24	alpha santalène, béta-caryophyllène, germacrène D, E béta farnésène	bien déteçté par LC-MS	déteçté dans les macérats - intensité faible						5,8 - 7,8% dans les échantillons	principalement anti-inflammatoire		Présent dans les macérats FRAIS ou SECS
fraction non volatile	flavonoïdes	quercétine	non déteçté par LC-MS	non déteçté						absent	antioxydant, résistance capillaire, action anti-		Absent dans les macérats
		apigénine	non déteçté par LC-MS -absente dans les	déteçté dans les macérats						absent	antioxydant, anti-inflammatoire, antiangiogénique, anti-		Présent dans les macérats FRAIS ou SECS

## 5.2.6 Menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.)

La macération solaire de menthe poivrée oxyde plus que les autres types de macération. L'analyse en sous-groupes nous révèle que la macération solaire favorise l'oxydation en présence de plantes fraîches mais pas de plantes sèches. Pour maximiser l'extraction des principes actifs on préférera l'extraction de plantes fraîches à température ambiante. L'extraction au soleil sera à éviter. La déréplication a montré des clusters de flavonoïdes et de leurs esters présents dans les macérats réalisés avec des plantes fraîches et non pas dans ceux réalisées à partir de plantes sèches.

volatilité	famille biochimique	constituant ou groupe de constituants	huile essentielle	macérats huileux				propriétés biologiques principales	% du groupe dans HE GC-MS	remarques		
			entraînement à la vapeur d'eau	plante sèche - ambiante	plante sèche - solaire	plante fraîche - ambiante	plante fraîche - solaire					
fraction volatile	monoterpène C10H16	béta pinène, limonène	bien détectés par LC-MS dans les HE	non détectés MH plantes sèches		présents dans les MH plantes fraîches			1,4- 3,2 % dans les échantillons	les monoterpènes du groupe sont mieux extraits en utilisant les plantes fraîches		
	monoterpène C10H14O	menthofurane	bien détectés par LC-MS dans les HE	détectés dans les MH - intensité plus faible				menthofurane = toxicité hépatique seuil très bas	0,8 - 2,1% dans les échantillons	pas de différences significatives selon mode opératoire		
	monoterpène C10H16O	pulégone	o	détectés dans les MH - intensité plus faible				toxique hépatique seuil très bas	1,1 - 0,6% dans les échantillons	pas de différences significatives selon mode opératoire		
	monoterpène C10H18O	eucalyptol, menthone, isomenthone, trans-thuyanol	groupe mal détecté par LC-MS - les constituants majoritaires (menthone, isomenthone mal détectés)	détectés dans les MH - intensité plus faible				non précisée	53-42,2% dans les échantillons	difficile de conclure - mauvaise détection du groupe par LC-MS		
	monoterpène C10H20O	menthol, néomenthol	détectés par LC-MS à faible intensité	non détectés dans les MH				non précisée	20,4-36,2% dans les échantillons	détection insuffisante du groupe menthol / néomenthol par LC-MS		
	ester monoterpénique C12H22O2	acétate de menthyle	détecté à faible intensité	détecté à faible intensité dans les MH					6,8-0,6% dans les échantillons	détection insuffisante par LC-MS ?		
	sequiterpène C15H24	béta-caryophyllène, germacrène D	bien détectés par LC-MS dans les HE	détecté à faible intensité dans les MH					5,1 - 4,2% dans les échantillons	attention l'échantillon HE MVA n'est pas de la menthe poivrée - présence de carvone détectée par GC-MS		
fraction non volatile	composés polyphénoliques	acide rosmarinique C20H18O6	non détecté dans l'HE	bien détecté dans les macérats				activité antioxydante recherchée / utilisation par l'industrie cosmétique des extrait CO2 romarin carnosol à cet usage	non détecté par GC-MS	acide rosmarinique et ses dérivés sont présents dans les MH, absents des HE		
		rosmarinat de méthyle C19H18O8	non détecté dans l'HE	bien détecté dans les macérats					non détecté par GC-MS			
		rosmarinat d'éthyle C20H20O8	non détecté dans l'HE	bien détecté dans les macérats					non détecté par GC-MS			
		acide carnosique C20H28O4	détecté à faible intensité dans les échantillons MH et HE							non détecté par GC-MS	excepté les échantillons MVA (qui n'est pas une menthe poivrée), tous les échantillons HE et MH contiennent du carnosol et de l'acide carnosique	
		carnosol C20H26O4	détecté à faible intensité	détecté à l'état de traces					non détecté par GC-MS			
		acide caféique, acide férulique, acide p-cumarique	non détecté, dans les échantillons, ni d'HE, ni de MH				non détecté par GC-MS				absents des échantillons d'HE et de MH	
	flavonoïdes	apigénine C15H10O5	non détectée dans les HE	non détectée dans les MH préparés avec des plantes sèches	détectée dans les MH (plantes fraîches)		antioxydant, antiinflammatoire, antiangiogénique, anti-allergique	non détecté par GC-MS	les flavonoïdes semblent mieux extraits en utilisant des plantes fraîches			

## 5.2.7 Romarin (Rosmarinus officinalis L.)

Le tableau ci-dessous récapitule les résultats obtenus pour le romarin. Au vu des résultats, il conviendra de préférer les macérats préparés avec des plantes fraîches. La macération sera effectuée à l'abri de la lumière. En effet, les macérats frais sont plus riches en polyphénols et en flavonoïdes. Les antioxydants phénoliques présentent l'intérêt de s'oxyder à la place des huiles végétales à protéger. Par la suite ils se stabilisent sans induire la création de composés radicalaires qui aurait pour effet d'emballer la réaction.

volatilité	famille biochimique	constituant ou groupe de constituants	huile essentielle	macérats huileux				propriétés biologiques principales	% du groupe dans HE GC-MS	remarques
			entraînement à la vapeur d'eau	plante sèche - solaire	plante sèche - solaire occulté	plante fraîche - solaire	plante fraîche - solaire occulté			
fraction volatile	C8H16O	3-octanone	bien détecté dans les HE	non détecté dans les macérats					0,3 - 2,6%	présent dans les HE absent des macérats
	C10H14	para cymène	bien détecté dans les HE ++++	non détecté dans les macérats					0,7 - 1,8%	présent dans les HE absent des macérats
	monoterpène C10H16	alpha pinène, bêta pinène, myrcène, camphène, sabinène, alpha-phéllandrène, bêta-phéllandrène, limonène, gamma terpinène, terpinolène	bien détecté dans les HE	détecté à faible intensité dans les macérats				non précisé	34,2 - 53 % dans les échantillons	
	monoterpène C10H14O	verbénone	bien détecté dans les HE	détecté +	détecté ++				1,2 - 2,5% dans les échantillons	ordre d'intensité : HE > macérat frais > macérat sec
	monoterpène C10H16O	camphre (bornéone)	bien détecté dans les HE	détecté à faible intensité dans les macérats				attention neurotoxicité	7,1 - 28,4% dans les échantillons	
	monoterpène C10H18O	eucalyptol, bornéol, alpha-terpinéol	semble bien détecté dans les HE	non détecté					17-22,9% dans les échantillons	
	ester monoterpénique C12H20O2	acétate de bornyle	non détecté, ni dans l'HE, ni dans les macérats					1,7 - 3,5% dans les échantillons	l'acétate de bornyle n'est pas détecté par LC-MS	
	sequiterpène C15H24	bêta-caryophyllène, alpha-humulène	bien détecté dans les HE	détecté à l'état de traces dans les macérats					3,4 - 5,3% dans les échantillons	
fraction non volatile	composés polyphénoliques	acide carnosique C20H28O4	non détecté dans les HE	moins abondante que dans les macérats plantes fraîches		bien détecté dans les MH plantes fraîches		activité antioxydante recherchée / utilisation par l'industrie cosmétique des extrait CO2 romarin carnosol à cet usage	non détecté par GC-MS	pour l'extraction des polyphénols, préférer les plantes fraîches
		acide carnosol C20H26O4	non détecté dans les HE	moins abondante que dans les macérats plantes fraîches		bien détecté dans les MH plantes fraîches			non détecté par GC-MS	
		acide 12-methoxycarnosique C21H30O4	non détecté dans les HE	moins abondante que dans les macérats plantes fraîches		bien détecté dans les MH plantes fraîches			non détecté par GC-MS	
		rosmanol C20H26O5	non détecté dans les HE	moins abondante que dans les macérats plantes fraîches		bien détecté dans les MH plantes fraîches			non détecté par GC-MS	
		7-methoxy(épi)rosmanol C21H28O5	non détecté dans les HE	moins abondante que dans les macérats plantes fraîches		bien détecté dans les MH plantes fraîches			non détecté par GC-MS	
		acide caféique, acide férulique, acide rosmarinique, acide p-cumarique	non détecté	non détecté	non détecté	non détecté	non détecté		non détecté par GC-MS	
	flavonoïdes	apigénine C15H10O5	non détecté dans les HE	moins abondante que dans les macérats plantes fraîches		bien détectée dans les MH plantes fraîches		antioxydant, antiinflammatoire, antiangiogénique, anti-allergique	non détecté par GC-MS	
recherche de molécules d'intérêt sur le plan thérapeutique et/ou toxicologique	camphre C10H16O	o	o <	o <	o <	o <		7,1 - 28,4% dans les échantillons		
	carnosol C20H34O8	non détecté dans les HE	moins abondante que dans les macérats plantes fraîches		bien détecté dans les MH plantes fraîches		activité antioxydante recherchée / utilisation par l'industrie cosmétique des extrait CO2 romarin carnosol à cet usage	non détecté par GC-MS		



## 5.2.8 Bibliographie des plantes à huile essentielle

- Devdutt Chaturvedi, *Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities* in Medicinal Chemistry, 2011: 313-334
- Boutaoui Nassima, recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *Matricaria chamomilla* (Astéracées) : 2012, 179 p.
- Tisserand et Young, *Essential oils safety* : 2014, 783 p.
- European Medicine Agency/ Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), Assessment report on *Rosmarinus officinalis* L., aetheroleum and *Rosmarinus officinalis* L., folium (final), 2010, 31 p.
- Cosmetic Ingredient Review, Safety Assessment of *Rosmarinus Officinalis* (Rosemary) - Derived Ingredients as Used in Cosmetics, 2013, 91 p.
- European Medicine Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), Public statement on the use of herbal medicinal products1 containing pulegone and menthofuran, 2016, 24 p.
- Bruneton, J., *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 2009, 1288 p.
- Faucon M., *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale*, Paris, 2015, 877 p.
- H. Safayhi, J. Sabieraj, E.-R. Sailer et H. P. T. Ammon, « Chamazulene: An Antioxidant-Type Inhibitor of Leukotriene B4 Formation », *Planta Medica*, vol. 60, no 5, 2006, p. 410-413
- Lieutaghi Pierre, *L'Herbe qui renouvelle : un aspect de la médecine traditionnelle en Haute-Provence*, [Éditions de la MSH](#), 1986, 374 p.
- Assessment report on *Achillea millefolium* L., flos, European Medicines Agency, 12 juillet 2011, 14 p.
- Assessment report on *Achillea millefolium* L., herba, European Medicines Agency, 23 septembre 2020, 42 p.
- Sara Vitalini, Giangiacomo Beretta, Marcello Iriti, Simone Orsenigo, Nicoletta Basilico, Stefano Dall'Acqua, Maria Iorizzi et Gelsomina Fico, « Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity », *Acta Biochimica Polonica*, vol. 58, n° 2, 2011, p. 203-209
- Filière des plantes médicinales biologiques du Québec, *L'achillée Millefeuille, guide de production sous règle biologique*, 2009, 28 p.
- Lucia Caputo, Filomena Nazzaro, Lucécia Fatima Souza, Luigi Aliberti, Laura De Martino, Florinda Fratianni, Raffaele Coppola and Vincenzo De Feo, *Laurus nobilis: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities*, 2017, 11p.
- Dae Yong Kim and Bu Young Choi, *Costunolide—A Bioactive Sesquiterpene Lactone with Diverse Therapeutic Potential*, 2019, 21 p.
- Assessment report on *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, flos, European Medicines Agency, 5 avril 2016, 24 p.
- Combalot Mylène, *L'immortelle d'Italie (Helichrysum italicum) et son huile essentielle*. Sciences pharmaceutiques 2013. 128 p.
- Rosa, A., Pollastro, F., Atzeri, A., Appendino, G., Melis, M. P., Deiana, M., et al., Protective role of arzanol against lipid peroxidation in biologicco systems. 2011, *Chem. Phys Lipids*. 164 : p. 24–32
- Schinella, G. R., Tournier, H. A., Máñez, S., Buschiazzo, P. M., Del Carmen Recio, M., Ríos, J. L., *Tiliroside and gnaphaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation*. 2007, *Fitoterapia*. 78 : p. 1–6.

- Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., et al., Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. ; 2007, *Journal of Natural Products* 70 : p. 608–12.
- Voinchet, V., Giraud-Robert, A-M., Utilisation de l'huile essentielle d'Hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. 2007, *Phytothérapie* 5 : p. 67–72.
- Franchomme, P. L'Aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles : fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Ed. Roger Jollois, Limoges (France), 1990. 446 p.
- Bianchini, A., Santoni, F., Paolini, J., Bernardini, A. -F., Mouillot, D., Costa, J., Partitioning the relative contributions of inorganic plant composition and soil characteristics to the quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don fil. essential oil. 2009, *Chem. Biodivers.* 6 : p. 1014–33.

### 5.3 Résultats des plantes sans essence

Les échantillons ont été traité selon une approche métabolomique couplée à une technique d'analyse en LC-HRMS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution) dont le processus analytique est le suivant :

- a. Prélèvements des échantillons
- b. Préparation des échantillons avec ajout d'étalons internes et/ou dérivatisation. Le protocole d'extraction utilisé pour cette étude est basé sur l'article suivant : Heinrich et al. Characterization of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) macerates prepared with different fatty oils upon processing and storage. *Phytochemistry Letters* 20 (2017) 470-480.
- c. Analyse des échantillons, identification et quantification des métabolites. La spectrométrie de masse est utilisée pour identifier et quantifier les métabolites après une séparation par chromatographie liquide.
- d. Analyses statistiques des données pour en extraire les caractéristiques du métabolome, identification de biomarqueurs grâce à différents outils informatiques et bases de données spécialisées.

La métabolomique est l'étude systématique de l'ensemble des métabolites présents dans les échantillons.

Une première approche a consisté à effectuer une analyse multivariée non ciblée, sans a priori, sur l'ensemble des résultats afin de déterminer dans l'ensemble des sous-classes d'échantillons les facteurs influençant ou n'influencent pas la composition des macérats huileux. Puis différentes analyses ciblées ont été faites afin de mieux comprendre les compositions de chaque échantillon.

Dans les tableaux suivants, nous présentons les résultats de ces analyses de façon synthétique et simplifié pour que les productrices et les producteurs du syndicat puissent rapidement visualiser les protocoles les plus pertinents.

Les courbes d'étalonnages n'ont pas pu être obtenues dans certaines sous-classes d'échantillons (problème d'extraction, manque de standard dans le commerce, etc.). La lecture de ces tableaux synthétiques doit donc être faite uniquement pour comparer les niveaux de concentration d'une même molécule au sein d'une même plante. Ces tableaux ne peuvent pas servir à comparer :

- Les niveaux de concentration entre molécules différentes au sein d'une même plante
- Les niveaux de concentration d'une même molécule au sein de plantes différentes

Les molécules qui ont été regardées pour les 4 plantes sont rassemblées dans le tableau ci-dessous

Molécules ou familles de molécules détectées	Risques toxicologiques	Principaux intérêts susceptibles de justifier son usage en cosmétologie
Allantoïne	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (1)	Cicatrisante (faible niveau de preuve) (2)
Aucubine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (14).	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (14)
Catalpol	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (16,17)	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (15)
Faradiol estérifiés	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (2)
Hyperforine	Inducteur enzymatique du CYP 3A4, 2E1, 2C19 (responsable des interactions médicamenteuses) et inducteur de l'expression de la glycoprotéine P (2)	Anti-inflammatoire (13)
Hypericine	Phototoxique (2)	Aucun
Kaempferol	Considéré comme très faible dans les études in-vivo (7, 8). Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (6, 7)
Quercétine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (9, 10, 11, 12)
Symphytine	Risque d'hépatotoxicité (données issues d'études de carcinogénotoxicité) (2, 4, 5)	Aucun

### 5.3.1 Consoude officinale (*Symphytum officinale* L.)

Ci- dessous on trouvera le tableau pour la consoude officinale. Le type de macération (solaire vs. bain-marie) et/ou la durée de macération influence la composition de l'extrait mais il n'est pas possible de discriminer quel paramètre influence le plus cette différence.

L'état de la plante (fraîche ou sèche) semble peu influencer la composition des extraits.

L'étude ne permet pas de conclure à un protocole d'extraction optimisé pour une composition assurant le plus possible la sécurité et l'efficacité de l'extrait.

L'étude permet de montrer que même si la symphytine est présente également dans le millepertuis, le plantain et le souci, c'est bien dans la consoude qu'elle est la plus concentrée. Cependant cette symphytine du fait de sa très faible absorption par voie cutanée, présente un risque quasi-nul en cosmétologie.

	Plante : Consoude	<i>Symphitum officinale L., Boraginaceae</i>				
	Molécules ou familles de molécules détectées	Risques toxicologiques	Principaux intérêts susceptibles de justifier son usage en cosmétologie	Présence selon Protocoles * (3)		
				Bain -marie, Sec (3 jours de macération)	Bain -marie, Frais (3 jours de macération)	Solaire, Frais (42 jours de macération)
Recherche initiale	Allantoïne	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (1)	Cicatrissante (faible niveau de preuve) (2)	HV Tournesol		
	Symphitine (un des alcaloïdes pyrrolizidiniques de la consoude)	Risque d'hépatotoxicité (données issues d'études de carcinogénotoxicité) (2, 4, 5). L'absorption cutanée de ce type d'alcaloïdes étant considérée comme très faible, le risque en cosmétologie est quasi nul (2).	Aucun	Présence, aires sous courbes similaires dans tous les protocoles		
	Aucubine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (14).	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (14)	ND		
	Catalpol	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (16,17)	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (15)	ND		
	Faradiol estérifiés	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (2)	1	1	2
	Hyperforine	Inducteur enzymatique du CYP 3A4, 2E1, 2C19 (responsable des interactions médicamenteuses) et inducteur de l'expression de la glycoprotéine P (2). Absorption cutanée attendue comme très faible.	Anti-inflammatoire (13)	ND		
	Hypericine	Phototoxique (2)	Aucun	ND		
	Kaempferol	Considéré comme très faible dans les études in-vivo (7, 8). Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (6, 7)	Présence, aires sous courbes similaires dans tous les protocoles		
	Quercétine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (9, 10, 11, 12)	ND		

\* Les analyses étant semi-quantitatives, les concentrations en molécules ne sont pas exprimées quantitativement mais sont organisées de la plus faible teneur à la plus haute teneur (indiquées du plus fort 3 au plus faible 1)

### 5.3.2 Millepertuis(Hypericum perforatum L.)

Les macérations de millepertuis ne se sont faites qu'avec des plantes fraîches. L'étude permet de faire l'hypothèse du protocole d'extraction idéal suivant : faire deux macérats à température ambiante avec des plantes fraîches durant 21 jours, l'un dans l'HV de tournesol (pour la meilleure extraction de la quercétine et du kaempferol et la plus faible extraction d'hyperforine), l'autre dans l'HV d'olive (pour une extraction intéressante des faradiols estérifiés et la plus faible extraction d'hyperforine). De plus, ce protocole permet d'obtenir les macérats les moins oxydés de tous les protocoles. L'absence d'hypericine ne garantit pas l'absence de risque de phototoxicité. Cette conclusion repose sur les données objectives produites dans cette étude. Elles devront à l'avenir être confronté aux retours empiriques des membres du syndicat. L'intensité de la couleur rouge de l'extrait final étant traditionnellement un critère subjectif de bonne qualité, il sera intéressant d'observer l'intensité de la coloration des macérats obtenus en appliquant ce mode opératoire.

	Molécules ou familles de molécules détectées	Risques toxicologiques	Principaux intérêts susceptibles de justifier son usage en cosmétologie	Présence selon Protocoles * (3)					
				Température ambiante, frais (21 jours de macération)	Solaire, Frais (21 jours de macération)	Solaire occulté, Frais (21 jours de macération)	Température ambiante, frais (21 jours de macération)	Solaire, Frais (21 jours de macération)	Solaire occulté, Frais (21 jours de macération)
				HV Tournesol			HV Olive		
Recherche initiale	Quercetine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (9, 10, 11, 12)	2	1	1	Non détectée		
	Kaempferol	Considéré comme très faible dans les études in-vivo (7, 8). Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (6, 7)	3	2	1	3	2	1
	Hyperforine	Inducteur enzymatique du CYP 3A4, 2E1, 2C19 (responsable des interactions médicamenteuses) et inducteur de l'expression de la glycoprotéine P (2)	Anti-inflammatoire (13)	1	3	2	1	4	2
	Hypericine	Phototoxique (2)	Aucun	Non détectée			ND		
	Allantoïne	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (1)	Cicatrisante (faible niveau de preuve) (2)	?	1	1	ND		
	Aucubine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (14).	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (14)	ND			ND		
	Catalpol	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (16,17)	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (15)	ND			ND		
	Faradiol estérifiés	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (2)	1	2	1	3	4	3
	Symphitine	Risque d'hépatotoxicité (données issues d'études de carcinogénotoxicité) (2, 4, 5). L'absorption cutanée de ce type d'alcaloïdes étant considérée comme très faible, le risque en cosmétologie est quasi nul (2).	Aucun	2	2	2	3	1	2

\* Les analyses étant semi-quantitatives, les concentrations en molécules ne sont pas exprimées quantitativement mais sont organisées de la plus faible teneur à la plus haute teneur

### 5.3.3 Plantain (Plantago lanceolata L.)

Le type de macération (solaire vs. bain-marie) et/ou la durée de macération influence les compositions des macérats mais il n'est pas possible de discriminer quel est le paramètre le plus influençant. L'état de la plante influence significativement la composition de l'extrait.

Concernant l'optimisation de la composition, il est seulement possible de conclure qu'il est nettement préférable d'utiliser une plante fraîche et non pas une plante sèche. En prenant en compte le risque oxydatif, il sera préférable d'utiliser le bain marie.

Plante : Plantain		Plantago lanceolata L., Plantaginaceae					
Molécules ou familles de molécules détectées	Risques toxicologiques	Principaux intérêts susceptibles de justifier son usage en cosmétologie	Présence selon Protocoles * (3)				
			Bain -marie, Frais (3 jours de macération)	Bain -marie, Sec (3 jours de macération)	Solaire, Frais (21 jours de macération)	Solaire, Sec (21 jours de macération)	
HV Tournesol							
Recherche initiale	Aucubine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (14).	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (14)	ND			
	Catalpol	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (16,17)	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (15)	ND			
	Allantoïne	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (2)	1	ND	2	ND
	Faradiol estérifiés	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (2)	1	1	2	1
	Hyperforine	Inducteur enzymatique du CYP 3A4, 2E1, 2C19 (responsable des interactions médicamenteuses) et inducteur de l'expression de la glycoprotéine P (2)	Anti-inflammatoire (13)	ND			
	Hypericine	Phototoxique (2)	Aucun	ND			
	Kaempferol	Considéré comme très faible dans les études in-vivo (7, 8). Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (6, 7)	1	T	1	T
	Quercétine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (9, 10, 11, 12)	1	ND	?	ND
	Symphitine	Risque d'hépatotoxicité (données issues d'études de carcinogénotoxicité) (2, 4, 5). L'absorption cutanée de ce type d'alcaloïdes étant considérée comme très faible, le risque en cosmétologie est quasi nul (2).	Aucun	Présence, aires sous courbes similaires dans tous les protocoles			
* Les analyses étant semi-quantitatives, les concentrations en molécules ne sont pas exprimées quantitativement mais sont organisées de la plus faible teneur à la plus haute teneur							

### 5.3.4 Souci (Calendula officinalis L.)

Le type d'huile et l'état de la plante influence la composition des macérats. L'étude permet de faire l'hypothèse du protocole d'extraction idéal suivant : faire deux macérats durant 21 jours, l'un à partir de plantes fraîches à température ambiante dans l'huile de tournesol (pour la meilleure extraction de la quercétine et du kaempferol), l'autre à partir de plante sèche au soleil non-occulté dans de l'huile d'olive (pour une des meilleures extractions des faradiols estérifiés tout en limitant le risque oxydatif). Ces deux macérats devront être ensuite mélangés pour obtenir un extrait final.

	Molécules ou familles de molécules détectées	Risques toxicologiques	Principaux intérêts susceptibles de justifier son usage en cosmétologie	Présence selon Protocoles * (3)														
				Bain-marie, frais (3 jours de macération)	Température ambiante, frais (21 jours de macération)	Solaire, Frais (21 jours de macération)	Solaire, Frais occulté, Frais (21 jours de macération)	Bain-marie, Sec (3 jours de macération)	Température ambiante, Sec (21 jours de macération)	Solaire, Sec (21 jours de macération)	Solaire occulté, Sec (21 jours de macération)	Solaire, Frais (21 jours de macération)	Solaire occulté, Frais (21 jours de macération)	Solaire, Sec (21 jours de macération)	Solaire occulté, Sec (21 jours de macération)			
Recherche initiale	Querretine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (9, 10, 11, 12)	1	5	3	4	0	1	2	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Faradiol estérifiés	Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (2)	1	1	2	1	1	1	1	1	6	4	5	3			
	Allantoïne	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (1)	Cicatrisante (faible niveau de preuve) (2)															
	Aucubine	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (14)	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (14)															
	Catechol	Aucune connue au dose attendue dans les macérats (16,17)	Anti-oxydant et anti-inflammatoire (15)															
	Keampferol	Considéré comme très faible dans les études in-vivo (7, 8). Aucune connue au dose attendue dans les macérats.	Anti-inflammatoire (6, 7)	T	4	1	1	ND	T	T	T	3	2	2	2	2		
	Hyperforine	Inducteur enzymatique du CYP 3A4, 2E1, 2C19 (responsable des interactions médicamenteuses) et inducteur de l'expression de la glycoprotéine P (2)	Anti-inflammatoire (13)															
	Hypericine	Phototoxique (2)	Aucun															
	Symphitine	Risque d'hépatotoxicité (données issues d'études de carcinogénotoxicité) (2, 4, 5). L'absorption cutanée de ce type diacétides étant considérée comme très faible, le risque en cosmétologie est quasi nul (2).	Aucun	6	6	5	4	4	4	3	3	1	5	7	3	2		

\* Les analyses étant semi-quantitatives, les concentrations en molécules ne sont pas exprimées quantitativement mais sont organisées de la plus faible teneur à la plus haute teneur

## 5.3.5 Bibliographie des plantes sans essence

1. Becker LC, Bergfeld WF, Belsito D V, et al. Final Report of the Safety Assessment of Allantoin and Its Related Complexes. *Int J Toxicol*. 2010;29:84-97. doi:10.1177/1091581810362805
2. Bruneton J. *Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes Médicinales*. 5ème. (Lavoisier TEC & DOC, ed.); 2016.
3. De Leener G, Fraselle S, Souard F, Delporte C, Van Antwerpen P. *Analyse LC-MS de Macérats Huileux de Plantes*.; 2021.
4. Salehi B, Sharopov F, Tumer TB, et al. Symphytum species: A comprehensive review on chemical composition, food applications and phytopharmacology. *Molecules*. 2019;24(12). doi:10.3390/MOLECULES24122272
5. Stickel F, Seitz HK. The efficacy and safety of comfrey. *Public Health Nutr*. 2000;3(4 A):501-508. doi:10.1017/S1368980000000586
6. Devi K, Malar D, Nabavi S, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Res*. 2015;99:1-10. doi:10.1016/J.PHRS.2015.05.002
7. Alam W, Khan H, Shah MA, Cauli O, Saso L. Kaempferol as a Dietary Anti-Inflammatory Agent: Current Therapeutic Standing. *Molecules*. 2020;25(18). doi:10.3390/MOLECULES25184073
8. Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, et al. Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. *Molecules*. 2019;24(12). doi:10.3390/MOLECULES24122277
9. Han M, Barreto T, Martinez F, Comstock A, Sajjan U. Randomised clinical trial to determine the safety of quercetin supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *BMJ open Respir Res*. 2020;7(1). doi:10.1136/BMJRESP-2018-000392
10. Shin E, Lee J, Hong S, Lim T, Byun S. Quercetin Directly Targets JAK2 and PKC $\delta$  and Prevents UV-Induced Photoaging in Human Skin. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21). doi:10.3390/IJMS20215262
11. Li Y, Yao J, Han C, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*. 2016;8(3). doi:10.3390/NU8030167
12. Batiha G, Beshbishy A, Ikram M, et al. The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. *Foods (Basel, Switzerland)*. 2020;9(3). doi:10.3390/FOODS9030374
13. Meinke M, Richter H, Kleemann A, et al. Characterization of atopic skin and the effect of a hyperforin-rich cream by laser scanning microscopy. *J Biomed Opt*. 2015;20(5):051013. doi:10.1117/1.JBO.20.5.051013
14. Zeng X, Guo F, D O. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin. *Fitoterapia*. 2020;140. doi:10.1016/J.FITOTE.2019.104443
15. Bhattamisra S, Yap K, Rao V, Choudhury H. Multiple Biological Effects of an Iridoid Glucoside, Catalpol and Its Underlying Molecular Mechanisms. *Biomolecules*. 2019;10(1). doi:10.3390/BIOM10010032
16. Fei B, Dai W, Zhao S-J. Efficacy, Safety, and Cost of Therapy of the Traditional Chinese Medicine, Catalpol, in Patients Following Surgical Resection for Locally Advanced Colon Cancer. *Med Sci Monit*. 2018;24:3184-3192. doi:10.12659/MSM.907569
17. Bai Y, Zhu R, Tian Y, et al. Catalpol in Diabetes and its Complications: A Review of Pharmacology, Pharmacokinetics, and Safety. *Molecules*. 2019;24(18). doi:10.3390/MOLECULES24183302



## 6 Problématiques rencontrées

L'étude a rencontré divers aléas à différents niveaux et étapes de sa réalisation : des problématiques liées aux expéditions, aux contraintes matérielles, à l'expérimentation et bien sûr aux analyses. Concernant les problèmes pratiques, Cela a engendré une modification du protocole final, avec une modification du nombre de macérats réalisés et des impossibilités d'interprétation de résultats pour certains macérats. Pour les analyses, nous noterons en particulier, le cas des plantes à essence, dans lesquels certains groupes de molécules détectés n'ont pas pu être identifiés. Les problématiques pratiques sont détaillées en annexe.

## 7 Liste des livrables

### 7.1 Livrables diffusés au grand-public (= publiés sur le site internet)

- Ce rapport comme base de données sur les macérats de plantes : molécules d'intérêt, stabilité oxydative, modes opératoires, ...
- Modèles de documents administratifs et techniques : fiches techniques pour les matières premières, modes opératoires de produits finis, fiches de fabrication, attestations de conformité, ...
- Réunion publique organisée par FranceAgriMer et diaporama correspondant.

### 7.2 Livrables non diffusés au grand-public

- Profils toxicologiques valables à ce jour : versions pdf disponibles uniquement sur demande expresse auprès du syndicat.

### 7.3 Documents ne faisant pas partie des livrables

- Formations organisées par le syndicat et leurs supports (dont la fiche de synthèse à remplir pour l'évaluation facilitée par les évaluateurs partenaires).

## 8 Conclusion

Cette étude a permis d'obtenir des résultats innovants sur les risques toxicologiques relatifs aux conditions de fabrication des macérats huileux. En particulier ces travaux montrent clairement que la composition biochimique d'un macérat huileux d'une plante à huile essentielle est différente de celles d'un mélange huile végétale et huile essentielle. Les travaux réalisés lors de cette étude devraient d'ailleurs donner lieu à publication.

Ces résultats permettent de plus de proposer aux producteurs un protocole de macération, permettant d'extraire au mieux les actifs des plantes tout en assurant la sécurité de leurs produits. Par conséquent, ils fournissent aux évaluateurs un outil précieux pour attester la sécurité des produits fabriqués. Ces travaux comme tous les travaux de recherche posent aussi de nombreuses questions en particulier pour les plantes à huiles essentielles. Il pourrait être intéressant de rechercher un mode opératoire supplémentaire permettant d'optimiser le transfert de certaines molécules d'intérêt des huiles essentielles vers les macérats.

Les producteurs SIMPLES travaillent en agriculture biologique et la question des pesticides reste au cœur des préoccupations des producteurs avec de plus en plus de difficulté à trouver des terres exemptes de ces molécules. Une prolongation de cette étude pourrait se tourner spécifiquement vers ces questions plus environnementales.

## 9 Annexe 1 : Détail du calendrier réalisé

### 9.1 Novembre 2019

- Recueil de chromatographies auprès des membres de la commission distillation du syndicat,
- Présentation du projet à l'assemblée générale du Syndicat SIMPLES du 21 novembre à Camplong d'Aude (11),
- Recrutement des volontaires via un mail de présentation et un questionnaire à remplir,
- rédaction d'une première ébauche de protocole,
- rédaction des ébauches d'outils pour le recueil d'information.

### 9.2 Décembre 2019

- validation de la première ébauche de protocole par le 1er copil du 9 décembre à Saillans (26) dont finalisation de la liste des plantes étudiées,
- prise de contact avec les laboratoires pour des devis,
- recherche de fournisseurs pour le matériel et les matières premières,
- affinage du protocole.

### 9.3 Janvier 2020

- contact des producteurices volontaires pour préciser les informations remplies et leur expliquer l'implication attendue des volontaires,
- affinage du protocole,
- bibliographie sur les molécules d'intérêt susceptibles d'être retrouvées dans les MH (par les prestataires experts),
- récolte des chromatographies spécifiques des distillateurs.rices inclus dans l'étude lorsque non obtenues auparavant.

## 9.4 Février 2020

- 2ème réunion de copilotage le 3 février à Allex (26) : validation plante par plante du protocole final (+ coordination des prises de décisions virtuelles suite au copil pour les sujets non traités),
- commande et réception du matériel et des matières premières auprès des fournisseurs,
- conception et finalisation des « kits volontaires » (documents d’information, fiches à remplir, pochettes, étiquettes, etc.).

## 9.5 Mars-Avril 2020

- fabrication des occultants à partir de rouleaux à tissu en carton,
- préparation et premiers envois de colis aux volontaires,
- explications orales et écrites en supplément des documents d’information remis aux volontaires,
- suivi téléphonique des premier.es volontaires.

## 9.6 Mai 2020

- suivi des volontaires (mail et tél),
- fin des envois de matériel,
- organisation et réception des premiers retours d’échantillons par les volontaires,
- validation des devis des laboratoires partenaires (ULB, ISCN, Lexva) par le CA.

## 9.7 Juin 2020

- échanges logistiques avec les laboratoires,
- rédaction de la méthodologie ,
- 3ème copil le 8 juin en conférence téléphonique : planification du travail à réaliser sur les livrables,
- point d’avancement avec les prestataires experts (réunion téléphonique le 16 juin),
- organisation et réception des retours d’échantillons par les volontaires,
- envoi des premiers échantillons à l’ULB pour une phase 1 d’analyse.

## 9.8 Juillet-Août 2020

- suivi des volontaires,
- organisation et réception des retours d’échantillons par les volontaires.

## 9.9 Septembre 2020

- réception et enregistrement des échantillons,
- envoi des échantillons aux laboratoires partenaires,
- rédaction du rapport d’avancement,

- préparation du séminaire d'experts prévu début octobre,
- 4ème copil le 28 septembre en conférence téléphonique : point sur l'avancement et organisation de la suite de l'étude.

## 9.10 Octobre 2020

- séminaire d'experts les 4 et 5 octobre (validation des trames de profils toxicologiques, validation des trames de livrables, organisation du travail d'analyse des résultats)
- rédaction des livrables techniques
- réception des premiers résultats et analyses préliminaires
- réalisation d'une photothèque à partir des échantillons

## 9.11 Novembre - Décembre 2020

- échanges avec les laboratoires partenaires pour le suivi des analyses en cours
- réception des derniers résultats de peroxydation lipidique et première analyse descriptive

## 9.12 Janvier - Mars 2021

- analyse statistique sur les résultats de peroxydation lipidique
- Début de résultats sur les molécules d'intérêt.

## 9.13 Mars-Octobre 2021

Les travaux des deux laboratoires de recherche dans le contexte de la crise sanitaire ont nécessité plus de temps que prévu initialement. Une prolongation du contrat a par conséquent été demandé afin de terminer l'étude. Les analyses se sont poursuivies jusqu'à l'été. Un travail de synthèse a par a suite été effectué ainsi que le rapport final.

# 10 Annexe 2 : Problématiques pratiques

## 10.1 Problématiques liées aux expéditions

En raison de la situation sanitaire exceptionnelle que nous avons connue cette année, les distributions de kits n'ont pas pu se faire comme prévu.

- Initialement, une « tournée » était prévue pour distribuer les kits en mains propres, expliquer le protocole de vive voix, rencontrer les volontaires, visiter les fermes, etc. mais en raison de la situation sanitaire, tout a dû être annulé au dernier moment et la quasi exclusivité des 18 distributions s'est faite via colissimo (à l'exception d'une distribution à domicile fin février et de 3 distributions sur un parking au colloque Biovallée en mars).
- Les explications ont été données par téléphone, et avec des problèmes de compréhension du protocole : incompréhensions pas assez anticipées au début, qui ont donné suite à des rectifications et précisions par mail du protocole.

- De la casse dans les colis : 2 bouchons cassés dans un colis à l’envoi (sans pénalisation sur la réalisation de l’étude), et 4 échantillons cassés dans 2 colis au retour (sans pénalisation sur les analyses car les flacons-mères des macérats étaient envoyés en parallèle et les échantillons manquants ont pu être reconditionnés).
- Le premier envoi d’échantillons à Bruxelles a été perdu : cela a engendré du retard dans la première phase d’analyses qui était prévue début juillet, et un surcoût lié à l’envoi d’un second colis. Les macérats-mères des échantillons envoyés ont pu être récupérés, donc les échantillons manquants (car envoyés 2 fois) reconstitués, sauf pour une productrice qui avait détruit le macérat-mère.

## 10.2 Problématiques liées à des contraintes matérielles

- Fiches protocole qui contenaient quelques erreurs ou imprécisions : identification et utilisation de l’occultant non précisée à l’écrit, pesée de l’huile pour les témoins peu claire (évoquée dans le mode opératoire général mais pas recopiée dans les protocoles spécifiques), nombre d’échantillons à réaliser par macérat non précisé à l’écrit, ...
- Changement du protocole en cours de réalisation : consignes pour l’envoi des photographies, modification de l’étape de filtration (pas de pressage des plantes en fin de filtration), ...
- Contraintes pratiques des producteurs qui faisait obstacle à l’application exacte du protocole : pas d’entonnoir inox ou verre à disposition, organisation du temps de présence à la ferme incompatible avec le suivi quotidien des macérations, ...
- Les élastiques utilisés pour attacher la gaze des macérations à l’air libre ne résistaient pas longtemps au soleil : ils fondaient et craquaient régulièrement, avec possibilité que la gaze s’envole dans la journée, ...

## 10.3 Problématiques liées à l’expérimentation

Les principaux problèmes rencontrés durant l’expérimentation étaient liés à des soucis de compréhension du protocole, à des erreurs de manipulation ou à des intempéries :

- Exemples d’incompréhensions : rôle et utilisation de l’occultant, poids d’huile à mettre pour les témoins, principe d’unité de lot pour comparer les plantes en macération, ...
- Exemples d’intempéries : sécheresse / froid / maladies qui ont perturbé la récolte (décalée dans la saison ou complètement annulée), tempête soudaine qui a perturbé les macérations (présence de pluie dans l’huile, etc.), ...
- Exemples d’erreurs de manipulations : mauvaise pesée, bain-marie oublié sur le feu, pots renversés, ...

- Certains volontaires ont aussi consciemment choisi de ne pas respecter des parties du protocoles car trop contraignantes : agitation quotidienne des macérats, rentrée la nuit, ...