



HAL
open science

Évaluation et prévision de l'activité antimicrobienne des conservateurs dans des formulations cosmétiques

Samia Almoughrabie

► **To cite this version:**

Samia Almoughrabie. Évaluation et prévision de l'activité antimicrobienne des conservateurs dans des formulations cosmétiques. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASA014 . tel-03738124

HAL Id: tel-03738124

<https://pastel.hal.science/tel-03738124>

Submitted on 25 Jul 2022

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

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

Évaluation et prévision de l'activité antimicrobienne des conservateurs dans des formulations cosmétiques.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581, Agriculture, Alimentation, Biologie,
Environnement, Santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech,
Institut Micalis, 78350, Jouy-en-Josas, France.
Réfèrent : AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 29 mai 2020, par

Samia ALMOUGHARABIE

Composition du Jury

| | |
|--|------------------------------|
| Eric SPINLER Professeur, AgroParisTech, UMR SayFood, Thiverval-Grignon | Président |
| Christine ROQUES Professeure, Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique | Rapportrice & Examinatrice |
| Frédéric CARLIN Directeur de recherche, INRAE, UMR SQPOV, Avignon | Rapporteur & Examineur |
| Karine STEENKESTE Maitre de conférences, Université Paris Saclay, UMR ISMO, Orsay | Examinatrice |
| Florence DUBOIS-BRISSONNET Professeure, AgroParisTech, Institut Micalis, Jouy-en-Josas | Directrice de thèse |
| Chrisse NGARI Chercheure, Laboratoire Clarins, Pontoise | Co-encadrante & Examinatrice |

Remerciements

Cette thèse réalisée au cours de ces trois dernières années, a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

En premier lieu, je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et mes remerciements à ma directrice de thèse, **Florence DUBOIS-BRISSONNET**, Professeur à AgroParisTech à l'institut Micalis à l'INRAE de Jouy-en-Josas, pour sa disponibilité et les conseils précieux qu'elle a su m'apporter tout au long de ma thèse. Au-delà de son expertise et de son appui scientifique, j'ai pu compter sur son soutien et son aide durant mes recherches. J'ai pu beaucoup apprendre à son contact et j'en suis infiniment reconnaissante.

Je remercie **Chrisse NGARI**, chef de projet R&D à Clarins et co-encadrante de ma thèse, pour sa présence et nos échanges ainsi que ses encouragements.

Merci aussi à **Valérie POULET**, chef du service microbiologie et contrôle à Clarins, pour tous les précieux conseils qui ont permis de faire avancer le projet.

Je transmets aussi mes remerciements à **Romain BRIANDET**, chef d'équipe B3D, pour avoir toujours été disponible pour discuter des problèmes rencontrés pendant ma thèse et pour tous nos échanges passionnés sur l'impression 3D.

Je remercie **Véronique BOSC**, Physico-chimiste et Maitre de Conférences à AgroParisTech de Massy, **Yves WACHE**, Microbiologiste et Maitre de Conférences à l'université de Bourgogne et **Arnaud BRIDIER**, Chercheur microbiologiste à l'ANSES, d'avoir participé à mes comités de thèse et de m'avoir judicieusement conseillée.

Je tiens à adresser mes remerciements aux membres de mon jury de thèse, **Christine ROQUES**, Professeur à l'université de Toulouse, **Frédéric CARLIN**, Directeur de recherche de l'INRAE d'Avignon, en qualité de rapporteurs et **Karine STEENKESTE**, Maitre de conférences à l'université de Paris Saclay, **Eric SPINNLER**, Professeur à AgroParisTech de Thiverval Grignon, en tant qu'examineurs, pour avoir accepté de lire et de juger mon travail.

Merci à **Laurent GUILLIER**, ingénieur de Recherche à l'ANSES, pour son expertise sur la partie modélisation de l'action des conservateurs.

Je tiens également à remercier **Nathalie ISSACHAR**, Directrice de recherche et développement à Clarins, qui m'a donné l'opportunité de réaliser cette thèse et qui m'a fait confiance au cours de ces trois années.

Je remercie également tous les membres qui ont composé l'équipe B3D au cours de ces trois dernières années, pour leur convivialité, pour les moments partagés ensemble comme les échanges lors de nos pauses café. Également, je garderai de merveilleux souvenirs des journées raclettes, des journées barbecues autour de l'étang ou encore des journées ludiques organisées par l'ADAS. Ce sont des moments que je n'oublierai pas !

Merci donc à **Jean-Christophe PIARD**, Ingénieur de recherche et **Maud DARSONVAL**, Maître de conférence ; sans oublier **Charlène LENEVEU-JENVRIN**, que je remercie pour son infinie gentillesse, sa participation et son soutien dans le début de ma thèse ainsi que pour tous nos fous rires. Ce fut mon coup de cœur amical de la thèse !

Je voudrais également remercier dans l'équipe B3D, plus particulièrement les personnes avec qui j'ai pu partager mon bureau en open space surnommé « la crèche » et avec qui, j'ai passé de super moments :

Marina GREGOIRE, Technicienne de recherche, pour sa bonne humeur au quotidien, pour toutes ses taquineries, pour son écoute attentive et pour tous les goûters de la journée !

Julien DESCHAMPS, Technicien de recherche, pour m'avoir formée sur « THE » microscope confocale à balayage laser et pour ses talents de photographes mis parfois à contribution de bonnes blagues !

Yasmine DERGHAM, doctorante, qui a été une très belle rencontre, je la remercie pour son écoute, son soutien, sa grande amitié et aussi de m'avoir permis de bien progresser en anglais à travers toutes nos passionnantes discussions.

Virgile GUENEAU, chargé de recherche, pour son humour, et sa bonne humeur quotidienne.

Merci également à **Cédric SAINT-MARTIN**, doctorant, pour son humour décalé !

Merci à tous les post-doctorants, doctorants et stagiaires précédents et actuels de l'équipe B3D dont particulièrement **Armelle PAULE**, **Aurélia PERNIN**, **Caroline PANDIN**, **Cécile TOUCHE**, **Sabrina YAHIAOUI** pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci aussi à **Roza MOHAMMEDI**, stagiaire de Master 1, qui a participé à mes expérimentations au laboratoire.

Je remercie également toute l'équipe actuelle ou précédente du service microbiologie de Clarins qui ont toujours été très accueillants et prêts à m'aider, et particulièrement **Myriam HABOUL, Sylvie VINZANT, Lydie JOUAN, Ophélie BLEOGAT et Charlène BERMONT**.

Un grand merci à « mon p'tit » alias « Minus », **Aurélie TRAINOY**, chargée de projet microbiologie recherche à Clarins, qui m'a formée sur les Challenge-tests et la formulation, elle a toujours fait tout son possible pour m'aider pendant ces années de thèse. Une très belle rencontre et une amitié qui durera je l'espère !

Merci à **Elena EXPOSITO-GARCIA**, chef de projet au service matière première et formulation de Clarins, qui a toujours été disponible et souriante pour répondre à mes multiples questions sur la formulation cosmétique.

Enfin, je tiens à remercier tous **mes proches, ma famille et « meS Amis »**, avec qui j'ai pu partager, mes émotions, mes humeurs, et qui m'ont apporté leurs soutiens et leurs encouragements dans tout ce que j'ai entrepris.

Une mention particulière est attribuée à **mes parents** qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes études et dans ma vie, et cela depuis toute petite. Je ne les remercierais jamais assez pour tous ce qu'ils m'ont apporté dans la vie.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

BATH : Bacterial Adhesion To Hydrocarbon

BHA : Butyl Hydroxy Anisole

BHT : Butyl Hydroxy Toluène

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

Calcéine-AM : Acétoxyméthyl ester de calcéine

CAS : Chemical Abstracts Service

CFU : Colony Forming Unit

CIB : Critère d'Information Bayésien ou Bayesian Information Criterion

CTAB : Bromure d'hexadécyl triméthyl ammonium

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMC : Concentration Micellaire Critique ou Critical Micelle Concentration

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DDM : Date de Durabilité Minimale

D.E.F.I : Dispositif Exclusif Formule Intacte

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

Émulsion (h/e) ou (e/h) : Émulsion huile dans eau ou eau dans huile

EN : European Norm

g : Gramme

GLDA : Diacétate de glutamate de tétrasodium

GMS : Monostéarate de glycérol

HLB : Balance hydrophile/lipophile ou Hydrophilic Lipophilic Balance

INCI : International Nomenclature of Cosmetic Ingredients

INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

ISO : International Organization for Standardization

LLD : *Lactococcus lactis* diacetylactis

log : Logarithme

MATS : Microbial Adhesion To Solvents

MCBL : Microscopie confocale à balayage laser ou Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

ME : Mobilité électrophorétique

mV : Millivolt

NA : Ouverture numérique ou Numerical Aperture

NF : Norme Française

PAO : Période Après Ouverture

PEG : Polyéthylène glycol

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SDA : Sabouraud Dextrose Agar

SDS : Sulfate de sodium et de dodécyle

TSA : Tryptone Soja Agar

TSB : Tryptone Soja Bouillon

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des figures

| | |
|---|-----------|
| <i>Figure 1 : Représentation schématique d'une émulsion huile dans eau (h/e) à gauche et d'une émulsion eau dans huile (e/h) à droite.</i> | <i>22</i> |
| <i>Figure 2 : Représentation schématique des différents mécanismes de déstabilisation d'une émulsion.</i> | <i>26</i> |
| <i>Figure 3 : Causes et conséquences des contaminations microbiennes dans les produits cosmétiques (Halla et al. 2018).</i> | <i>32</i> |
| <i>Figure 4 : Staphylococcus aureus observé au Microscope Électronique à Balayage (MIMA2, INRAE, 2018. Plateforme de Microscopie et Imagerie des Microorganismes, https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12, A. Canette, S. Almoughrabie).....</i> | <i>33</i> |
| <i>Figure 5 : Mécanisme d'action des acides organiques sur les microorganismes (Lambert and Stratford 1999).....</i> | <i>37</i> |
| <i>Figure 6 : Formule chimique de la chlorphénésine ou 3-(4-chlorophenoxy)-1,2-propanediol.....</i> | <i>39</i> |
| <i>Figure 7 : Liste non exhaustive des conservateurs de type acide organique, alcool, phénol et aldéhyde utilisés en cosmétique, adaptée de Halla et al. (2018).</i> | <i>40</i> |
| <i>Figure 8 : Procédure de challenge-test (Russell 2003).....</i> | <i>42</i> |
| <i>Figure 9 : Principe de fonctionnement d'un microscope confocale à balayage laser (Paddock 2000).....</i> | <i>46</i> |
| <i>Figure 10 : Structure et mécanisme d'action de la calcéine-AM.....</i> | <i>50</i> |
| <i>Figure 11 : Observation spatio-temporelle (en min) de la perte de fluorescence verte de la calcéine-AM par MCBL dans des biofilms de Staphylococcus epidermidis suite à l'exposition de quatre antimicrobiens. De haut en bas, témoin sans antimicrobien, biofilms avec 10mg/l d'acide hypochloreux, 50 mg/l d'acide hhypochloreux, 50mg/l de glutaraldéhyde, 50mg/l de chlorure d'alkyldiméthyl benzylammonium ou 50 mg/l de nisine. Figure adaptée de l'étude de Davison et al. (2010).</i> | <i>51</i> |
| <i>Figure 12 : Représentation des principales formes de cinétiques d'inactivation microbienne. A gauche : linéaire (∇, forme I), linéaire avec traîne (\times, forme II), en forme de sigmoïde (\square, forme III), linéaire précédée d'un épaulement (\circ, forme IV). A droite: biphasique (∇forme V), concave (\times, forme VI), biphasique précédée d'un épaulement (\square, forme VII) et convexe (\circ, forme VIII) (Geeraerd et al. 2005).</i> | <i>55</i> |
| <i>Figure 13 : Représentation du nombre de microorganismes survivants au cours du temps après la mise en contact de différentes concentrations de biocides (modèle primaire) (A) et relation en coordonnées logarithmiques, pour une même efficacité d'inactivation microbienne (ici $1 \log_{10}$), entre la concentration C et le temps d'action du</i> | |

| | |
|--|----|
| <i>biocide, en fonction du coefficient d'efficacité du biocide a (modèle secondaire) (B) (Naitali et al. 2017).</i> | 58 |
| <i>Figure 14 : Dispositif pour mesurer la mobilité électrophorétique ou le potentiel zêta (Guillaume 2010).</i> | 60 |
| <i>Figure 15 : Interaction entre E. coli JM109 chargé négativement et les gouttelettes d'une émulsion hexadécane/eau stabilisée avec un émulsionnant chargé positivement. Observation de l'émulsion sans bactérie (à gauche, x400), avec bactéries observées au x400 (au centre) et avec bactéries observées au x 1000 (à droite) au microscope optique (Li et al. 2001).</i> | 61 |
| <i>Figure 16 : Observation microscopique d'émulsions (marquées au rouge de Nil, en rouge) contenant du CTAB ou du Tween 20 mis au contact de bactéries LLD18 (charge à -18 mV, au centre) ou LLD16 (charge à -43mV, à droite) toutes les deux marquées au Dapi (en vert). Émulsion sans bactérie à gauche (Ly, Naitali-Bouchez, et al. 2006).</i> | 61 |
| <i>Figure 17 : Principe de la méthode de MATS en prenant l'exemple de la mise en contact de l'hexadécane avec des bactéries hydrophiles et hydrophobes (Burgain et al. 2014).</i> | 63 |
| <i>Figure 18 : Observation microscopique de l'adhésion de deux bactéries lactiques ayant des propriétés d'hydrophobicité différentes sur une gouttelette. A gauche, LLD18 avec 30% d'affinité à l'hexadécane et à droite, LLD16 avec 3% d'adhésion à l'hexadécane (Ly, Vo, et al. 2006).</i> | 64 |
| <i>Figure 19 : Images de microscopie représentant la distribution spatiale des bactéries (en vert) dans les produits cosmétiques commercialisées (phase lipidique en rouge) obtenues par MCBL à l'objectif 40x sec. Observation au 40x par MCBL d'une solution de fluorphlogopite synthétique non marquée (A) et marquée au SYTO9 (B). Particules présentes dans le gel 3 observée au 40x avec un zoom 1.5 par MCBL (C) et au microscope optique x 40 (D). Observation au 40x par MCBL d'une solution de polyméthacrylate non marquée (E) et marquée au SYTO9 (F).</i> | 75 |
| <i>Figure 20 : Suivi de fluorescence par MCBL (40x) après marquage de S. aureus au SYTOX green dans de l'eau physiologique contenant différentes concentrations de potassium cetyl phosphate.</i> | 79 |
| <i>Figure 21 : Electrophoretic mobility of three S. aureus strains (A) and the lipid droplets of a model matrix (B) at a pH from 3 to 8. Data are expressed as the mean ± standard deviation of two biological replicates.</i> | 93 |
| <i>Figure 22 : Frequency distribution of S. aureus CIP 4.83 surface fluorescence among 675 images mean and variance associated in matrices 1 (A) and 6 (B) and a series of 225 CLSM images in matrices 1 (C) and 6 (D).</i> | 94 |
| <i>Figure 23 : Ratio of bacterial recovery obtained with 0% or 1.6% acrylate polymer by plate count (A) and by CLSM enumeration from five series of 225 images (B).</i> | 95 |

Figure 24 : Frequency distribution of three strains of S. aureus of surface fluorescence among five series of 225 CLSM images in matrices with various concentrations of acrylate copolymer (from 0% to 1.6%) or guar gum (2.5%), mean and variance associated..... 96

Figure 25 : Correlation between bacterial enumeration by plating (log10 CFU/g) and bacterial enumeration by CLSM imaging (log10 bacteria/g). 110

Figure 26 : S. aureus inactivation kinetics obtained by HCS-CLSM in cosmetic model matrices with several concentrations of chlorphenesin (A) and benzyl alcohol (B). Example of the loss of bacterial fluorescence assessed by HCS-CLSM over time for two concentrations of chlorphenesin (C). 111

Figure 27 : Relation between the Dc value and the concentration of chlorphenesin (A, B) and benzyl alcohol (C, D) by fitting of model#1 (A and C) and model#2 (B and D). 112

Figure 28 : Correlation between the observed bacterial log-reductions and the predicted ones using Bigelow linear-model (white dots) or IQ model (black dots) for chlorphenesin (A) and benzyl alcohol (B). 113

Figure 29 : Illustration of the possible prediction of the evolution of the bacterial population over seven days for four concentrations of chlorphenesin (A) or benzyl alcohol (B) with Bigelow linear-model (dotted lines) or IQ model (plain lines). 114

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| <i>Tableau 1 : Relation entre la gamme de HLB et leur solubilité dans l'eau d'après (Epstein 2006).</i> | 23 |
| <i>Tableau 2 : Liste non exhaustive de produits à faible risque d'après ISO 29621:2017 (Feuilloley 2018)</i> | 30 |
| <i>Tableau 3 : Gamme de valeurs physico-chimiques dans une formule permettant la croissance des microorganismes (Berthele et al. 2014).</i> | 34 |
| <i>Tableau 4 : Critères d'évaluation pour l'essai d'efficacité de la protection antimicrobienne d'après la norme NF EN ISO 11930.</i> | 43 |
| <i>Tableau 5 : Exemples de fluorochromes utilisés pour marquer les bactéries et les constituants de matrices complexes (Bridier et al. 2015).</i> | 48 |
| <i>Tableau 6: Principales caractéristiques des produits cosmétiques commerciaux testés.</i> | 70 |
| <i>Tableau 7 : Composition de la matrice modèle 35/65 h/e%.</i> | 71 |
| <i>Tableau 8 : Synthèse des essais réalisés dans la crème 8 et la matrice modèle avec les images de microscopies associées représentant la distribution spatiale des bactéries (en vert) dans les matrices cosmétiques (en rouge). Pour chaque expérience, un échantillon de trois images représentatives des trente images obtenues au total par MCBL à l'objectif 40x air sont présentées.</i> | 81 |
| <i>Tableau 9 : Estimated parameters (and their 95% CI intervals) and performance criteria of both secondary models.</i> | 113 |

Sommaire

| | |
|--|----|
| <i>Remerciements</i> | 3 |
| <i>Liste des abréviations</i> | 6 |
| <i>Liste des figures</i> | 8 |
| <i>Liste des tableaux</i> | 11 |
| <i>Sommaire</i> | 12 |
| <i>Introduction générale</i> | 16 |
| CHAPITRE I : Étude bibliographique | 19 |
| I - Formulation cosmétique | 20 |
| 1 - Définitions d'un produit cosmétique..... | 20 |
| 2 - Composition des produits cosmétiques..... | 20 |
| 2.1 – Excipients..... | 20 |
| 2.1.1 - Phase aqueuse..... | 21 |
| 2.1.2 - Phase lipidique..... | 21 |
| 2.1.3 – Émulsionnants..... | 21 |
| 2.2 - Additifs..... | 23 |
| 3 – Étude de la stabilité physique et chimique d'une formule cosmétique émulsionnée..... | 25 |
| 3.1 – Étude de la stabilité physique..... | 25 |
| 3.2 – Étude de la stabilité chimique..... | 28 |
| II - Risques microbiologiques des produits cosmétiques | 29 |
| 1 - Produits à risques microbiologiques..... | 29 |
| 2 - Contaminants microbiens des cosmétiques..... | 30 |
| 3 - Conservation antimicrobienne des produits cosmétiques..... | 33 |
| 3.1 - Facteurs de conservation extrinsèques à la formule cosmétique..... | 33 |
| 3.2 - Facteurs de conservation intrinsèques à la formule cosmétique..... | 34 |
| 3.2.1 - Conservation liée aux caractéristiques physico-chimiques de la formule..... | 34 |
| 3.2.2 - Conservation liée à l'ajout de conservateurs..... | 36 |
| 3.2.2.1 - Définition et réglementations..... | 36 |
| 3.2.2.2 - Principaux conservateurs en cosmétique et leur mode d'action.. | 37 |
| III - Évaluation et modélisation de l'inactivation bactérienne | 41 |
| 1 – Évaluation de la conservation d'un produit par la méthode de Challenge-test..... | 41 |

| | |
|---|------------------|
| 1.1 – Définition et procédure du Challenge-test..... | 41 |
| 1.2 – Facteurs pouvant affecter la fiabilité du challenge-test..... | 44 |
| 2 - Évaluation de l'inactivation bactérienne par Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)..... | 45 |
| 2.1 - Principe de la MCBL..... | 45 |
| 2.2 – Principe de la fluorescence et exemples de quelques fluorochromes..... | 47 |
| 2.3 – Suivi de l'inactivation bactérienne par la MCBL..... | 49 |
| 3 – Prévion de l'efficacité des systèmes de conservation et des durées de vie de produits cosmétiques | 52 |
| 3.1 – Méthode d'estimation de la durée d'utilisation utilisée dans l'industrie cosmétique..... | 52 |
| 3.2 – Prévion de l'inactivation de la population microbienne dans le temps grâce à l'utilisation de modèles primaires | 54 |
| 3.3 – Prévion de l'activité d'un conservateur selon sa concentration grâce à des modèles secondaires d'inactivation | 57 |
| IV - Interactions entre les constituants des matrices émulsionnées, les bactéries et les conservateurs : conséquence sur la conservation des produits..... | 58 |
| 1 – Influence des interactions physico-chimiques entre bactéries et constituants de matrices émulsionnées sur la répartition des bactéries contaminantes dans les produits..... | 59 |
| 2 – Influence de la composition et de la structure de matrices émulsionnées sur l'efficacité antimicrobienne des conservateurs..... | 64 |
| <i>CHAPITRE II : Étude de la distribution spatiale des bactéries dans les formules cosmétiques.....</i> | <i>66</i> |
| I - Introduction..... | 67 |
| II - Identification des facteurs limitant la répartition homogène des bactéries dans les matrices cosmétiques | 68 |
| 1 - Introduction | 68 |
| 2 - Matériels et méthodes..... | 68 |
| 2.1 - Souche bactérienne et méthode de culture | 68 |
| 2.1.1 Obtention de précultures en milieux gélosés ou liquides..... | 68 |
| 2.1.2 - Préparation des suspensions de travail | 69 |
| 2.2 - Matrices cosmétiques..... | 69 |
| 2.2.1 - Produits commerciaux testés..... | 69 |
| 2.2.2 Matrice modèle | 71 |
| 2.2.2.1 - Composition..... | 71 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2.2 - Formulation | 72 |
| 2.2.3 - Caractérisation physico-chimique des matrices cosmétiques..... | 72 |
| 2.3 – Observation de la répartition bactérienne par microscopie confocale à balayage laser (MCBL)..... | 72 |
| 2.3.1 - Marquages des bactéries | 72 |
| 2.3.2 - Marquage et inoculation de la formule cosmétique..... | 73 |
| 2.3.3 – Acquisition par MCBL et analyse d’images..... | 74 |
| 3 - Résultats et discussion..... | 74 |
| 3.1 - Analyse de la distribution bactérienne dans les produits cosmétiques commercialisés..... | 74 |
| 3.2 - Mise en évidence des matières premières impliquées dans la distribution spatiale des bactéries par formulation de matrices cosmétiques modèles..... | 79 |
| 4 - Conclusion..... | 82 |
| III - Impact des facteurs influençant la distribution spatiale des bactéries | 82 |
| 1 - Synthèse de l’étude | 82 |
| 2 - Article 1 « Mosaic-CLSM assessment of bacterial spatial distribution in cosmetic matrices according to matrix viscosity and bacterial hydrophobicity » | 85 |
| 2.1 - Abstract | 85 |
| 2.2 - Introduction..... | 85 |
| 2.3 - Materials and Methods | 87 |
| 2.3.1 - Bacterial strains and culture conditions..... | 87 |
| 2.3.2 - Chemicals and materials..... | 88 |
| 2.3.3 - Characterization of bacterial surface properties | 88 |
| 2.3.4 - Cosmetic matrices..... | 89 |
| 2.3.5 - Characterization of the emulsified matrices | 89 |
| 2.3.6 - Enumeration of the bacterial population..... | 90 |
| 2.3.7 - Mosaic-Confocal Laser Scanning Microscopy (M-CLSM) and image analysis | 90 |
| 2.3.8 - Statistical analysis..... | 91 |
| 2.4 - Results..... | 91 |
| 2.4.1 - Determination of bacterial surface properties..... | 91 |
| 2.4.2 - Determination of matrix properties | 92 |
| 2.4.3 - Bacterial spatial distribution in commercial emulsions | 93 |
| 2.4.4 - Bacterial spatial distribution and enumeration in matrices with thickener | 94 |
| 2.4.5 - Spatial distribution of three <i>S. aureus</i> strains according to their level of hydrophobicity in matrices with thickener | 96 |

| | |
|--|------------|
| 2.5 - Discussion..... | 97 |
| 2.6 - Conclusion..... | 99 |
| CHAPITRE III : Évaluation et prévision de l'action antimicrobienne dans les formules cosmétiques..... | 100 |
| I - Synthèse de l'étude | 101 |
| II - Article 2 « Rapid assessment and prediction of preservative efficiency in cosmetic products using High Content Screening – Confocal Laser Scanning Microscopy »..... | 103 |
| 1 - Abstract | 103 |
| 2 - Introduction | 104 |
| 3 - Materials and Methods | 106 |
| 3.1 - Chemicals and materials..... | 106 |
| 3.2 - Bacterial strain and culture conditions..... | 106 |
| 3.3 - Preparation and characterization of the emulsified model matrix | 106 |
| 3.4 - Bacterial staining and matrix inoculation..... | 107 |
| 3.5 - Enumeration of the bacterial population by drop-plate method | 107 |
| 3.6 - Acquisition of bacterial inactivation curves by High Content Screening - Confocal Laser Scanning Microscopy (HCS-CLSM) | 107 |
| 3.7 - Primary models for bacterial inactivation | 108 |
| 3.8 - Secondary model for estimation of the Dc-value according to the concentration | 109 |
| 3.9 - Prediction of the log-reduction of the bacterial population over a period of several days..... | 109 |
| 4 - Results..... | 110 |
| 4.1 - Correlation between enumeration by CLSM and plate counting..... | 110 |
| 4.2 - Inactivation of <i>S. aureus</i> according to the concentration of the preservative..... | 110 |
| 4.3 - Estimation of Dc value according to the preservative concentration..... | 112 |
| 4.4 - Prediction of bacterial log reduction on long periods..... | 113 |
| 5 - Discussion..... | 114 |
| 6 - Conclusions..... | 118 |
| Discussion générale et perspectives | 120 |
| Références bibliographiques..... | 128 |
| Valorisation de la thèse..... | 143 |

Introduction générale

Le marché mondial des cosmétiques représente plus de 483 milliards d'euros en 2019. Le premier foyer de consommation est l'Europe avec 78,6 milliards d'euros, suivi des États-Unis avec 67,2 milliards d'euros et de la Chine avec 47,6 milliards d'euros (Cosmetic Valley 2020). La plupart des produits cosmétiques sont favorables à la prolifération des micro-organismes de par leur composition riche en eau et en composés organiques. Suite au développement de ce marché, à la controverse médiatique et au durcissement de la réglementation entraînant des réductions qualitatives et quantitatives des conservateurs, la surveillance et la maîtrise de la contamination microbiologique des produits cosmétiques sont au cœur des préoccupations des industries cosmétiques. Ces contaminations peuvent provoquer la modification des caractéristiques organoleptiques des formules et/ou mettre en péril l'innocuité des produits cosmétiques. La conformité microbiologique ou l'efficacité antimicrobienne d'un produit cosmétique considéré à risque est déterminée par la méthode de challenge-test, définie dans la norme NF EN ISO 11930. Celle-ci consiste à évaluer l'évolution de la population microbienne dans un produit, suite à une inoculation volontaire et contrôlée, par dénombrement de microorganismes spécifiques viables, sur milieux gélosés et à différents intervalles de temps pendant 28 jours. Les challenges tests donnent une indication sur l'efficacité des conservateurs utilisés et sur la qualité microbiologique des produits mis sur le marché mais présentent tout de même quelques limites, notamment du fait d'un protocole fastidieux constitué de nombreuses étapes (dilutions, dénombrements sur boîte, comptages...) mais aussi du fait du long délai d'obtention des résultats. De plus, comme il n'existe pas de protocole universel pour chaque forme galénique évaluée (produits liquides, semi-solides, solides), c'est au responsable microbiologiste de prendre la décision de la mise en place des détails protocolaires les plus adaptés selon les galéniques. Il est donc pertinent de pouvoir évaluer de façon automatisée, précise et fiable la capacité de conservation des formules.

C'est dans ce contexte que le travail présenté dans ce mémoire a eu pour objectif général de mieux comprendre, d'évaluer, de prévoir et d'optimiser le fonctionnement des systèmes conservateurs au sein des matrices cosmétiques. Les formules cosmétiques émulsionnées de forme huile dans eau (h/e) étant les plus répandues en cosmétique, nous les avons choisies comme modèle d'étude. Nous avons par ailleurs

sélectionné *Staphylococcus aureus* comme modèle bactérien car i) il s'agit de l'un des pathogènes les plus retrouvés dans les produits cosmétiques et ii) il est porté sur la peau et les muqueuses de façon asymptomatique par 30% de la population (Ryu *et al.* 2014).

Le présent rapport est composé de trois parties :

- **La première partie** de cette thèse est une étude bibliographique (**Chapitre I**) présentant dans un premier temps des généralités sur la composition et la stabilité physico-chimique des formules cosmétiques. Les risques microbiologiques et les facteurs de conservation des produits cosmétiques sont ensuite abordés, suivi d'une description de l'évaluation et de la modélisation de l'inactivation bactérienne. Enfin, les interactions possibles pouvant exister dans les produits cosmétiques entre les bactéries, les conservateurs et la matrice sont exposées.

- **La deuxième partie** est consacrée à l'exposé des résultats obtenus au cours de cette thèse. Les résultats sont regroupés en deux chapitres.

Le premier chapitre consiste en l'étude de la distribution spatiale des bactéries dans les formules cosmétiques et son influence sur les challenge-tests (**Chapitre II**). Cette partie a pour objectif de décrire et de comprendre le comportement des bactéries dans les matrices cosmétiques en fonction de leurs caractéristiques et de la structuration des matrices.

Le deuxième chapitre présente le développement d'une méthode alternative aux challenge-tests permettant l'évaluation et la prévision de l'action des conservateurs dans les formules cosmétiques (**Chapitre III**). Celle-ci a pour objectif de prédire rapidement et de façon automatisée le niveau d'efficacité des conservateurs en fonction de leur concentration mais aussi de mieux comprendre le comportement des conservateurs en fonction des interactions conservateurs/matrices/bactéries.

- **La dernière partie** conclut ce mémoire par une discussion générale incluant les perspectives du projet.

Cette étude a été réalisée dans l'équipe « Biofilms et Communautés Spatialement Organisées » (B3D) de l'institut Micalis INRAE/AgroParisTech à Jouy-en-Josas, en partenariat avec le service de microbiologie des laboratoires CLARINS. L'équipe B3D mène ses recherches dans le cadre de la sécurité microbiologique des aliments. Elle cherche à comprendre les comportements bactériens au sein de consortiums

tridimensionnels, tels que les biofilms ou les systèmes multiphasiques alimentaires, en étudiant l'impact de microenvironnements hétérogènes sur la diversification des types cellulaires.

CHAPITRE I :

Étude bibliographique

I - Formulation cosmétique

1 - Définitions d'un produit cosmétique

Selon l'article 2 du règlement n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques, un produit cosmétique est défini comme : « toute substance ou mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales ; en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles ».

De nombreuses formes galéniques existent aujourd'hui :

- les dispersions : ce sont des systèmes multiphasiques formés d'une phase dispersante (= continue, externe) au sein de laquelle se trouve une phase dispersée dite discontinue et interne. C'est le cas par exemple des formes galéniques émulsionnées telles que les crèmes et les laits (Figure 1).
- les solutions : mélange de constituants miscibles entre eux (les lotions et eaux démaquillantes)
- les gels : plus ou moins transparents, visqueux et élastiques.
- les formes anhydriques : dont la teneur en eau est nulle (rouges à lèvres, poudres et huiles) (Pensé-Lhéritier and Masson 2016).

2 - Composition des produits cosmétiques

2.1 – Excipients

Les excipients ont un rôle essentiel dans la formulation d'un produit cosmétique, ils permettent le transport des principes actifs et sont en partie à l'origine de la galénique du produit. Dans le cas d'une émulsion de type crème, l'excipient sera composé de la phase aqueuse, de la phase lipidique et d'émulsifiants (Pensé-Lhéritier and Masson 2016).

2.1.1 - Phase aqueuse

Généralement, la phase aqueuse est souvent constituée à plus de 50% d'eau distillée. Elle contient également des polyalcools ayant un double rôle : celui de solvant mais aussi d'agent humectant capable de fixer l'eau par liaisons hydrogène à la surface de l'épiderme grâce à leurs propriétés hygroscopiques (Fukui 2017).

2.1.2 - Phase lipidique

La phase lipidique ou encore appelée phase grasse est souvent composée d'hydrocarbures et de corps gras oxygénés. Les hydrocarbures ont une chaîne carbonée et hydrogénée qui peut être linéaire, cyclique ou ramifiée. Leur structure chimique leur apporte leur propriété hydrophobe. La vaseline et la paraffine sont des hydrocarbures minéraux répandus en cosmétique. La particularité des hydrocarbures comme l'huile de paraffine, est d'avoir un effet semi-occlusif sur la peau en formant un film de protection à la surface de l'épiderme, la protégeant ainsi des potentielles agressions extérieures et favorisant l'hydratation en empêchant l'évaporation de l'eau. Les corps oxygénés retrouvés dans la plupart des produits cosmétiques sont les acides gras, les alcools gras comme l'alcool cétylique qui jouent le rôle d'émollients, les esters gras souvent utilisés comme viscosant, les lipides simples comme les triglycérides et enfin les lipides complexes comme les phosphoglycérides (Kirk-Othmer 2013).

2.1.3 – Émulsionnants

Les constituants indispensables à la formation d'une formule cosmétique émulsionnée sont les émulsionnants, appelés également émulsifiants, surfactants ou tensio-actifs (Figure 1).

Les émulsionnants sont des molécules amphiphiles capables de modifier la tension superficielle entre deux surfaces non miscibles (ex huile/eau). Ils sont composés d'une partie lipophile caractérisée par une longue chaîne carbonée et d'une tête hydrophile. Il en existe deux classes : les tensio-actifs ioniques et non ioniques. Les tensio-actifs ioniques créent des forces de répulsions électrostatiques entre gouttelettes d'émulsion. La tête hydrophile peut être chargée positivement (cationiques), chargée négativement (anionique) ou avoir une charge globale nulle (amphotère). Les tensio-actifs non ioniques ne possèdent pas de charge, ce sont des polymères dont la partie polaire est souvent constituée de polyéthylène glycol (PEG). Ils agissent par encombrement stérique en se positionnant à la surface des gouttelettes d'émulsions

en formant une barrière dense empêchant ainsi l'attraction des gouttelettes entre elles. Il est indispensable de déterminer la concentration d'émulsifiant optimale à utiliser car à trop forte concentration, les molécules de tensio-actifs vont s'agréger entre elles et former des micelles. Cette concentration est appelée concentration micellaire critique (Critical Micelle Concentration ou CMC).

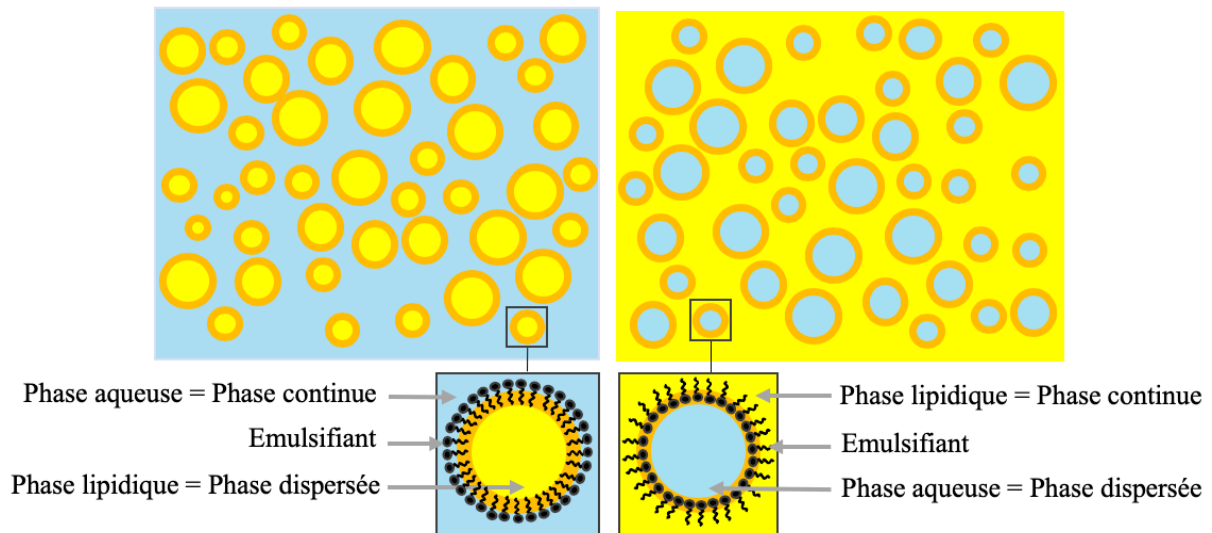


Figure 1 : Représentation schématique d'une émulsion huile dans eau (h/e) à gauche et d'une émulsion eau dans huile (e/h) à droite.

L'action des tensio-actifs dépend de leur solubilité dans chacune des deux phases non miscibles. Celle-ci peut être caractérisée par une balance hydrophile/lipophile, appelée HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance), variant sur une échelle variant de 0 à 20 (Tableau 1). Ce système représente l'équilibre entre les parties hydrophiles et lipophiles du tensio-actif et est donné par la formule ci-dessous :

$$HLB = 20 \times \frac{\text{Masse moléculaire de la partie hydrophile de la molécule}}{\text{Masse moléculaire de la molécule}}$$

Plus la valeur d'HLB sera élevée, plus la solubilité dans l'eau du tensio-actif sera importante. Ce calcul est utilisé pour optimiser la stabilité des émulsions ; si plusieurs tensio-actifs sont ajoutés dans une même émulsion, les valeurs d'HLB de chaque tensio-actif peuvent être additionnées afin d'atteindre l'équilibre requis (Nakama 2017).

Tableau 1 : Relation entre la gamme de HLB et leur solubilité dans l'eau d'après (Epstein 2006).

| Water solubility | HLB range |
|----------------------------------|----------------|
| No dispersibility in water | 1–4 |
| Poor dispersion | 3–6 |
| Milky dispersion after agitation | 6–8 |
| Stable milky dispersion | 8–10 |
| Translucent to clear dispersion | 10–13 |
| Clear solution | 13+ |
| HLB | Application |
| 4–6 | W/O emulsifier |
| 7–9 | Wetting agent |
| 8–18 | O/W emulsifier |
| 13–15 | Detergent |
| 15–18 | Solubilizer |

Abbreviations: HLB, hydrophilic-lipophilic balance; W/O, water in oil; O/W, oil in water.

2.2 - Additifs

Épaississants et gélifiants

Les agents épaississants agissent par encombrement stérique : après leur introduction dans l'eau, l'hydratation permet le passage de la forme enroulée de la molécule, à une forme déroulée occupant un volume plus important induisant une augmentation de la viscosité de la formule (Sadok *et al.* 2013). Ils permettent de stabiliser les émulsions en augmentant la viscosité, limitant ainsi le mouvement des gouttelettes lié à l'attraction terrestre empêchant ainsi le crémage dans le cas d'une émulsion h/e ou la sédimentation (e/h). Les épaississants les plus courants sont les polysaccharides d'origine naturelle, non ioniques (gomme de guar) ou anioniques (gomme de xanthane, carraghénanes et alginates). Les polyacrylates de synthèse comme les carbomères sont également très utilisés en cosmétique. Ils ont un faible pouvoir épaississant en milieu acide mais l'ajout d'une base comme la trométhamine, entraîne la neutralisation des groupements acides carboxyliques. Cette neutralisation engendre une augmentation de la charge électrique des macromolécules, entraînant ainsi leur expansion dans la formule. Les gélifiants participent aussi à la stabilisation d'une émulsion en créant un réseau tridimensionnel par emprisonnement du solvant à travers un enchevêtrement de macromolécules liées entre elles par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes ou d'interactions hydrophobes par exemple. D'autres composés peuvent participer à l'augmentation de la viscosité d'une émulsion comme l'ajout de particules

solides, notamment les silices et les argiles, très utilisées dans la formulation de masques (Lochhead 2017).

Agents conservateurs

Il existe plusieurs types de conservateurs possédant différents spectres d'activité antimicrobienne : contre les bactéries, ils peuvent avoir un effet bactéricide ou bactériostatique et contre les moisissures, un effet fongicide ou fongistatique. L'action d'un conservateur est dépendante de différentes conditions dont le pH, l'incompatibilité avec d'autres constituants ou encore sa solubilité dans la formule. L'efficacité d'un conservateur peut être caractérisée par des valeurs de CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) pour l'effet d'inhibition de la croissance microbienne et de CMB (Concentration Minimale Bactéricide) pour l'effet d'inactivation (ou de destruction). Il est possible d'associer plusieurs conservateurs et cumuler ainsi leur action. Les principaux conservateurs utilisés en cosmétique et leur mode d'action sont présentés dans le **chapitre I-II-3-3.2-3.2.2**.

Antioxydants et filtres UV

Dans les formules cosmétiques, certaines matières premières s'oxydent en présence d'oxygène et des radicaux libres se forment. Les constituants les plus sensibles à l'oxydation sont les huiles, les beurres et les cires. Il existe deux types d'antioxydants : les antioxydants naturels, comme le tocophérol et l'acide ascorbique, et les antioxydants synthétiques, comme le BHA (Butyl Hydroxy Anisole) et le BHT (Butyl Hydroxy Toluène). Les réactions d'oxydation sont favorisées par la présence de cations métalliques (Fe^{3+} , Cu^{2+}) qui peuvent cependant être neutralisés par l'ajout d'un agent chélatant comme l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique). Ce phénomène d'oxydation peut engendrer un rancissement et un brunissement, ce qui porte atteinte à la stabilité du produit. D'autre part, l'aptitude de l'EDTA à chélater des cations métalliques semble contribuer à la protection antimicrobienne des formules, probablement via l'inactivation de cascades enzymatiques indispensables à la survie des microorganismes. Les formules peuvent être également sensibles aux rayonnements lumineux. Elles sont alors dites photosensibles. Un additif anti-UV peut donc être rajouté si le conditionnement du produit n'est pas suffisant pour protéger la formule, comme c'est le cas des crèmes en pots. Le butylmethoxydibenzoylméthane, l'octylméthoxycinnamate et la benzophénone-3 sont des filtres anti-UV, retrouvés couramment en cosmétique. La liste complète des antioxydants et anti-UV autorisés

est disponible dans le règlement CE N°1223/2009. Les filtres anti-UV sont aussi utilisés pour protéger la peau des rayonnements solaires (Kozlowski 2009).

Principes actifs

Par définition, les principes actifs sont directement liés à l'efficacité d'un produit cosmétique. Ils se retrouvent en très faible quantité (environ <3%) dans les formules. L'ajout de principes actifs permet d'apporter différentes propriétés à un produit comme un effet anti-âge (anti-rides, anti-tâches, raffermissants) ou une action sur l'hydratation de la peau (agents humectants, émoullissants, filmogènes) (Pensé-Lhéritier and Masson 2016).

3 – Étude de la stabilité physique et chimique d'une formule cosmétique émulsionnée

3.1 – Étude de la stabilité physique

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables stabilisés par des tensio-actifs. Il arrive dans certains cas, que certains mécanismes de déstabilisation apparaissent (Brochette 2013) (Figure 2) :

- **Le mûrissement d'Ostwald** : Lors de la formulation d'une émulsion, il est assez rare d'avoir une seule et unique taille de gouttelettes. Le mûrissement d'Ostwald est un phénomène irréversible résultant du flux du contenu des petites gouttelettes vers les plus grosses gouttelettes dont la pression interne est plus faible afin d'atteindre un état thermodynamiquement plus stable.
- **La floculation** : C'est un phénomène réversible résultant de l'agrégation des gouttelettes sous l'action d'interactions attractives telles que les forces de Van Der Waals. À cause d'une répulsion insuffisante entre elles, les gouttelettes vont se rapprocher et former des agrégats tout en gardant leur intégrité.
- **Le crémage et la sédimentation** : ceux-ci sont soumis à la densité des phases contenues dans les gouttelettes d'émulsion liée au phénomène de pesanteur et aux mouvements Browniens. Si la phase dispersée, c'est-à-dire la phase contenue dans les gouttelettes est moins dense que la phase dispersante, alors les gouttelettes vont migrer à la surface de l'émulsion et induire un crémage, c'est le cas des émulsions h/e. Au contraire, dans le cas d'une émulsion e/h, la phase contenue dans les gouttelettes pouvant être plus dense que la phase dispersante, les gouttelettes vont à l'inverse

sédimenter au fond de l'émulsion. Ces phénomènes sont réversibles après une redispersion des gouttelettes à l'aide d'une agitation douce par exemple.

- **La coalescence** : C'est un phénomène irréversible résultant de la rupture du film interfacial entre une ou plusieurs gouttelettes et de leur fusion pour former une gouttelette de taille plus importante. Cela peut aboutir à la séparation totale des deux phases : déphasage.

- **L'inversion de phases** : Ce phénomène apparaît lorsqu'un trop grand nombre de gouttelettes est présent dans la phase dispersante. La phase dispersée étant trop concentrée par rapport à la phase dispersante présente en minorité, il y a changement de phase et une émulsion h/e par exemple devient une émulsion e/h.

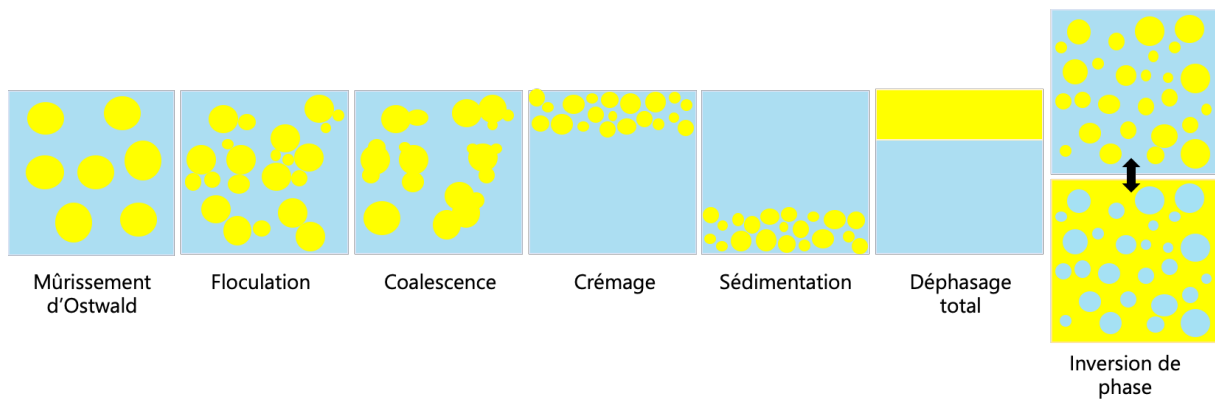


Figure 2 : Représentation schématique des différents mécanismes de déstabilisation d'une émulsion.

Afin de contrôler la stabilité physique de l'émulsion, une étude doit être réalisée selon différents critères d'analyses :

- **L'aspect macroscopique** : Afin de détecter rapidement un problème de stabilité dès la fin de la formulation d'un produit, une observation macroscopique consiste à vérifier à l'œil nu un changement de couleur, un déphasage ou un changement de viscosité visible au cours du temps (Feuilloley 2018).

- **L'aspect microscopique** : L'organisation et la taille des gouttelettes de l'émulsion sont habituellement observées au microscope optique en lumière normale, ce qui permet de visualiser des gouttelettes de l'ordre de 1 μm . En revanche, il est impossible d'observer les micelles, celles-ci étant de l'ordre du nanomètre. D'autres techniques de microscopies peuvent donc être employées telles que la microscopie électronique à transmission ou à balayage (Yamashita and Sakamoto 2017). La microscopie optique en lumière polarisée peut aussi être utilisée pour vérifier la présence de structures

cristallisées pouvant résulter d'une mauvaise solubilisation de certaines matières premières (Feuilloley 2018).

- **La viscosité** : c'est l'un des paramètres directement liés à la composition et à l'organisation des différents constituants dans la formule. Le principe de la mesure de la viscosité d'une formule par un rhéomètre réside dans l'application d'une force de cisaillement à la formule en mettant en rotation un mobile à une vitesse donnée. La résistance de la formule est ensuite mesurée par un capteur. Généralement dans le cas d'une émulsion, plus la force de cisaillement augmente plus la viscosité décroît : on parle de comportement rhéofluidisant (Pensé-Lhéritier and Masson 2016).

- **La granulométrie** : elle permet d'étudier la taille des gouttelettes ainsi que leur distribution volumique dans une formule cosmétique. La méthode la plus utilisée pour caractériser la granulométrie d'une formule est l'utilisation d'un granulomètre laser basé sur le principe de la diffraction de la lumière lors du passage des gouttelettes devant un faisceau laser (Yamashita and Sakamoto 2017).

- **La mobilité électrophorétique (ou potentiel zêta)** : La mobilité électrophorétique permet d'accéder à la charge des gouttelettes de l'émulsion et plus précisément à la charge électrique des molécules adsorbées à leur surface. Cette valeur permet de déterminer les forces de répulsion entre les globules de l'émulsion : plus la répulsion est forte et plus l'émulsion sera stable. Le principe de cette mesure consiste à provoquer la migration des gouttelettes dans une cellule de mesure en appliquant une tension alternative entre deux électrodes. La vitesse de déplacement (V) des gouttelettes sous l'action d'un champ électrique (E) est analysée par une caméra reliée à un microscope. La mobilité électrophorétique (ME) est déterminée par la relation suivante : $ME = \frac{V}{E}$

où ME est exprimée en $\mu\text{m.cm.s}^{-1} .\text{V}^{-1}$, V en $\mu\text{m.s}^{-1}$ et E en V.cm^{-1} (Feuilloley 2018; Pensé-Lhéritier and Masson 2016).

- Les tests de vieillissement accélérés et de dégradation forcée

Afin de garantir la stabilité du produit jusqu'à la fin de sa durée de vie, il est nécessaire de savoir comment celui-ci va évoluer au cours du temps ou dans des conditions extrêmes. Pour cela, deux tests sont couramment utilisés : le test de vieillissement accéléré et le test de dégradation forcée. Le premier consiste à placer le produit au sein d'une enceinte climatique permettant de faire varier, à différentes échelles, la température, l'agitation, la luminosité et l'hygrométrie. Dans le cas d'une émulsion, ce

test sera très utile pour détecter précocement des problèmes liés à la stabilité des gouttelettes tels que la floculation, la coalescence et le crémage. Le vieillissement de la formule peut aussi être étudié en temps réel dans des conditions normales d'utilisation. Le test de dégradation forcée permet d'évaluer la stabilité de la formule dans des conditions extrêmes et consiste en une succession de cycle de centrifugation ou de cycles de réchauffement/ refroidissement (Pensé-Lhéritier and Masson 2016).

3.2 – Étude de la stabilité chimique

Les paramètres généralement contrôlés lors de l'étude de la stabilité chimique d'une formule cosmétique sont les suivants :

- **Le pH ou potentiel hydrogène** est un des paramètres importants à surveiller car la stabilité des gouttelettes d'émulsion ainsi que la sécurité du produit et l'efficacité de ses principes actifs peuvent fortement dépendre de cette mesure. C'est le cas par exemple de certains tensioactifs ou conservateurs qui sont performants seulement dans une gamme de pH donnée (Feuilloley 2018).

- **La mesure de la conductimétrie** est également essentielle à l'étude de la stabilité chimique du produit. Sa valeur va dépendre de la nature et de la concentration des ions présents. Elle est mesurée dans la phase continue. Cette mesure permet de détecter l'inversion de phase d'une émulsion. Elle est définie par la relation suivante :

$$G = \sigma \cdot \frac{S}{l}$$

Avec G : la conductance en Siemens (S), σ : la conductivité de la solution en $S \cdot m^{-1}$, S : la surface des électrodes parallèles en m^2 et l : la distance entre les deux électrodes en m (Pensé-Lhéritier and Masson 2016; Feuilloley 2018).

- **Analyse et dosage des matières premières ou des produits de dégradation :**

La nature et la quantité de certaines matières premières telles que les conservateurs, les actifs, les filtres ou encore les produits de dégradation pouvant résulter d'une réaction entre constituants de la formule, peuvent être évaluées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou par chromatographie liquide à haute pression (Feuilloley 2018; Shen *et al.* 2007).

L'emballage est essentiel pour la protection du produit vis-à-vis de l'environnement extérieur, notamment contre l'oxydation, l'évaporation de constituant volatile ou encore contre les rayonnements lumineux. Cependant, dans certains cas, l'emballage

peut aussi participer à l'altération du produit via des interactions du contenant avec le contenu par migration ou relargage de substance de l'emballage dans la formule (Pensé-Lhéritier and Masson 2016). Dans le cas des emballages plastiques, certains additifs, ajoutés pour améliorer la fonctionnalité de l'emballage, peuvent migrer dans le contenu et s'avérer toxique. C'est le cas par exemple des plastifiants tels que les phtalates qui favorisent la souplesse du plastique mais qui peuvent avoir une toxicité sur la reproduction humaine (Gimeno *et al.* 2012).

II - Risques microbiologiques des produits cosmétiques

1 - Produits à risques microbiologiques

Les formules cosmétiques sont des milieux complexes propices au développement des microorganismes de par leur composition riche en eau et en nutriments... (Herrera 2004). Chaque produit cosmétique présente un niveau de risque microbiologique qui sera différent selon la composition de la formule, le type d'emballage (pots, unidose, pompe airless) ou encore les conditions de fabrication et de remplissage. Tous les produits cosmétiques ne doivent donc pas nécessairement subir des tests d'évaluation de la protection antimicrobienne. En effet, selon la norme ISO 29621:2017, certains produits hostiles à la croissance ou à la survie des microorganismes sont qualifiés à faible risque microbiologique et dispensent alors le fabricant de réaliser des tests microbiologiques. Cette norme définit notamment un ensemble de conditions permettant de considérer les produits comme étant à faible risque. Il s'agit par exemple d'une faible activité de l'eau ($a_w \leq 0,75$), d'un pH ≤ 3 ou ≥ 10 et d'une concentration d'éthanol supérieur à 20%. C'est le cas des produits ne contenant pas d'eau disponible pour la croissance des bactéries tels que les huiles corporelles, les baumes ou rouges à lèvres, ou les poudres dont les fards à joues, ou encore des produits avec un fort pouvoir oxydant tels que les colorants capillaires. Une liste plus détaillée d'exemples est présentée dans le *Tableau 2*. Les produits n'étant pas à faible risque microbiologique doivent au contraire être soumis à des tests d'évaluation de la protection antimicrobienne appelés Challenge-tests (Feuilloley 2018).

Tableau 2 : Liste non exhaustive de produits à faible risque d'après ISO 29621:2017 (Feuilloley 2018)

| Facteur physico-chimique | Limite | Exemple |
|--|----------------|---|
| pH | ≤ 3,0 | Soins peeling (exfoliation de la peau) ; (acide glycolique) |
| pH | ≥ 10,00 | Produits défrisants |
| Anhydre | - | Huile corporelle, crayons |
| Éthanol ou autre alcool | ≥ 20% | Laques, parfums |
| Activité de l'eau (a _w) | ≤ 0,75 | Baumes pour les lèvres, rouge à lèvres, fards à joue crème |
| Température de remplissage | ≥ 65,0 °C | |
| Solvants organiques : Acétate d'éthyle Acétate de butyle | > 10% > 10% | Produits à base de solvants : par exemple vernis à ongles |
| Composés alcalins : Ammoniac Monoéthanolamine | ≥ 0,5% ≥ 1% | Oxydants : Par exemple colorants capillaires, produits pour permanentes. |
| Chlorhydrate d'aluminium et sels connexes | ≥ 25% | Anti-transpirants |
| Peroxyde d'hydrogène | ≥ 3% | Éclaircissement, décoloration, permanentes des cheveux. |

2 - Contaminants microbiens des cosmétiques

Après contamination, les microorganismes peuvent altérer les caractéristiques organoleptiques des produits cosmétiques telles que la couleur, l'odeur... (Figure 3). La présence de contaminants dans le produit avant sa première utilisation est une contamination microbiologique dite primaire. Elle peut être due par exemple à une défaillance des bonnes pratiques de fabrication. On parle de contaminations microbiologiques secondaires lorsque qu'elles apparaissent après ouverture du produit (Feuilloley 2018). Ce type de contamination est souvent dû à l'introduction par le consommateur de microorganismes résidant sur la peau. La contamination par les mains est la plus fréquente, la main accueillant au total près de 1×10^6 bactéries/cm² (Feuilloley 2018). Il peut également être dû à la mise en contact du produit avec les microorganismes présents en suspension dans l'air environnant pendant l'utilisation. Les pathogènes fréquemment retrouvés dans les formules cosmétiques sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter gergoviae*, et *Serratia marcescens* (Halla *et al.* 2018; Hugbo *et al.* 2005; Lundov *et al.* 2009; Lundov and

Zachariae 2008). Chaque année dans le monde, il est recensé par différentes autorités sanitaires (RAPEX, SGS, l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM)...) des rappels de produits cosmétiques à cause de contaminations microbiologiques dont au moins 36 entre janvier 2019 et février 2020 (ANSM 2020; SGS 2020; Lundov and Zachariae 2008). Ces non-conformités ne sont pas fréquentes mais elles peuvent avoir un impact sur la santé publique. On peut notamment citer l'incident lié à une contamination par *Burkholderia cepacia* dans un lait hydratant pour le corps, utilisé dans un service de soins intensifs à l'hôpital en 2006 en Espagne. Suite à l'application de ce lait, certains patients adultes ont développé une bactériémie (Alvarez-Lerma *et al.* 2008). En 2008-2009, un shampooing pour bébé, contaminé par *Serratia marcescens* a également été utilisé dans un service hospitalier pour nourrissons. Plusieurs nouveau-nés dont des prématurés ont subi des infections et un bébé a succombé des suites d'une septicémie et d'une méningite malgré les traitements médicamenteux (Madani *et al.* 2011). Ces exemples montrent qu'il est primordial d'assurer la protection antimicrobienne de chaque produit cosmétique commercialisé.

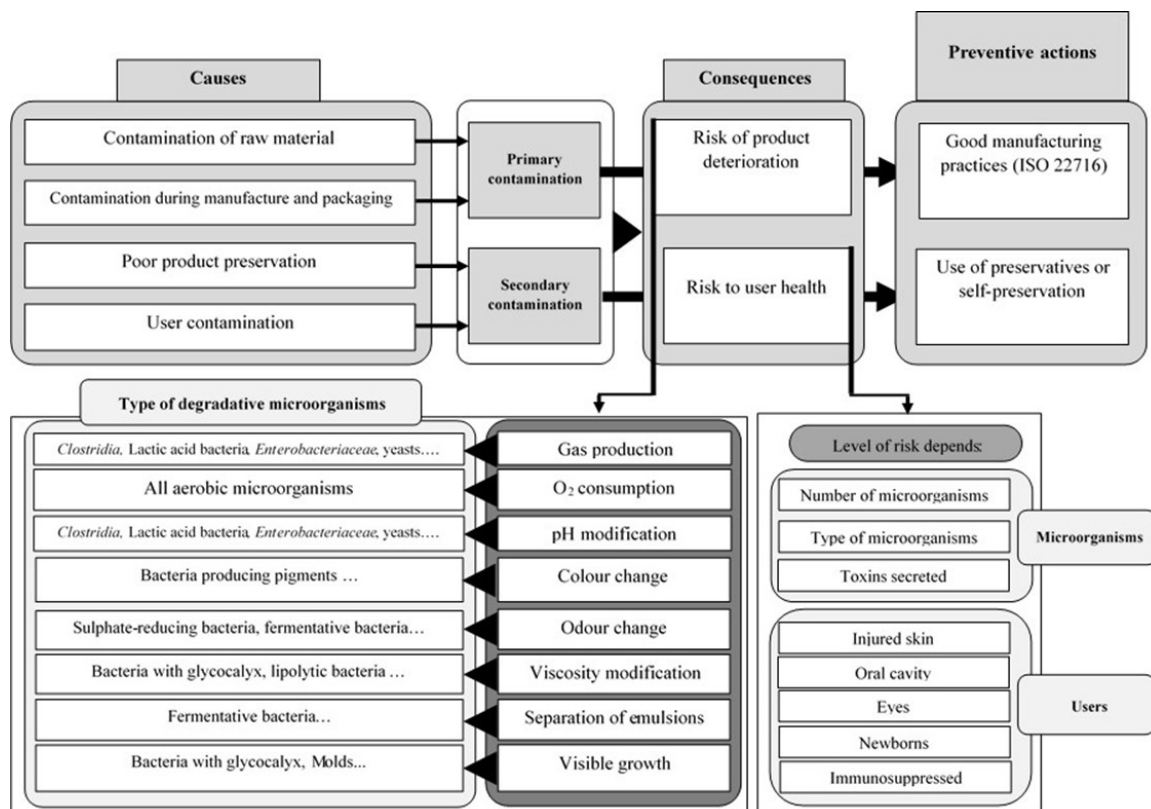


Figure 3 : Causes et conséquences des contaminations microbiennes dans les produits cosmétiques (Halla et al. 2018).

De nombreuses études montrent que *Staphylococcus aureus* est l'une des bactéries les plus fréquemment retrouvées notamment dans des produits cosmétiques tels que les gels douche, crèmes, laits... (Tran and Hitchins 1994; Birteksoz Tan et al. 2013; Campana et al. 2006; Anelich and Korsten 1996). *Staphylococcus aureus*, aussi appelé staphylocoque doré en référence à la couleur or des colonies formées, appartient à la famille des *Staphylococcaceae*. Ce coque se présente souvent sous forme de grappes et mesure environ 0,5 à 1,5 µm de diamètre (Figure 4). C'est une bactérie à coloration de Gram positive, immobile, asporulée, qui possède une catalase et une coagulase. Elle est aéro-anaérobie facultative et se développe à une température optimale comprise entre 35 et 41°C (ANSES 2011). C'est une bactérie opportuniste présente sur la peau et les membranes muqueuses. Elle fait partie de la flore cutanée et est portée par 30% de la population de façon asymptomatique (Ryu et al. 2014). De nombreuses souches produisent des toxines exfoliatives sécrétées sur l'épiderme et sont responsables de maladies infectieuses, notamment des infections de la peau dont des abcès, des furoncles, des impétigos, des folliculites, des phlyctènes... (Lowy 1998; Tong et al. 2015; Bukowski et al. 2010). Certaines souches de *S. aureus* peuvent aussi produire des

entérotoxines staphylococciques (SE) thermorésistantes responsables d'intoxications alimentaires (Le Loir *et al.* 2003; ANSES 2011). Les conditions physico-chimiques d'une formule cosmétique favorable à la croissance de *S. aureus* correspondent à une activité de l'eau $\geq 0,80$ et un pH compris entre 5 et 9 (Feuilleley 2018).

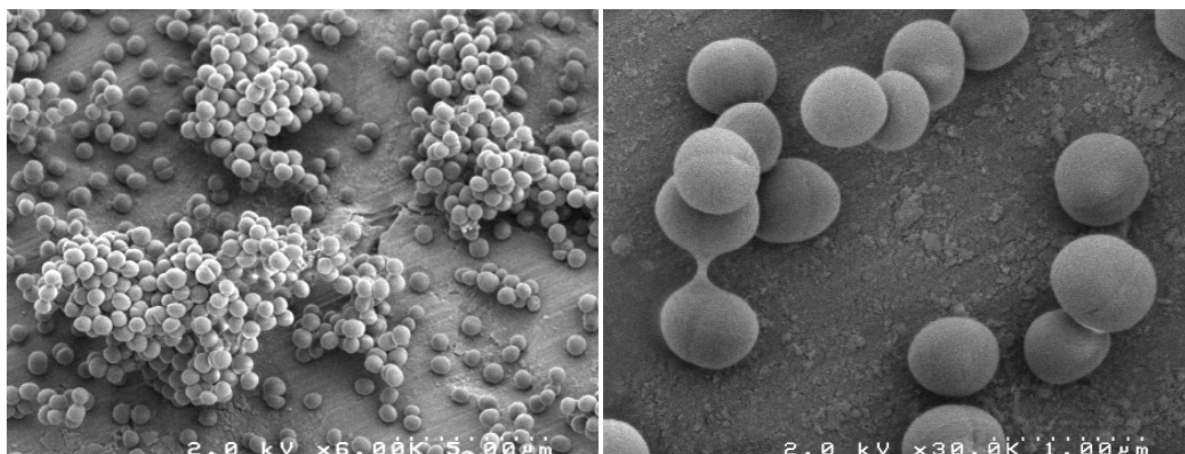


Figure 4 : *Staphylococcus aureus* observé au Microscope Électronique à Balayage (MIMA2, INRAE, 2018. Plateforme de Microscopie et Imagerie des Microorganismes, <https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12>, A. Canette, S. Almoughrabie)

3 - Conservation antimicrobienne des produits cosmétiques

3.1 - Facteurs de conservation extrinsèques à la formule cosmétique

Les bonnes pratiques de fabrication (BPF) : Les produits cosmétiques doivent être fabriqués selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) comme indiqué dans l'article 8 du règlement n°1223/2009 relatif aux produits cosmétiques. La norme NF EN ISO 22716 : 2008 définit des lignes directrices pour la production, le contrôle, le stockage et l'expédition des produits cosmétiques. Afin de réduire le risque de contaminations des produits cosmétiques pendant leur fabrication, un ensemble de mesures peut être entrepris. Par exemple, un système de filtration de l'eau, des contrôles microbiologiques des matières premières, la désinfection de l'équipement et un personnel correctement formé et équipé peuvent réduire considérablement le danger de contamination (Varvaresou *et al.* 2009; ANSM 2016).

La conservation liée à l'emballage : Elle consiste à limiter l'entrée de potentiels contaminants microbiologiques (Devlieghere *et al.* 2015). L'utilisation d'un dispositif de pompage est de plus en plus répandue car elle permet la diminution du risque d'une contamination microbiologique apportée par les utilisateurs en comparaison des pots qui présentent une grande surface d'échange avec l'environnement extérieur et un

contact direct du contenu avec l'utilisateur. Le conditionnement le plus sûr est celui à usage unique en sachet ou en capsule par exemple (Varvaresou *et al.* 2009). De récents développements liés à l'emballage contribuent à limiter efficacement les risques de contaminations microbiennes par les consommateurs. C'est notamment le cas des systèmes d'emballage « airless » à piston qui une fois pressé ne permettent pas l'entrée d'air à l'intérieur du contenant mais qui garde tout de même un volume mort dans la tête du piston. On peut aussi citer le Dispositif Exclusif Formule Intacte (D.E.F.I.) développé à l'initiative des laboratoires Pierre Fabre qui permet de maintenir les formules stériles tout au long de leur utilisation grâce à i) une stérilisation de la formule et/ou des matières premières et des appareils de formulation et à ii) un système d'ouverture/fermeture hermétique du produit. Ce dernier est composé d'une membrane souple qui après une pression de la pompe, se soulève puis revient à sa place initiale, assurant ainsi l'étanchéité du produit. Ce système sans volume mort, permet alors de formuler des produits sans conservateur (Pierre Fabre 2009).

3.2 - Facteurs de conservation intrinsèques à la formule cosmétique

3.2.1 - Conservation liée aux caractéristiques physico-chimiques de la formule

Le développement des microorganismes dans les formules cosmétiques dépend des caractéristiques des microorganismes et des paramètres physico-chimiques des formules (Tableau 3).

Tableau 3 : Gamme de valeurs physico-chimiques dans une formule permettant la croissance des microorganismes (Berthele et al. 2014).

| | Ranges of optimum pH | Minimal ethanol concentration (w/w) | Minimum a_w value |
|----------|----------------------|-------------------------------------|---|
| Bacteria | 4–9 | 8–11% in volume | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : 0.97 <i>Escherichia coli</i> : 0.95 <i>Staphylococcus aureus</i> : 0.86 |
| Yeast | 1.5–8 | 8–11% in volume | <i>Candida albicans</i> : 0.70 |
| Mold | 5–11 | 15–18% in volume | <i>Aspergillus brasiliensis</i> : 0.77 |

La conservation physicochimique d'une formule cosmétique consiste en l'ajustement de plusieurs facteurs :

- **La forme de l'émulsion** : Les émulsions huile dans l'eau (h/e) ont pour phase continue une phase aqueuse, les bactéries se développant dans la phase aqueuse, ce type d'émulsion présente donc plus de risques de contamination qu'une émulsion eau dans huile (e/h) (Varvaresou *et al.* 2009; Halla *et al.* 2018).

- **Le pH** : C'est l'un des paramètres importants jouant un rôle dans la conservation microbiologique d'un produit cosmétique et son impact va dépendre des microorganismes. Le risque de développement bactérien est diminué dans une formule avec un pH < 5 cependant l'effet du pH sur la croissance bactérienne est variable selon les espèces. En revanche, la croissance des moisissures et des levures est possible à pH acide (Berthele *et al.* 2014; Halla *et al.* 2018). La plupart des produits cosmétiques ont un pH compris entre 5 et 8 pour se rapprocher au plus près du pH de la peau qui est environ égal à 5, ce qui ne permet pas la protection des formules.

- **La concentration en éthanol** : Son impact sur la conservation va dépendre également des microorganismes. La présence d'éthanol est par exemple très efficace sur l'inhibition de la croissance de *S. aureus* et de *C. albicans* à une concentration égale à 20% mais pas d'*Aspergillus brasiliensis* (Berthele *et al.* 2014).

- **L'activité de l'eau (a_w)** : Les microorganismes ont également besoin d'une quantité d'eau suffisante pour proliférer dans un milieu. L'activité de l'eau (a_w) est la quantité d'eau libre disponible pour le développement des microorganismes, non impliquée dans des interactions avec d'autres constituants de la formule. Elle est comprise entre 0 et 1 (1 = eau pure) et est calculée en faisant le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau de la formule (p) et de celle de l'eau pure (p_0) à une température donnée selon la relation suivante : $a_w = \frac{p}{p_0}$.

L'activité de l'eau diminue en fonction de la présence de solutés solubles dans la phase aqueuse tels que le glycérol, le butylène glycol, l'éthanol, les polysaccharides et les oligosaccharides (Pensé-Lhéritier and Masson 2016; Halla *et al.* 2018; Enigl and Sorrells 1997).

- **La concentration en glycérine** : Plus la concentration de glycérine est importante dans une formule cosmétique et plus la valeur d' a_w est faible. Une concentration de glycérine supérieure à 16% permettrait d'exempter le produit cosmétique du Challenge-test (Ghalleg *et al.* 2015).

Souvent, l'impact d'un paramètre seul n'est pas suffisant pour inhiber efficacement la croissance des microorganismes dans les produits cosmétiques mais la combinaison de plusieurs de ces facteurs peut permettre d'atteindre cet objectif. Des études montrent un effet synergique entre la concentration en éthanol et le pH sur l'inhibition bactérienne. Ces deux derniers facteurs ainsi que la concentration de glycérine auraient un impact direct sur la baisse de l'activité de l'eau de la formule (Berthele *et al.* 2014). Il serait donc possible de contribuer à la stabilité microbiologique d'un produit cosmétique en utilisant une combinaison judicieuse de plusieurs facteurs cités-cidessus (Ghalleb *et al.* 2015).

3.2.2 - Conservation liée à l'ajout de conservateurs

3.2.2.1 - Définition et réglementations

La réglementation cosmétique N°1223/2009 du parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques, définit les « agents conservateurs » comme toutes « les substances qui sont exclusivement ou principalement destinées à empêcher le développement de micro-organismes dans le produit cosmétique ». Les conservateurs autorisés en cosmétique et leurs concentrations maximales sont répertoriés selon les usages dans l'annexe V du règlement européen N°1223/2009. Le meilleur choix de conservateur à utiliser va dépendre de plusieurs critères, sachant que le conservateur doit (Pensé-Lhéritier and Masson 2016; Halla *et al.* 2018; Scholtyssek 2005) :

- **Être incolore et inodore**
- **Être soluble dans l'eau**, car c'est dans la phase aqueuse que les microorganismes se développent et que l'activité antimicrobienne doit donc être assurée (Shimamoto and Mima 1979).
- **Être efficace sur une large gamme de pH** : en effet, certains conservateurs peuvent avoir une efficacité pH-dépendante, ce qui limite leur utilisation.
- **Ne pas avoir d'impact sur la texture et la viscosité des formules**
- **Avoir un large spectre antimicrobien**
- **Être compatible avec les autres matières premières ainsi qu'avec les procédés de formulations** (stabilité à la chaleur, à l'agitation...).

- Être sans danger pour la santé humaine (sans effet allergène ou irritant, sans effet cancérigène, mutagène et reprotoxique...).

3.2.2.2 - Principaux conservateurs en cosmétique et leur mode d'action

Les principaux conservateurs les plus couramment utilisés sont : les acides organiques, les alcools et phénols, les aldéhydes et les composés d'ammonium quaternaire (Halla *et al.* 2018).

Les acides organiques et leurs sels

Les acides organiques et leurs sels sont très utilisés en cosmétique. Pour la plupart, on les trouve à l'état naturel comme par exemple l'acide benzoïque retrouvé dans certains fruits tels que les canneberges et les airelles. Les acides organiques les plus utilisés en cosmétique sont les acides benzoïque, déhydroacétique, sorbique, propionique, salicylique, formique, indécylénique et leurs sels (Figure 7). Certains sont également utilisés comme additifs alimentaires pour la conservation des aliments. L'activité antimicrobienne des acides organiques dépend de différents paramètres : de leur concentration, de leur solubilité dans la phase aqueuse, de la longueur de leur chaîne carbonée, du pH de la formule... (Lambert and Stratford 1999; Stratford and Eklund 2003; Halla *et al.* 2018).

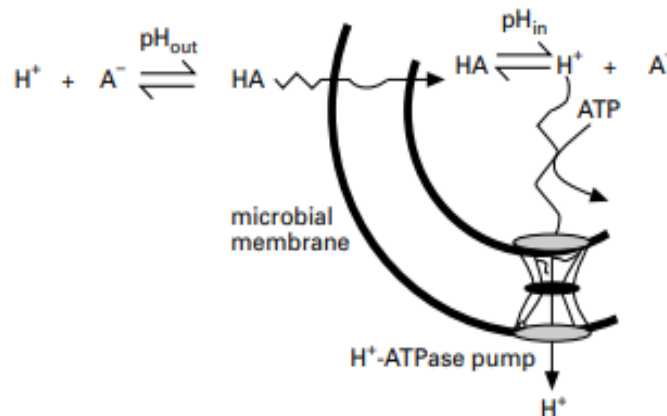


Figure 5 : Mécanisme d'action des acides organiques sur les microorganismes (Lambert and Stratford 1999).

Les acides organiques sont des acides faibles. Ils peuvent partiellement se dissocier dans le milieu environnant libérant ainsi des protons, ce qui a pour conséquence une diminution du pH rendant hostile le milieu extérieur au développement de certains microorganismes. De plus, grâce à leur caractéristique lipophile, ils sont capables de

traverser la membrane plasmique des microorganismes sous forme non dissociée. Une fois dans le cytoplasme, l'acide se dissocie en libérant des protons ce qui induit alors une acidification intracellulaire. Afin de pallier cette diminution de pH, les microorganismes expulsent alors les protons dans le milieu extérieur (Figure 5) et permettent l'entrée d'ions sodium afin de rétablir le pH physiologique intracellulaire. Ceci entraîne également une acidification du milieu environnant du microorganisme, ce qui modifie l'équilibre réactionnel vers la forme non dissociée active des molécules d'acide dissociées présentes dans le milieu extérieur. Ce mécanisme d'action inhibe la croissance des microorganismes qui dépensent toute leur énergie à rétablir le pH intracellulaire. Ainsi, plus le pH d'une formule cosmétique est acide, plus la forme non-dissociée sera présente et plus l'efficacité antimicrobienne sera importante. Pour utiliser efficacement ce type de conservateur, il est donc primordial de tamponner le pH de la formule à une valeur inférieure au pKa de l'acide organique utilisé, ce qui permet d'avoir une forte proportion de forme non-dissociée. La forme dissociée de certains acides organiques à longue et moyenne chaînes ou acides phénoliques tels que l'acide férulique est également active, notamment grâce aux propriétés lipophiles de ces composés qui sont capables de s'insérer dans la double couche de phospholipides membranaires et d'en perturber le fonctionnement (Pernin, Guillier, *et al.* 2019). Il est à noter que certains acides organiques, comme l'acide sorbique et le sorbate de potassium, étant sensibles à la photoxydation, il faut prévoir un emballage cosmétique anti-UV adéquat (Lambert and Stratford 1999; Ricke 2003; Stratford and Eklund 2003; Moore 2008; Stanojevic *et al.* 2009; Paulus 2005c).

Alcools et phénols

Les alcools et les phénols, ayant des propriétés antimicrobiennes reconnues, sont des conservateurs largement utilisés en cosmétique (Figure 7). Les alcools, sont divisés en deux catégories selon leur structure chimique, d'une part les alcools aliphatiques comme le chlorobutanol et d'autre part les alcools aromatiques comme l'alcool benzylique. L'alcool benzylique est plus efficace sur les bactéries à coloration de Gram positive que sur les bactéries à coloration de Gram-négative, les levures et les moisissures (Al-Adham *et al.* 2013; Paulus 2005a; Scholtyssek 2005). Les phénols possèdent au moins un cycle aromatique associé à un groupement hydroxyle (Macheix *et al.* 2006). Les alcools et certains phénols ont la capacité de s'insérer dans la double couche phospholipidique de la membrane bactérienne entraînant la perméabilisation de celle-ci, ce qui a pour conséquence la fuite de divers composants intracellulaires tels

que les ions comme que le potassium, l'ATP, les protéines ou les nucléotides intracellulaires (Al-Adham *et al.* 2013). Les alcools sont aussi capables de dénaturer les protéines membranaires essentielles au métabolisme cellulaire (Al-Adham *et al.* 2013; Paulus 2005a; Scholtyssek 2005). Les phénols agissent également sur d'autres cibles cellulaires, telles que la synthèse des acides aminés bactériens, notamment ceux impliqués dans la formation du peptidoglycane des bactéries. C'est le cas de l'ortho-phénylphénol qui inhibe la biosynthèse de la lysine chez *S. aureus* (Jang *et al.* 2008). Le phénoxyéthanol est un éther monophénolique de l'éthylène glycol très utilisé en cosmétique et est plus efficace sur les bactéries à coloration de Gram positive que celles à coloration de Gram négative (Scholtyssek 2005). Il est souvent ajouté dans une formule cosmétique pour sa faculté à potentialiser l'action antimicrobienne de nombreux autres conservateurs tels que le méthylchloroisothiazolinone et le méthylisothiazolinone (Lundov *et al.* 2011).

Dans cette classe de conservateurs, on peut également citer les parabènes, sujets à controverses pour leurs potentiels effets néfastes sur la santé. Ils sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens pouvant impacter la fertilité humaine (Kirchhof and de Gannes 2013). Ils ont un large spectre antimicrobien et ne sont pas pH-dépendants. Ils perturbent la membrane cytoplasmique des micro-organismes, provoquant ainsi la fuite des constituants intracellulaires (Gorman and Scott 2007).

Il existe également des conservateurs halogénés portant des groupements phénol, tels que la chlorphénésine (Figure 6) et le triclosan. Ces deux molécules, très utilisées en cosmétique notamment en remplacement des parabènes, ont notamment la capacité d'oxyder, de dénaturer les protéines membranaires et d'inhiber la synthèse enzymatique des microorganismes (Paulus 2005c; Moore 2008).

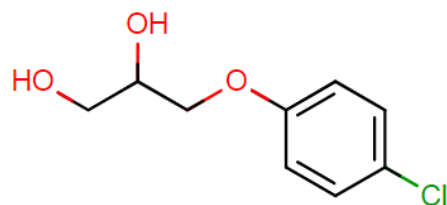


Figure 6 : Formule chimique de la chlorphénésine ou 3-(4-chlorophenoxy)-1,2-propanediol.

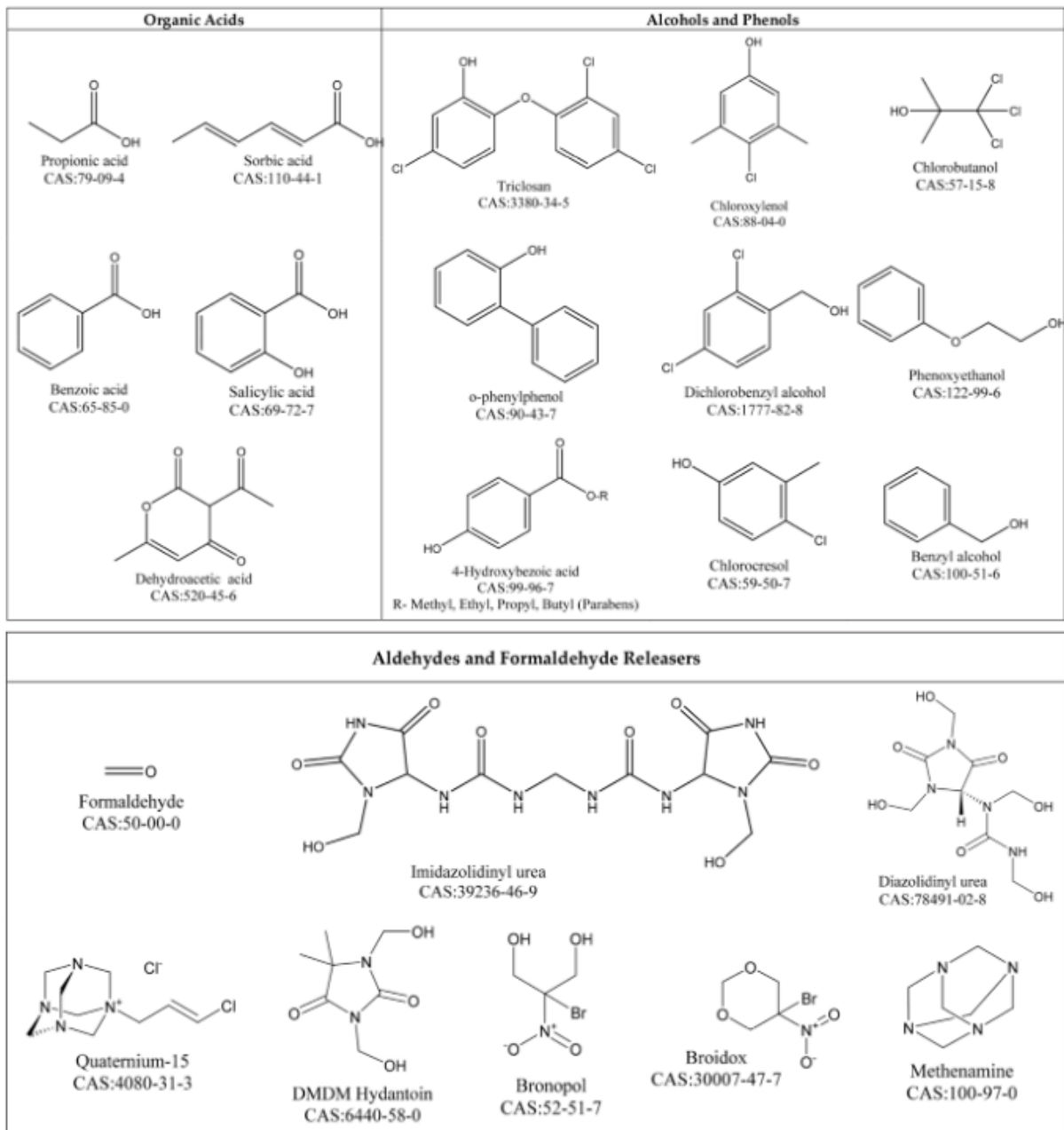


Figure 7 : Liste non exhaustive des conservateurs de type acide organique, alcool, phénol et aldéhyde utilisés en cosmétique, adaptée de Halla et al. (2018).

Les aldéhydes

Les aldéhydes (Figure 7) couvrent un large spectre d'efficacité antimicrobienne. Leur mode d'action consiste principalement à altérer la paroi cellulaire et à inhiber la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Le glutaraldéhyde est un dialdéhyde capable d'altérer les parois cellulaires externes des cellules bactériennes. De plus, son activité antimicrobienne est d'autant plus grande que le pH et la température augmentent. D'autres types de conservateurs tels que l'imidazolidinylurée et le

diazolidinylurée, appelés agents libérateurs de formaldéhydes, sont capables de libérer au cours du temps dans les produits cosmétiques du formaldéhyde qui a pour action d'inhiber la synthèse protéique, d'interagir avec les peptides des parois et d'inhiber le transport des métabolites et des acides nucléiques (Moore 2008; Halla *et al.* 2018; Scholtyssek 2005; Paulus 2005b).

Les composés d'ammoniums quaternaires :

L'action antimicrobienne des composés d'ammonium quaternaire est basée sur l'altération de la membrane cytoplasmique des microorganismes induisant la fuite des composés cellulaires et la lyse cellulaire. En effet, de par leur charge positive, ces composés sont capables de se fixer aux charges négatives des groupements phosphate des phospholipides de la bicouche lipidique de la membrane plasmique des bactéries. La partie hydrophobe (chaîne alkyle) des ammoniums quaternaires s'intègre alors dans la membrane bactérienne et la déstabilise (Buffet-Bataillon *et al.* 2012). Ce mode d'action rend incompatible l'utilisation des composés d'ammonium quaternaire avec des tensio-actifs anioniques. Certains composés d'ammoniums quaternaires tels que le bromure de cétyltriméthylammonium, peuvent se lier aux acides nucléiques provoquant la précipitation de l'ADN (Ioannou *et al.* 2007; Halla *et al.* 2018; Scholtyssek 2005).

III - Évaluation et modélisation de l'inactivation bactérienne

1 – Évaluation de la conservation d'un produit par la méthode de Challenge-test

1.1 – Définition et procédure du Challenge-test

Le challenge-test ou test d'épreuve de la protection microbiologique permet d'évaluer l'efficacité de la conservation d'un produit cosmétique tout au long du processus de fabrication mais aussi au cours de son utilisation par les consommateurs. Le challenge-test est décrit dans la norme NF EN ISO 11930:2019. Deux autres référentiels, ceux des pharmacopées européenne (2014) et américaine USP34-NF29 (2011), peuvent s'appliquer mais leurs critères d'acceptation diffèrent de ceux de la norme NF 11930 (Feuilloley 2018). Les différentes étapes nécessaires à la réalisation d'un challenge-test sont décrites ci-dessous selon la norme NF EN ISO 11930:2019 (Figure 8) :

- **Inoculation des microorganismes d'essai** : Les microorganismes testés sont les suivants, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis*, et *Candida albicans*. Le produit est inoculé par une suspension de microorganismes afin d'obtenir une concentration respectivement comprise entre 1×10^5 et 1×10^6 UFC.ml⁻¹ ou g⁻¹ et 1×10^4 et 1×10^5 UFC.ml⁻¹ ou g⁻¹ pour les bactéries ou pour les levures et moisissures. Le volume de suspension microbienne ajouté ne doit pas dépasser 1% du volume du produit afin d'éviter toute dilution de la formule ou de la concentration en conservateur (Russell 2003).

- **Incubation et prélèvements du produit inoculé** : Le produit inoculé est incubé à température ambiante, à $22,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$. Un échantillon est ensuite prélevé à des intervalles de temps définis, à 7, 14 et 28 jours.

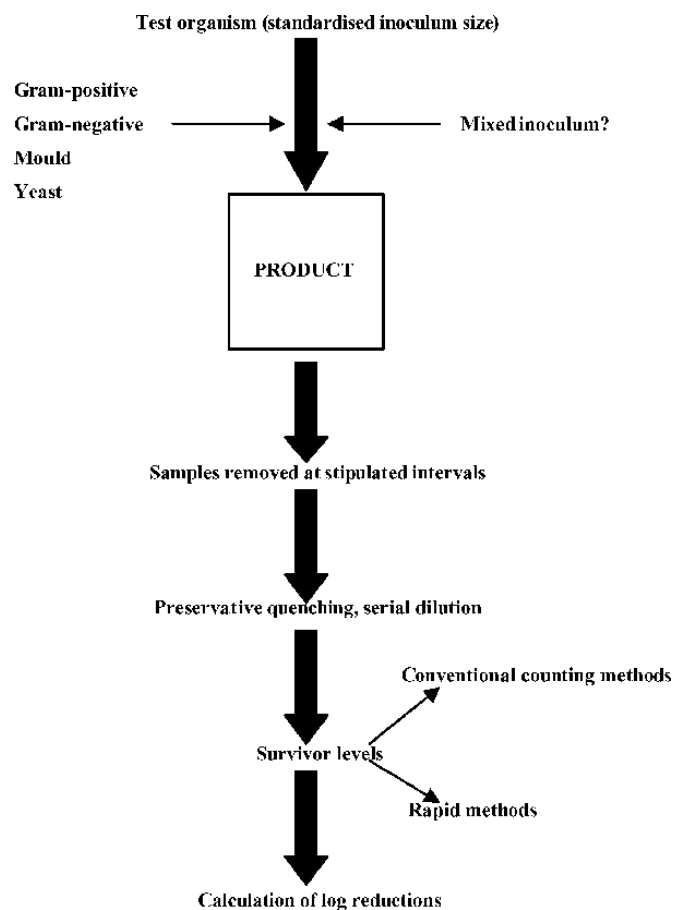


Figure 8 : Procédure de challenge-test (Russell 2003)

- **Neutralisation de l'action antimicrobienne des conservateurs** : Cette étape permet de neutraliser rapidement l'action des conservateurs par dilution de 1 g de formule dans 9 ml de solution de neutralisation maintenu pendant un temps d'attente suffisant pour

stopper l'action du conservateur. Cette étape permet aux bactéries de se développer lors du dénombrement par comptage des colonies sur boîtes de Petri. Le neutralisant ne doit pas lui-même avoir d'effet antimicrobien sur les microorganismes (Johnston *et al.* 2002).

- **Dilutions et dénombrements** : A partir de la dilution au 1/10e dans le neutralisant de la formule contaminée, des dilutions décimales successives sont réalisées afin de dénombrer les microorganismes survivants sur des milieux gélosés spécifiques. Le dénombrement doit être effectué en double. Le milieu Tryptone Soja Agar (Futsaether *et al.* 1993) est utilisé pour les bactéries, le milieu Pomme de terre Dextrose Agar (PDA) pour *A. brasiliensis* et le milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA) pour *C. albicans*.

- **Incubation et comptage des colonies** : Les boîtes sont incubées à 32,5°C ± 2,5°C (température équivalente à celle à la surface de la peau) pendant 48h à 72h pour les bactéries et *C. albicans* ; et à 22,5°C ± 2,5°C pendant 3 à 5 jours pour *A. brasiliensis*.

- **Calcul du taux de réduction logarithmique** : La réduction logarithmique microbienne peut s'exprimer de la façon suivante : $R_x = \log N_0 - \log N_x$ où N_0 est le nombre de micro-organismes inoculés au temps t_0 et N_x est le nombre de micro-organismes survivants à chaque temps de prélèvement, t_x .

- **Comparaison aux critères d'évaluation** : A chaque temps de prélèvement, le taux de réduction logarithmique est calculé et est comparé aux valeurs définies par les critères d'évaluation A ou B (Tableau 4).

Tableau 4 : Critères d'évaluation pour l'essai d'efficacité de la protection antimicrobienne d'après la norme NF EN ISO 11930.

| Taux de réduction logarithmique ($R_x = \lg N_0 - \lg N_x$) requis ^a | | | | | | | | |
|---|-------------|--------------------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|
| Micro-organismes | Bactéries | | | <i>C. albicans</i> | | | <i>A. brasiliensis</i> | |
| Temps de prélèvement | T7 | T14 | T28 | T7 | T14 | T28 | T14 | T28 |
| Critères A | ≥3 | ≥3 et PA ^b | ≥3 et PA | ≥1 | ≥1 et PA | ≥1 et PA | ≥0 ^c | ≥1 |
| Critères B | Non réalisé | ≥3 | ≥3 et PA | Non réalisé | ≥1 | ≥1 et PA | ≥0 | ≥0 et PA |

^a Dans cet essai, une plage d'écart de 0,5 log est acceptable (voir 5.7).
^b PA: pas d'augmentation du nombre de micro-organismes par rapport au temps de contact précédent.
^c $R_x = 0$ lorsque $\lg N_0 = \lg N_x$ (pas d'augmentation par rapport au nombre initial).

Si les valeurs correspondent au critère A, alors le risque microbiologique est considéré comme acceptable et satisfait à la norme sans justification complémentaire. La validation par le critère B permet d'éviter un point de dénombrement supplémentaire

(J7) par les opérateurs. Cependant une analyse complémentaire de risque prenant en compte d'autres facteurs que la formule elle-même doit être réalisée pour satisfaire à la norme. Par exemple l'utilisation d'un contenant protecteur constitué d'un dispositif de pompe est beaucoup moins propice à la contamination microbienne qu'un pot à large ouverture. Enfin, si les valeurs ne correspondent ni au critère A et ni au critère B, une évaluation du risque microbiologique doit être réalisée. Par exemple, les produits cosmétiques délivrés en monodose, peuvent être jugés comme ayant un risque microbiologique acceptable, à condition bien sûr que la qualité microbiologique du produit mis sur le marché soit validée. Si aucun de ces cas n'est rencontré, la protection antimicrobienne du produit ne satisfait pas à la norme et la protection antimicrobienne du produit doit être revue.

1.2 – Facteurs pouvant affecter la fiabilité du challenge-test

La réalisation d'un challenge-test comprend de nombreuses étapes dont des étapes de mélange, dilution et dénombrement sur boîtes (Russell 2003) qui peuvent être à l'origine d'une variabilité de résultats. L'incertitude de mesure pour les dénombrements bactériens est estimée à 0.3 à 0.7 log UFC (Augustin and Carlier 2006; Afssa 2007). Par ailleurs, les microorganismes stressés, notamment après leur inoculation dans des formules cosmétiques en présence de molécules antimicrobiennes, peuvent avoir plus de difficultés à se développer et à croître sur milieux gélosés, ce qui fausse les résultats de comptage (Stephens and Mackey 2003). La fiabilité des challenge-tests peut également dépendre des incertitudes des volumes prélevés par pipetage lors des dilutions en séries ou de l'ensemencement des boîtes (Hedges 2002). Il arrive également que la conservation des formules cosmétiques soit surestimée en raison d'une mauvaise neutralisation de l'activité antimicrobienne des conservateurs avant dénombrement sur boîte (Johnston *et al.* 2002). La préparation de l'inoculum bactérien peut également avoir un impact sur l'état physiologique des bactéries. En effet, il a été montré que les étapes de lavage par centrifugation des cultures peuvent avoir un impact sur la viabilité, l'hydrophobicité et la charge électrique de surface des bactéries, (Pembrey *et al.* 1999; Gilbert *et al.* 1991). Par exemple, une centrifugation à 15 000 x g entraînerait la diminution de la viabilité d'*E. coli* en perturbant l'intégrité de la membrane bactérienne ainsi qu'une baisse de la charge électrique à la surface d'*E. coli* et de *S. epidermidis* (Pembrey *et al.* 1999). Enfin, la taille de l'inoculum peut avoir un effet sur l'activité antimicrobienne des conservateurs. A concentration égale, les agents

antimicrobiens seraient plus efficaces sur des concentrations bactériennes basses (Johnston *et al.* 2000).

Dans ce travail, nous faisons également l'hypothèse qu'une répartition hétérogène des bactéries après inoculation des microorganismes dans la formule peut avoir un impact sur la fiabilité des challenge-tests. Ce dernier aspect fait l'objet du **chapitre II** de la thèse sur la mise en évidence et l'étude de facteurs responsables de la distribution spatiale des bactéries dans des matrices cosmétiques émulsionnées.

2 - Évaluation de l'inactivation bactérienne par Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)

2.1 - Principe de la MCBL

Au cours des vingt dernières années, de nombreuses techniques de microscopie optique innovantes ont émergé telles que la microscopie confocale à balayage laser, commercialisée pour la première fois dans les années 1980 (Amos and White 2003; Cox 2002). La MCBL permet de visualiser de manière non invasive à la fois des structures tridimensionnelles complexes telles que les biofilms mais aussi des organismes à l'échelle de la cellule unique (Boudjemaa *et al.* 2006). Le microscope confocal à balayage laser focalise un faisceau laser en un point de l'échantillon dans un plan focal déterminé et excite les molécules fluorescentes. Le photomultiplicateur détecte et amplifie les photons produits suite au phénomène de fluorescence. Un diaphragme appelé « pinhole » placé devant le photomultiplicateur permet de ne laisser passer que le signal lumineux provenant d'un plan focal objet de l'échantillon (Figure 9). Ces signaux sont ensuite convertis en pixels ce qui permet la reconstitution d'une image observable. Une platine motorisée déplace l'échantillon en hauteur (sur l'axe z) permettant ainsi l'acquisition d'une succession de coupes optiques mesurant chacune environ 500 nm (Valeur 2003; Cox 2002; Paddock 2000).

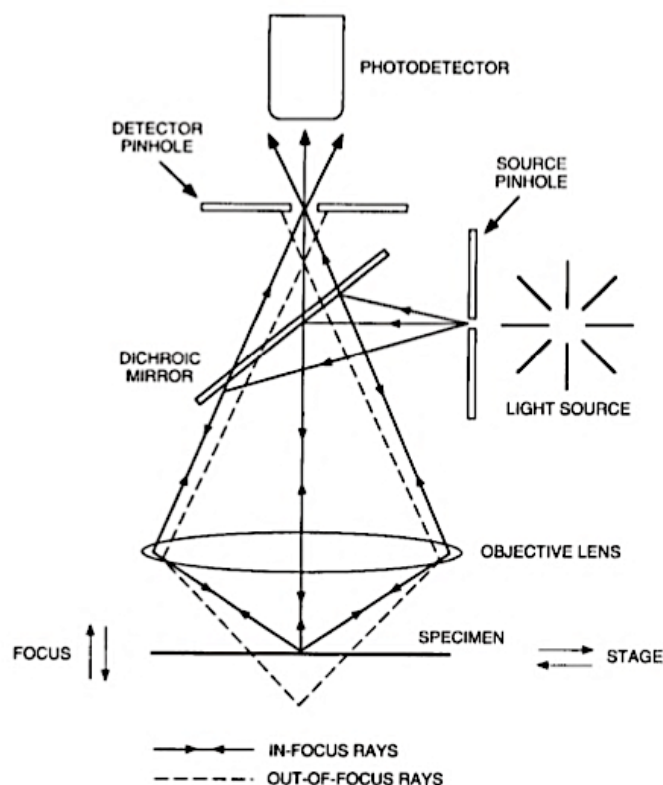


Figure 9 : Principe de fonctionnement d'un microscope confocale à balayage laser (Paddock 2000).

Contrairement à la microscopie classique, la MCBL possède de nombreux avantages dont sa faible profondeur de champ lui procurant une résolution d'images de qualité, même dans des échantillons denses comme des matrices alimentaires émulsionnées, les yaourts ou le fromage (Jeanson *et al.* 2011; Auty 2013; Cardona *et al.* 2013; Ding and Gunasekaran 1998). Un autre avantage de la MCBL est que la plupart du temps, l'échantillon observé n'a pas besoin d'être dénaturé pour être observé (Cardona *et al.* 2013). Il existe plusieurs types d'objectifs selon leur milieu d'immersion, leur grossissement ou leur ouverture numérique. Le choix de l'ouverture numérique (NA, pour Numerical Aperture) de l'objectif peut influencer l'intensité de fluorescence qui augmente avec une ouverture plus grande.

Une fois les images obtenues, il est souvent nécessaire de les traiter avant de les analyser à cause d'un rapport signal sur bruit pouvant dans certains cas être insuffisant. Pour cela, de nombreux logiciels de traitement et d'analyse d'images, tels que ImageJ, Icy, Fiji et bien d'autres, permettent de corriger ce problème par l'application de filtres par exemple. Une fois l'image traitée, ces mêmes logiciels permettent d'extraire les données quantitatives et qualitatives des images notamment après segmentation de

l'image. La segmentation consiste en l'application d'un masque binaire permettant de délimiter des structures ou des objets d'intérêt sur une image et notamment de calculer une surface ou un volume de fluorescence. Dans ces logiciels, de nombreux autres outils et plug-ins sont mis à disposition comme l'édition et l'annotation d'images ou l'extraction de la taille et le comptage automatique d'objets sur une image (Ferreira and Rasband 2012; De Chaumont *et al.* 2012).

2.2 – Principe de la fluorescence et exemples de quelques fluorochromes

Ces dernières années, les molécules aux propriétés fluorescentes appelées fluorochromes ou fluorophores sont de plus en plus utilisées notamment en biologie. Le principe de fluorescence est le suivant : les composés fluorescents dits dans un « état fondamental » absorbent de l'énergie lumineuse (photons) puis sont portés dans un « état excité ». Ce processus est très rapide, il est de l'ordre de quelques femtosecondes. Les molécules repassent alors dans leur état fondamental plus stable en provoquant une libération d'énergie qui peut se traduire par l'émission d'un photon, processus appelé fluorescence. Les fluorochromes ont souvent des structures cycliques et chacun d'entre eux est caractérisé par des spectres d'absorption et d'émission (Lichtman and Conchello 2005; Lakowicz 2006).

De nombreux marqueurs fluorescents ayant différentes cibles cellulaires sont disponibles sur le marché et sont des outils intéressants pour la compréhension de systèmes physicochimiques, biochimiques et biologiques (Tableau 5). Ils permettent d'accéder aux structures ou constituants cellulaires tels que l'ADN, la membrane plasmique, ou les protéines. Trois grandes classes de marqueurs sont utilisés pour l'analyse de viabilité des bactéries :

- **les marqueurs de viabilité** dont le mode d'action est basé sur les activités estérases des bactéries (CFDA, Calcéine-AM...). Ces marqueurs pénètrent passivement les membranes bactériennes jusqu'au cytoplasme où ils sont clivés par des estérases induisant alors la libération de résidus fluorescents (Figure 10).
- **les marqueurs de mortalité**, qui pénètrent seulement dans les bactéries mortes perméabilisées. On peut citer le Sytox Green et l'iodure de propidium qui se fixent sur l'ADN après avoir traversé la membrane bactérienne.

- **les marqueurs totaux**, qui pénètrent à la fois dans les bactéries vivantes et mortes. C'est le cas notamment du SYTO9 et du DAPI ou 4', 6'-diamino-2-phénylindole, qui s'intercalent entre les bases de l'ADN.

Il existe des kits combinant l'action de deux fluorochromes tels que le kit LIVE/DEAD™ BacLight™ composé de deux marqueurs d'ADN, le Syto 9 et l'iodure de propidium permettant de distinguer rapidement les bactéries vivantes aux membranes plasmiques intactes des bactéries aux membranes perméabilisées (Auty, Gardiner, *et al.* 2001; Wadhawan *et al.* 2011).

D'autres fluorochromes peuvent être utilisés pour marquer des constituants de matrices complexes telles que les matrices émulsionnées. Le Rouge de Nil ou « Nile Red » ainsi que le Bodipy sont par exemple très utilisés pour marquer les composés lipidiques présents dans les matrices alimentaires (Ly *et al.* 2008; Auty, Twomey, *et al.* 2001; Bridier *et al.* 2015).

Tableau 5: Exemples de fluorochromes utilisés pour marquer les bactéries et les constituants de matrices complexes (Bridier et al. 2015).

| Fluorescent markers | Target | Applications |
|--|--|--|
| Autofluorescent cellular components | A wide range of metabolites and structural components including flavins, pigments, and NAD(P)H are autofluorescent | Cell detection depending on their autofluorescence spectra |
| Nucleic acid markers: - Syto® nucleic acid stains, DAPI, Acridine orange - Propidium iodide, Sytox® dead cell stains | Nucleic acids. Nucleic acids. Only penetrate in cells with compromised membranes. | Total cell dying. Membrane integrity indicators. |
| Lipophilic markers: FM® styryl dyes | Lipidic residues as the outer leaflet of the surface membrane where they become intensely fluorescent | Cytoplasmic membrane and vesiculation dying. |
| Bodipy® Nile Red DDAO | Lipids, membranes, and other lipophilic compounds Intracellular lipids and hydrophobic domains of proteins Ester, ether and phosphate groups | Lipid droplets Lipid droplets Dying of extracellular DNA |
| Enzymatic markers: - CTC, XTT - CFDA, Calcein-AM, Chemchrome V6® | Clived in fluorescent residue by cellular dehydrogenases. Clived in fluorescent residue by cellular esterases. | Dying of respiratory active cells. Dying of esterase active cells. |
| Amine-, thiol-reactive probes | Amine or thiol residues. | Identification of proteins, modified oligonucleotides, and other amine- or thiol-containing compounds. |
| Dylight® | Amine-reactive dyes used to stain proteins | Caseins |
| Fluorescent lectins: - Concanavalin A - Wheat germ Agglutinin A - Peanut Agglutinin A | a-Mannopyranosyl and a-glucopyranosyl residues Sialic acid and N-acetylglucosaminyl residues Terminal β-galactose | Identification of oligosaccharides, glycoprotein, and other carbohydrates |
| Fluorescent proteins | Constitutive expression by cells Expression in association with specific genes (reporter fusion) | Live observation of cells Monitoring of gene expression, tracking of single molecule in cells |
| Fluorescently labeled antibodies | Specific antigens | Identification of bacterial species or cellular components. |
| Fluorescently labeled oligonucleotide probes | Recombination with specific targeted gene sequence. | Taxonomic identification |

Chaque fluorochrome possède ses propres caractéristiques d'utilisation selon sa sensibilité au pH, sa photosensibilisation, son mode de pénétration ou encore son interaction avec certaines molécules présentes dans le milieu environnant. Il est donc important de bien connaître ces limites pour une utilisation optimale (Valeur 2003).

Le spectre de fluorescence d'un marqueur fluorescent peut par exemple être dépendant de son environnement physicochimique ; on peut citer le Rouge de Nil qui émet une fluorescence rouge lorsqu'il s'intègre dans des membranes phospholipidiques polaires et dans le jaune lorsqu'il se trouve en présence de triglycérides neutres (Brown and Poujol 2006; Rumin *et al.* 2015). L'impact du pH sur la fluorescence d'un marqueur peut être mis à profit dans le développement de fluorochromes, tels que le BCECF, capables de visualiser un niveau de pH intracellulaire (Ozkan and Mutharasan 2002; Futsaether *et al.* 1993).

Par ailleurs, un phénomène de « photobleaching » ou photoblanchiment correspondant à la dégradation irréversible du fluorochrome peut apparaître après l'exposition au laser. Ce phénomène est induit par la génération de réactions photochimiques causées par les dérivés réactifs de l'oxygène et est aggravé par une mauvaise calibration des paramètres de microscopie comme par exemple une trop forte intensité de laser ou une exposition trop longue (Lichtman and Conchello 2005; Wiederschain 2011).

Certaines bactéries à coloration de Gram négative ou positive, dont *Pseudomonas aeruginosa* et *Lactococcus lactis*, possèdent des pompes à efflux qui rejettent le marqueur fluorescent hors de la cellule vivante (Molenaar *et al.* 1992), ce qui rend impossible la visualisation des bactéries (Bridier *et al.* 2011). Cependant des solutions tampons capables d'inactiver ces pompes existent et sont utilisables dans un milieu liquide (Joux and Lebaron 2000; Molenaar *et al.* 1992).

2.3 – Suivi de l'inactivation bactérienne par la MCBL

La microscopie confocale à balayage laser est particulièrement utilisée pour visualiser l'organisation de communautés microbiennes structurées (Bridier *et al.* 2010; Mai-Prochnow *et al.* 2004; Webb *et al.* 2003; Hope *et al.* 2002). Plus récemment, elle a été utilisée pour suivre l'inactivation des microorganismes en temps réel par des agents antimicrobiens, au sein de structures complexes telles que les biofilms. La perte de viabilité des bactéries au sein des structures est suivie par corrélation avec la perte de fluorescence liée à la fuite du marqueur fluorescent hors des cellules dont la membrane est perméabilisée par les agents antimicrobiens.

L'association de la MCBL et le marquage à la Calcéine-AM a permis de suivre l'évolution spatio-temporelle de l'action d'antimicrobiens tels que l'éthanol ou le gluconate de chlorhexidine sur les biofilms. Cette technique associée à l'analyse d'images, a permis

de mesurer la pénétration et l'efficacité des antimicrobiens dans le biofilm et de mettre en évidence la présence potentielle de sous-populations résistantes aux traitements antimicrobiens (Takenaka *et al.* 2008).

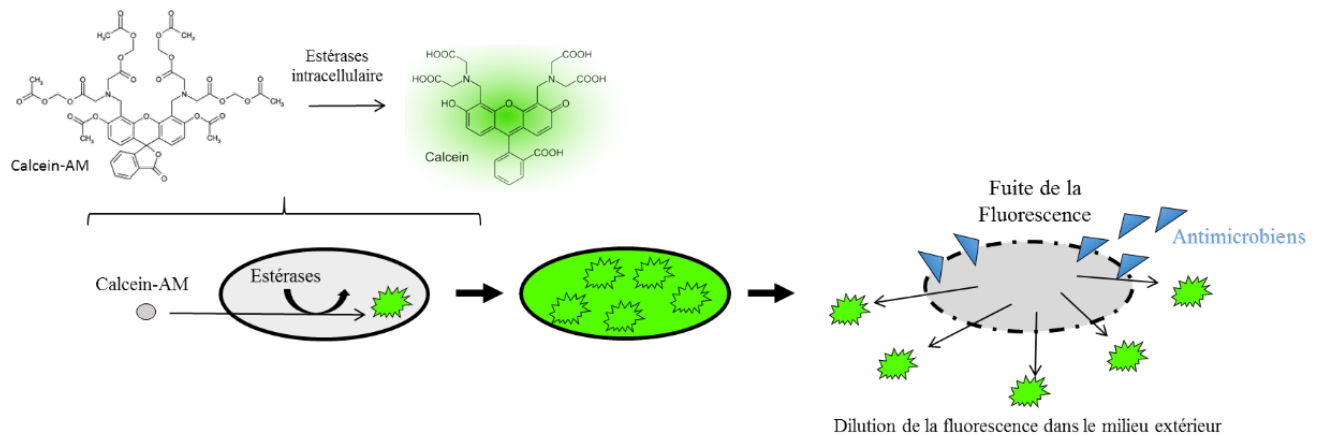


Figure 10 : Structure et mécanisme d'action de la calcéine-AM.

Davison *et al.* (2010) a également utilisé la calcéine-AM pour visualiser la perte de viabilité des bactéries au sein d'un biofilm de *Staphylococcus epidermidis* dans des capillaires à flux (technique « Flow cell ») après contact avec quatre antimicrobiens (l'acide hypochloreux, le glutaraldéhyde, le chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium et la nisine) (Figure 11) (Davison *et al.* 2010). D'après les résultats de l'étude, l'acide hypochloreux a seulement eu une action antimicrobienne localisée à la périphérie des amas cellulaires du biofilm, y compris à une concentration à 50mg/l et il a été le seul antimicrobien induisant le détachement du biofilm. Après contact avec le chlorure d'alkyldiméthyl benzylammonium, la perte de fluorescence a d'abord eu lieu en périphérie des amas puis le phénomène a migré à l'intérieur des amas. La nisine a provoqué une perte de fluorescence homogène et rapide. Concernant le glutaraldéhyde, les auteurs suggèrent que la méthode n'est pas appropriée pour ce type d'antimicrobien qui n'induit probablement pas la perméabilisation des membranes cellulaires, et donc la fuite de fluorescence. Cette méthode a permis de montrer que chaque antimicrobien induit une perte de fluorescence avec des comportements spatio-temporels distincts.

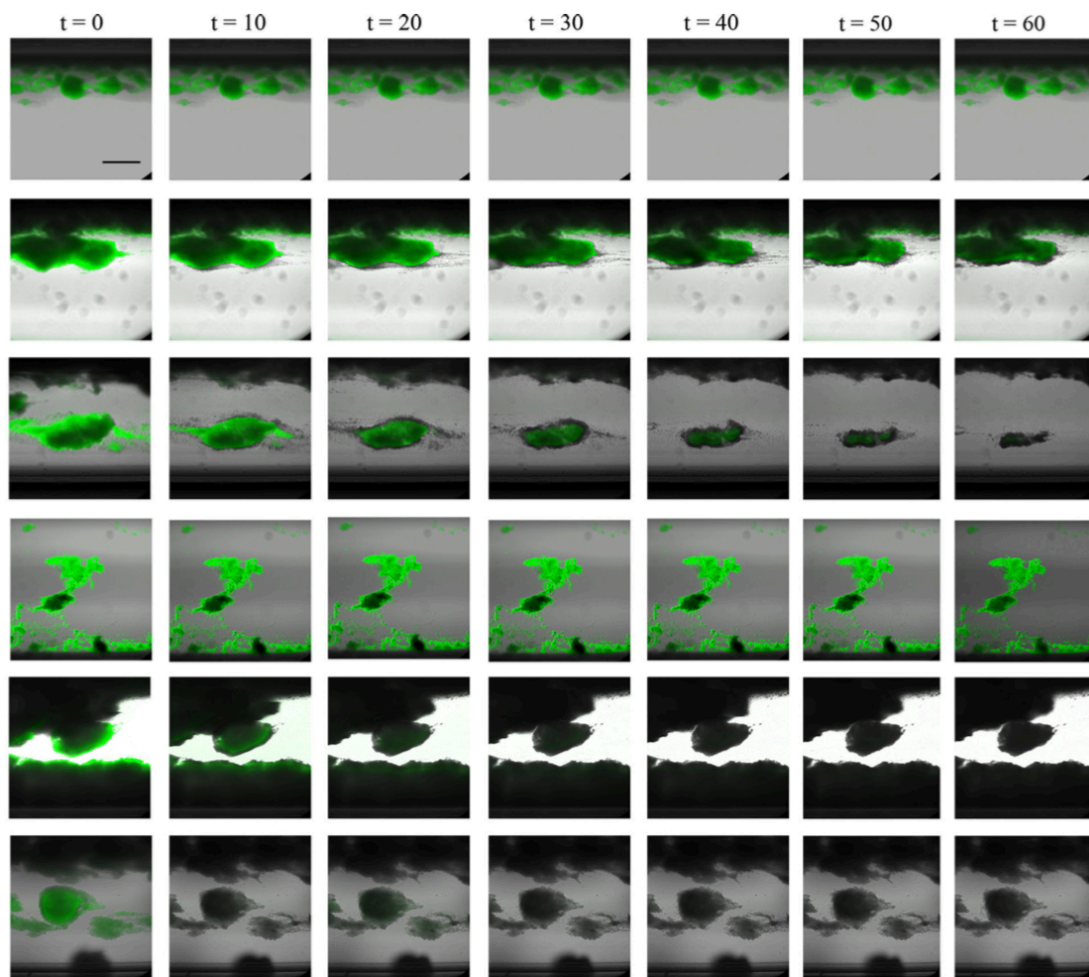


Figure 11 : Observation spatio-temporelle (en min) de la perte de fluorescence verte de la calcéine-AM par MCBL dans des biofilms de *Staphylococcus epidermidis* suite à l'exposition de quatre antimicrobiens. De haut en bas, témoin sans antimicrobien, biofilms avec 10mg/l d'acide hypochloreux, 50 mg/l d'acide hypochloreux, 50mg/l de glutaraldéhyde, 50mg/l de chlorure d'alkyldiméthyl benzylammonium ou 50 mg/l de nisine. Figure adaptée de l'étude de Davison *et al.* (2010).

De manière similaire, les dynamiques spatio-temporelles d'action de deux désinfectants sur des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* ont été suivies en utilisant un autre marqueur estérasiqque de viabilité, le Chemchrome V6. Les auteurs montrent que les deux agents antimicrobiens ne se comportent pas de façon similaire dans des biofilms ayant une structure de type « champignon ». En effet, l'acide peracétique y diffuse plus facilement que le composé d'ammonium quaternaire (Bridier *et al.* 2011). La MCBL couplée à l'utilisation du fluorochrome Chemchrome V6 a également été utilisée pour suivre l'inactivation de biofilms de *Salmonella enterica* par un hydrolat de *Thymbra capitata*, sous-produit de la distillation de l'huile essentielle correspondante.

Les auteurs ont montré que cet hydrolat était plus efficace que le chlorure de benzalkonium sur des biofilms structurés (Karampoula *et al.* 2016).

3 – Préviation de l'efficacité des systèmes de conservation et des durées de vie de produits cosmétiques

Les résultats de l'évaluation de la protection antimicrobienne d'une formule cosmétique par un Challenge-test sont obtenus après environ 1 mois. Ce délai important est une contrainte pour la formulation et la mise sur le marché de nouveaux produits cosmétiques. La microbiologie prévisionnelle permet de modéliser l'évolution de la population microbienne dans un système à partir de données préalablement acquises. Elle permet de prédire, grâce à des modèles mathématiques, la croissance, la survie ou l'inactivation des microorganismes en fonction de facteurs environnementaux tels que la température, le pH ou la concentration en antimicrobiens. Elle est très utilisée dans l'industrie alimentaire, notamment pour la détermination de la durée de vie des aliments, pour l'évaluation des systèmes de conservation ou encore pour l'analyse quantitative des risques (Membré and Lambert 2008; Valdramidis 2016). Cependant, elle n'est pas encore répandue en industrie cosmétique, qui se base actuellement sur les recommandations de l'ANSM et sur des études de stabilité et de vieillissement pour estimer la durée d'utilisation des produits.

3.1 – Méthode d'estimation de la durée d'utilisation utilisée dans l'industrie cosmétique

Les articles 6 et 19 du Règlement cosmétique 1223/2009 stipulent qu'une date limite d'utilisation doit obligatoirement être inscrite sur tout étiquetage de produit cosmétique, sauf exceptions dont les unidoses ou les aérosols. De nombreuses organisations telles que l'ANSM, l'association professionnelle européenne des industries cosmétiques (Cosmetics Europe), le Comité scientifique pour la sécurité du consommateur ou encore la Commission Européenne suggèrent des lignes directrices quant à l'estimation des dates limites d'utilisation des produits cosmétiques. En revanche, les méthodes de détermination de ces dates ne sont pas encadrées de façon réglementaire et restent à l'appréciation des industriels.

Dans le cas où la date d'utilisation du produit cosmétique n'excède pas 30 mois, la date de durabilité minimale (DDM) c'est-à-dire « la date jusqu'à laquelle le produit cosmétique continue de remplir sa fonction initiale et reste sans danger » doit être inscrite sur l'emballage. Elle est représentée soit par un symbole de sablier ou par la

mention « à utiliser avant fin » suivi de la date en année, en mois et/ou en jours. Aucun changement de nature physique, chimique et microbiologique ne doit donc avoir lieu dans la formule depuis sa fabrication jusqu'à la fin de la date limite (Pensé-Lhéritier and Masson 2016). Cette date est estimée grâce à des études de stabilité (**cf Chapitre I-I-3**). Si la date d'utilisation excède 30 mois, le produit est considéré comme stable jusqu'à son ouverture. Seule une Période Après Ouverture (PAO) est renseignée sur le produit, correspondant à « la durée pendant laquelle le produit est sûr après son ouverture et peut être utilisé sans dommage pour le consommateur ». Cette date est représentée par le symbole d'un pot de crème ouvert, sur lequel est écrit la durée d'utilisation en mois ou en année. Actuellement, la détermination de la PAO de produits cosmétiques conservés et utilisés normalement à température ambiante est basée sur les recommandations de l'ANSM. Elle peut cependant être validée par des tests de vieillissement accélérés et/ou en conditions réelles (**cf Chapitre I-I-3**).

Afin de prévoir le risque associé à une formule cosmétique, l'ANSM prend en compte 5 paramètres critiques (ANSM 2007; Pensé-Lhéritier and Masson 2016) :

- **Le choix de la formulation** : le choix du système conservateur est évalué en fonction de la sensibilité intrinsèque de la formulation grâce aux résultats des tests d'efficacité des conservateurs de la formule obtenus à l'issue des challenge-tests.
- **Le contact entre le produit et l'environnement extérieur après ouverture** : ceux-ci dépendent directement du type d'emballage choisi.
- **La durée prévisible d'utilisation** : le volume du pot, la dose et la fréquence d'utilisation permettent de prévoir la durée prévisible avant que le contenu ne soit terminé.
- **La zone d'application** : selon la zone d'application, le risque d'une contamination potentielle du produit est plus ou moins important. Il est par exemple plus élevé si le produit est destiné à l'application autour des yeux que s'il est appliqué au niveau des jambes.
- **La population ciblée** : la sensibilité de la population à laquelle le produit est destiné est prise en compte. Le risque est par exemple considéré comme plus important dans le cas de produits à destination de nourrissons.

Ainsi, selon le produit cosmétique, chacun de ces paramètres est associé à une cotation allant de 1 à 4, 1 étant le niveau de risque le plus faible. Le risque théorique (RT) global

du produit correspond à la multiplication de la valeur de cotation de chaque paramètre. Trois classes de produits en découlent soit :

- Si $RT \geq 1$ à 8 alors la PAO théorique (PAO_{Th}) ≤ 18 mois
- Si $RT 8 < RT \leq 48$ alors la $PAO_{Th} \leq 6$ mois
- Si $RT > 48$ alors la PAO_{Th} ne peut pas être déterminée et la conception du produit doit être revue.

3.2 – Prédiction de l'inactivation de la population microbienne dans le temps grâce à l'utilisation de modèles primaires

Les modèles primaires d'inactivation permettent de représenter l'évolution du nombre de microorganismes en fonction du temps lorsqu'ils sont soumis à un traitement à une intensité létale (température, pH, concentration d'un agent antimicrobien...) dans des conditions environnementales stables. La représentation la plus courante est la forme « log-linéaire » qui permet d'exprimer une réduction linéaire logarithmique du nombre de microorganismes en fonction du temps par la relation suivante :

$$N(t) = N_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

où $N(t)$ représente le nombre de bactéries survivantes au temps t , N_0 la population bactérienne initiale, k le taux d'inactivation et t le temps de traitement.

Sur une courbe de forme log-linéaire (forme I sur Figure 12) dans une condition donnée, il est possible de déterminer le temps de réduction décimale D qui correspond au temps nécessaire pour réduire la population microbienne d'un logarithme décimal. Cette relation est définie par :

$$N(t) = N_0 \cdot 10^{-\frac{t}{D}} \quad \text{ou} \quad \log_{10}(N(t)) = \log_{10}(N_0) - \frac{t}{D}$$

La valeur du temps de réduction décimale permet de caractériser la sensibilité d'une souche à un traitement : plus la valeur de D est faible, plus la souche est sensible au traitement. Les cinétiques d'inactivation peuvent se présenter sous différentes formes dont les plus couramment retrouvées sont illustrées par Geeraerd et *al.* (2005) dans la Figure 12.

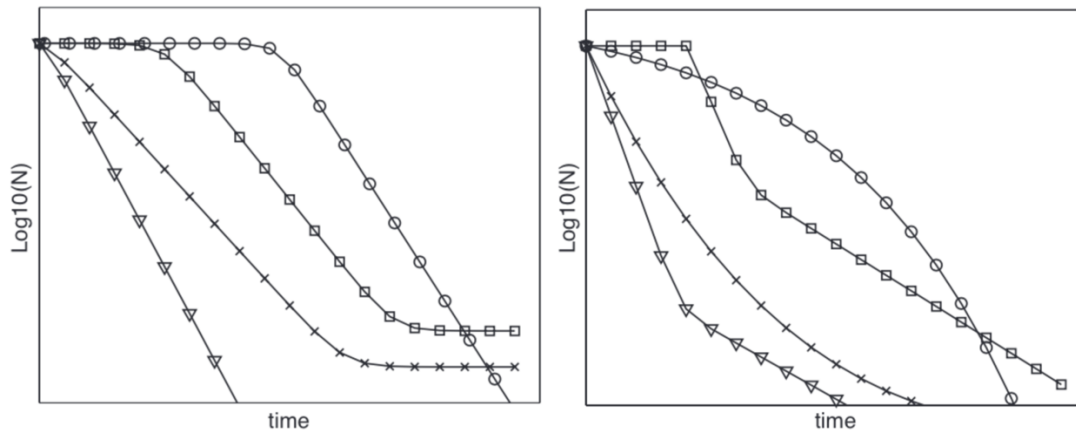


Figure 12 : Représentation des principales formes de cinétiques d'inactivation microbienne. A gauche : linéaire (∇ , forme I), linéaire avec traîne (\times , forme II), en forme de sigmoïde (\square , forme III), linéaire précédée d'un épaulement (\circ , forme IV). A droite: biphasique (∇ forme V), concave (\times , forme VI), biphasique précédée d'un épaulement (\square , forme VII) et convexe (\circ , forme VIII) (Geeraerd *et al.* 2005).

Les cinétiques d'inactivation peuvent comporter un « épaulement » avant la phase de déclin et/ou une « traîne » ou « queue » après la phase de déclin. Le phénomène d'épaulement (forme III, IV et VII sur Figure 12) peut être dû à différentes causes telles qu'un temps de latence avant le début de la phase de mortalité, une dénaturation d'amas protecteurs des microorganismes ou une modification du milieu environnant. Le phénomène de traîne correspondant à une diminution de l'efficacité d'inactivation sur les temps longs peut être associé à la présence d'une sous-population de microorganismes résistants ou à une adaptation des microorganismes au stress appliqué (Naïtali *et al.* 2017). Il existe plus de nombreux modèles permettant de modéliser ces différentes formes de cinétique d'inactivation (Naïtali *et al.* 2017). L'outil GlnaFIT (add-in excel) met à disposition 10 types de modèles d'inactivation primaire (version 1.6) regroupés en 4 classes. Il y a les modèles log linéaire, log-linéaire avec épaulement et/ou queue et les modèles biphasiques (forme I, II, V et VII sur Figure 12). Il y a également les modèles de type Weibull (forme I, VI et VIII sur Figure 12) qui modulent la forme de la courbe grâce à un paramètre p . Ce modèle est défini par la relation suivante :

$$\text{Log}_{10} (N(t)) = \text{log}_{10} (N_0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p$$

où δ est le temps nécessaire pour réduire d'un facteur de 10 le nombre de microorganismes. Si la valeur de p est inférieure, égale ou supérieure à 1, la courbe d'inactivation est respectivement concave, linéaire ou convexe (Mafart *et al.* 2002).

Cependant certains modèles primaires d'inactivation ne sont pas présents dans GInaFIT dont le modèle IQ appelé « the Intrinsic Quenching model ». Initialement, ce modèle a été développé pour mettre en évidence le rôle des microorganismes sur l'inhibition de l'action des désinfectants après un certain temps de contact (Lambert and Johnston 2000). Ce modèle a ensuite été utilisé pour mettre en évidence des phénomènes d'inhibition par d'autres substances présentes au contact des désinfectants dans l'environnement d'un modèle étudié (Lambert and Johnston 2001). La relation est décrite par l'équation suivante :

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) - \frac{(1 - e^{-Q.t})}{Q \cdot D_c}$$

où N_0 est la population bactérienne initiale, N est la population bactérienne présente dans l'échantillon prélevé à un temps donné, D_c est le temps de réduction décimale, t est le temps (min) et Q est le coefficient indicateur du niveau d'inhibition appelé aussi coefficient de « quenching ».

La sélection du modèle d'inactivation présentant le meilleur ajustement du modèle aux données expérimentales est généralement effectuée grâce à certaines mesures statistiques dont :

- **La somme résiduelle des erreurs au carré ou Residual Sum of Square errors (RSS)** : est la somme au carré des différences entre le modèle appliqué et les données expérimentales. Le modèle qui présente le meilleur ajustement aux données expérimentales est celui qui donne une valeur de RSS la plus petite (Kamgang *et al.* 2007).
- **Le coefficient de détermination (R^2)** : il est égal à $1 - \text{RSS}/\text{SSTO}$ (SSTO étant la somme au carré des différences entre les valeurs mesurées et la moyenne de ces valeurs). Le meilleur modèle est celui qui présente une valeur de R^2 la plus proche de 1 (Kamgang *et al.* 2007).
- **Le Critère d'Information Bayésien (CIB) ou Bayesian Information Criterion (BIC)** : est un critère de sélection prenant en compte le nombre de paramètres du modèle et est égal à :

$$BIC = p \cdot \ln\left(\frac{RSS}{p}\right) + k \cdot \ln(p)$$

où p est le nombre de points expérimentaux et k le nombre de paramètres du modèle. L'utilisation d'un nombre surélevé de paramètres pouvant aboutir à un

ajustement non approprié du modèle, entraîne une augmentation de la valeur de CIB. Donc, plus le CIB est faible plus l'ajustement du modèle est correct.

3.3 – Prédiction de l'activité d'un conservateur selon sa concentration grâce à des modèles secondaires d'inactivation

Les modèles secondaires d'inactivation permettent de représenter les effets des facteurs environnementaux tels que la concentration d'un agent antimicrobien, le pH ou la température sur les paramètres des modèles primaires d'inactivation tels que le temps de réduction décimale. Le modèle de Bigelow (1921) modélise par exemple l'influence de la température sur le temps de réduction décimale. Plus la température de traitement est élevée, plus la valeur du temps de réduction décimale est faible. Il est représenté par l'équation ci-dessous :

$$\log_{10}(D(T)) = \log_{10}(D_{ref}) - \frac{(T - T_{ref})}{Z_T}$$

où $D(T)$ est le temps de réduction décimale à la température T , D_{ref} est le temps de réduction décimale à la température de référence T_{ref} et Z_T est la variation de température induisant la variation du temps de réduction décimale $D(T)$ d'un facteur de 10 (Bigelow 1921).

Des facteurs autres que la température peuvent avoir un impact sur l'inactivation des microorganismes tels que le pH, l'activité de l'eau, les acides organiques ou l'action de composés chimiques (Coroller *et al.* 2015).

Certains modèles secondaires peuvent également intégrer un paramètre de forme, comme pour le modèle primaire. Ainsi, Mafart *et al.* (2010) proposent un modèle combiné prenant en compte la température et le pH, en introduisant un paramètre de forme du second degré pour le pH :

$$\log_{10}(D(T, pH)) = \log_{10}(D_{ref}) - \frac{(T - T_{ref})}{Z_T} - \left(\frac{(pH - pH_{ref})}{Z_{pH}} \right)^2$$

où le pH_{ref} est le pH de référence du milieu de traitement, Z_{pH} est la variation du pH du milieu de traitement entraînant la variation d'un facteur de 10 du temps de réduction décimale (D) obtenue à une température de traitement (T) (Naïtali *et al.* 2017; Mafart *et al.* 2010).

Dans le cas de la désinfection chimique, un modèle secondaire en représentation log-log a été décrit pour prévoir l'évolution du temps de réduction décimale en fonction de la concentration d'antimicrobien (modèle de Chick-Watson). Il s'exprime selon la relation suivante :

$$\log_{10} \frac{D_{C_1}}{D_{C_2}} = -a \cdot \log_{10} \frac{C_1}{C_2}$$

où C_1 et C_2 sont des concentration en agent antimicrobien, D_{C_1} et D_{C_2} les temps de réductions décimales correspondantes et $-a$ est le coefficient directeur de la pente $\log_{10} D_C = f(\log_{10} C)$ (Figure 13).

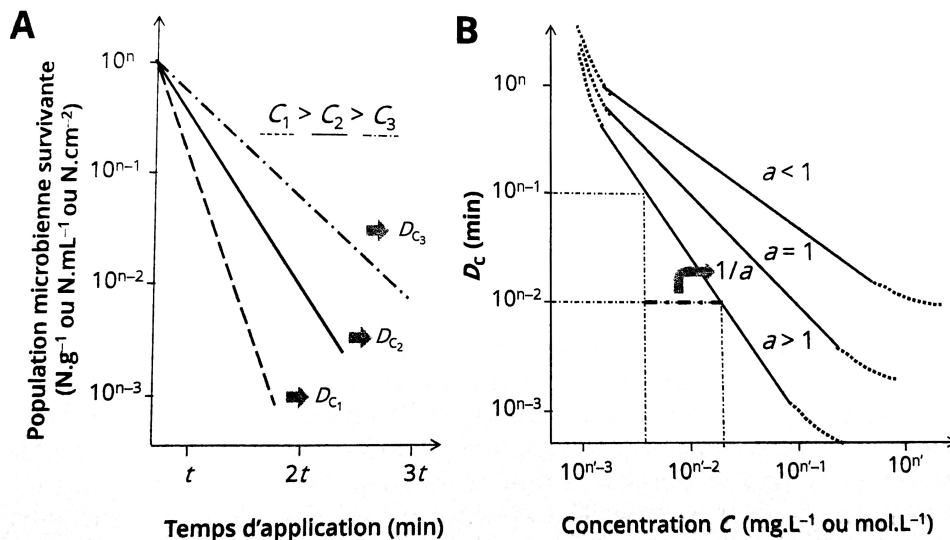


Figure 13 : Représentation du nombre de microorganismes survivants au cours du temps après la mise en contact de différentes concentrations de biocides (modèle primaire) (A) et relation en coordonnées logarithmiques, pour une même efficacité d'inactivation microbienne (ici $1 \log_{10}$), entre la concentration C et le temps d'action du biocide, en fonction du coefficient d'efficacité du biocide a (modèle secondaire) (B) (Naïtali et al. 2017).

IV - Interactions entre les constituants des matrices émulsionnées, les bactéries et les conservateurs : conséquence sur la conservation des produits.

Au sein des matrices cosmétiques, les bactéries sont au contact des molécules antimicrobiennes mais aussi d'une multitude d'autres constituants. Ainsi, de nombreuses interactions positives ou négatives entre eux peuvent exister. Les connaissances sur les interactions entre les constituants des matrices émulsionnées, les bactéries et les conservateurs sont encore insuffisantes, pourtant la compréhension de ces interactions pourrait permettre de i) mieux comprendre et prévenir les mécanismes d'altération des matrices par les microorganismes, ii) d'optimiser l'action

antimicrobienne des conservateurs et améliorer la conservation des produits ou encore
iii) d'optimiser le développement de cosmétiques probiotiques, dans lesquels des bactéries vivantes sont incorporées afin de palier certains problèmes de santé liés à la peau, tels que la dermatite atopique (maladie chronique inflammatoire de la peau) (Tkachenko *et al.* 2017).

1 – Influence des interactions physico-chimiques entre bactéries et constituants de matrices émulsionnées sur la répartition des bactéries contaminantes dans les produits.

Plusieurs études dans des systèmes émulsionnés mettent en évidence certains paramètres influençant les interactions bactéries/matrices. Les propriétés de surface des bactéries ont notamment une grande influence sur leur capacité d'interaction avec leur environnement. La composition et la structure des enveloppes bactériennes sont complexes et sont soumises à différents types d'interactions physico-chimiques (Ubbink and Schär-Zammaretti 2007). Celles-ci sont dépendantes de la distance entre une bactérie et la surface d'interaction. Elles sont de deux types : les interactions de longue distance, van der Waals et électrostatiques, et les interactions de courtes distance, de type acide/base de Lewis et d'hydrophobicité (Oss 2003).

Les interactions de van der Waals sont de faible intensité. Elles interviennent à partir d'une distance de 50 nm entre une bactérie et une surface et diminuent avec l'augmentation de la distance. Elles sont dues à la fluctuation des nuages électroniques qui gravitent autour du noyau d'un atome, le rendant momentanément dipolaire.

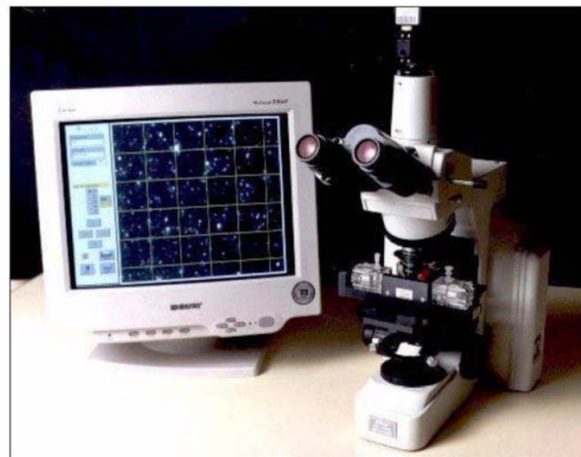
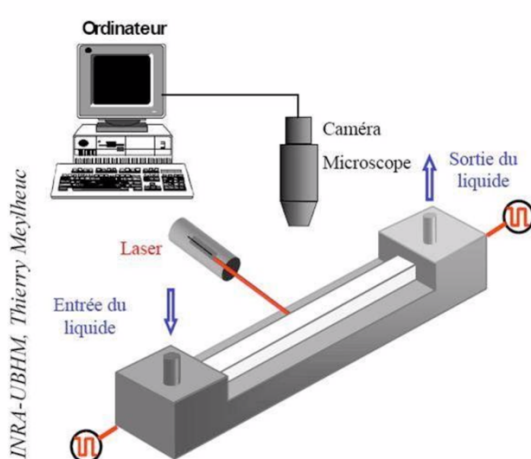
Les interactions de nature électrostatique interviennent à partir de 20 nm de distance entre une bactérie et une surface (Neu 1996). Ces forces électrostatiques sont décrites par la loi de Coulomb de 1785 : deux objets A et B avec des charges électrique de signe contraire s'attirent et deux objets A et B de même charge se repoussent. Une des techniques pour mesurer la charge électrique présente à la surface d'une bactérie est la mesure de la mobilité électrophorétique. Sous l'action d'un champ électrique, les microorganismes placés dans une chambre de mesure migrent vers la charge opposée à une vitesse qui dépend de leur charge de surface. La vitesse de déplacement est mesurée à différents pH, à l'aide d'une caméra reliée à un microscope (Figure 14).

La mobilité électrophorétique est définie par la relation suivante :

$$ME = \frac{V}{E}$$

où ME est la mobilité électrophorétique, V , la vitesse de déplacement des microorganismes (m/s) et E , le champ électrique (V/m). Plus les bactéries seront chargées, plus elles se déplaceront rapidement vers l'électrode et plus leur mobilité électrophorétique sera élevée (Burgain *et al.* 2014).

La charge électrique à la surface bactérienne est directement liée à la composition de la structure membranaire des bactéries. Les charges négatives sont portées par les groupements phosphates des phospholipides et les charges positives par les groupements amines du peptidoglycane (Boonaert and Rouxhet 2000). La charge à la surface des bactéries dépend donc de la valeur de pH du milieu (Burgain *et al.* 2014).



CAD Instrumentation, France

Figure 14 : Dispositif pour mesurer la mobilité électrophorétique ou le potentiel zêta (Guillaume 2010).

Dans des matrices émulsionnées, la charge de surface des bactéries peut porter atteinte à la stabilité des émulsions, notamment en provoquant la coalescence et la floculation des gouttelettes lipidiques. Une étude de Li *et al.* (2001) met en évidence les interactions existantes entre *E. coli* et les gouttelettes d'une émulsion (hexadécane/eau). Ces auteurs montrent que lorsque les bactéries et les gouttelettes ont des charges de surface de signe opposé, les bactéries sont attirées à la surface des gouttelettes et déstabilisent l'émulsion, notamment par la formation de « ponts » (Figure 15) (Li *et al.* 2001).

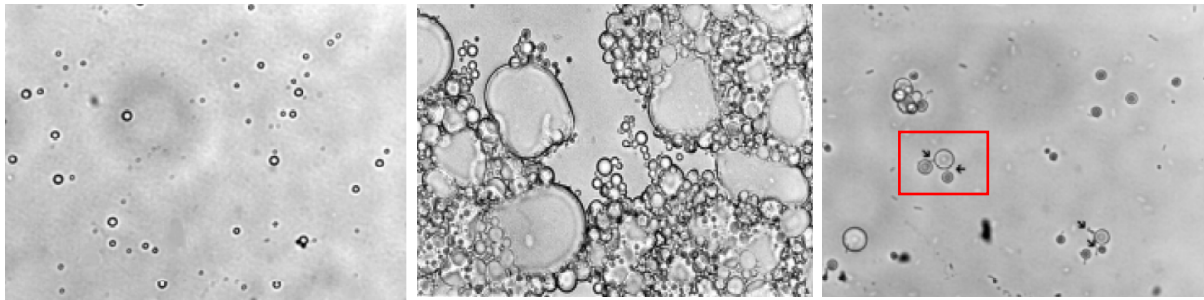


Figure 15 : Interaction entre *E. coli* JM109 chargé négativement et les gouttelettes d'une émulsion hexadécane/eau stabilisée avec un émulsifiant chargé positivement. Observation de l'émulsion sans bactérie (à gauche, x400), avec bactéries observées au x400 (au centre) et avec bactéries observées au x 1000 (à droite) au microscope optique (Li et al. 2001).

Ly et al. (2006) confirment ces observations, en étudiant par microscopie de fluorescence, l'impact de la charge de surface de différentes souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biov. diacetylactis (LLD) sur la stabilité d'émulsions formulées avec un émulsifiant de nature ionique variable (Ly, Naitali-Bouchez, et al. 2006). Celui-ci est soit chargé positivement (Bromure d'hexadécyl triméthyl ammonium ou CTAB) soit chargé négativement (Tween 20). Plus la différence de charge entre les bactéries et les gouttelettes est importante, plus l'interaction est forte et plus cela conduit à la formation d'amas de bactéries autour des gouttelettes (Figure 16).

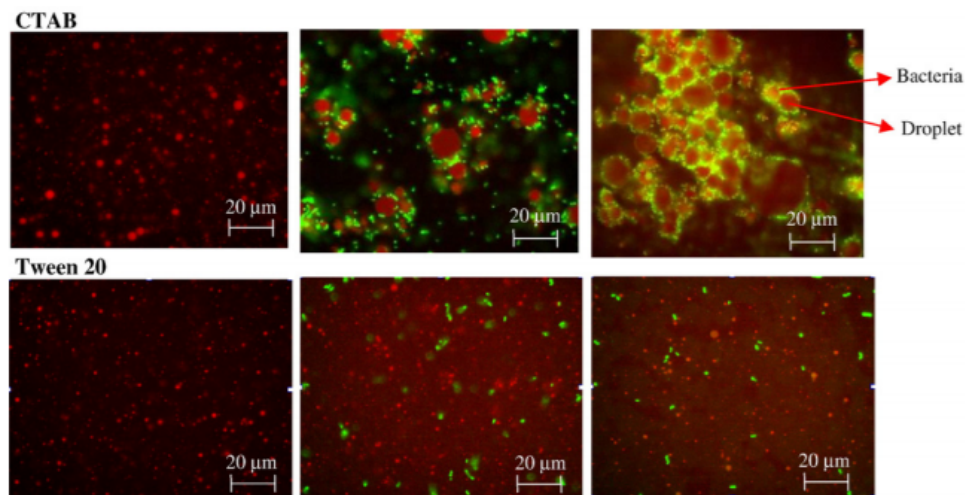


Figure 16 : Observation microscopique d'émulsions (marquées au rouge de Nil, en rouge) contenant du CTAB ou du Tween 20 mis au contact de bactéries LLD18 (charge à -18 mV, au centre) ou LLD16 (charge à -43mV, à droite) toutes les deux marquées au Dapi (en vert). Émulsion sans bactérie à gauche (Ly, Naitali-Bouchez, et al. 2006).

Ly, Aguedo et al. (2008) observent les mêmes résultats dans des émulsions alimentaires stabilisées avec des protéines de lactosérum (Ly et al. 2008).

Les interactions dites de courtes distances se mettent en place à partir d'une certaine proximité entre une bactérie et une surface (inférieure à 3 nm) et sont irréversibles. A ce niveau, il existe des interactions acide/base de Lewis et des interactions hydrophobes. Les interactions acide/base de Lewis sont de forte intensité et mettent en jeu un couple accepteur/donneur d'électrons permettant la formation de liaisons hydrogène. On parle d'interactions hydrophobes pour certaines molécules ou groupements non polaires ayant très peu d'affinité pour un solvant hydrophile. Incapables de réaliser des liaisons avec l'eau, les groupements se positionnent alors de façon à présenter la plus faible surface de contact avec l'eau (Neu 1996). Il est possible de mesurer le niveau d'hydrophobicité de la surface bactérienne par la méthode de BATH ou Bacterial Adherence To Hydrocarbons (Rosenberg *et al.* 1980; Rosenberg 1984). Cette méthode consiste à mettre les bactéries en contact avec des hydrocarbures (hexadécane, octane et xylène), et à comparer la mesure de l'absorbance dans la phase aqueuse avant et après mélange. Selon l'hydrophobicité des bactéries, elles vont alors soit migrer dans la phase hydrophobe contenant les hydrocarbures soit rester dans la phase aqueuse hydrophile. Une autre méthode appelée MATS ou Microbial Adhesion To Solvents basée sur un principe similaire (Bellon-Fontaine *et al.* 1996) permet non seulement de mesurer la surface d'hydrophobicité mais aussi le caractère acide/base de la surface bactérienne en mettant en contact les bactéries avec deux couples de solvants comprenant chacun un solvant apolaire (hydrophobe) et un solvant monopolaire (hydrophile, acide ou basique) ayant des propriétés van der Waals similaires (Figure 17). Ces couples de solvants sont i) le chloroforme, solvant accepteur d'électron au sens de Lewis (acide) et l'hexadécane, solvant apolaire et ii) l'acétate d'éthyle, solvant donneur d'électrons au sens de Lewis (basique) et le décane, solvant apolaire. Le pourcentage d'affinité des bactéries pour chaque solvant est donné par la relation suivante :

$$\text{Affinité (\%)} = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$$

où A_0 est la densité optique témoin avant mélange avec le solvant et A_1 est la densité optique après mélange avec le solvant. Un pourcentage d'affinité à l'hexadécane et au décane élevé met en évidence un niveau d'hydrophobicité élevé à la surface des bactéries et inversement. De plus, si après la soustraction de la valeur de l'affinité des bactéries pour l'acétate d'éthyle à celle du décane, la valeur est élevée alors la surface des bactéries présente un caractère acide. De la même façon, si après la soustraction

de la valeur de l'affinité des bactéries pour le chloroforme à celle de l'hexadécane, la valeur est élevée alors la surface bactérienne présente un caractère basique.

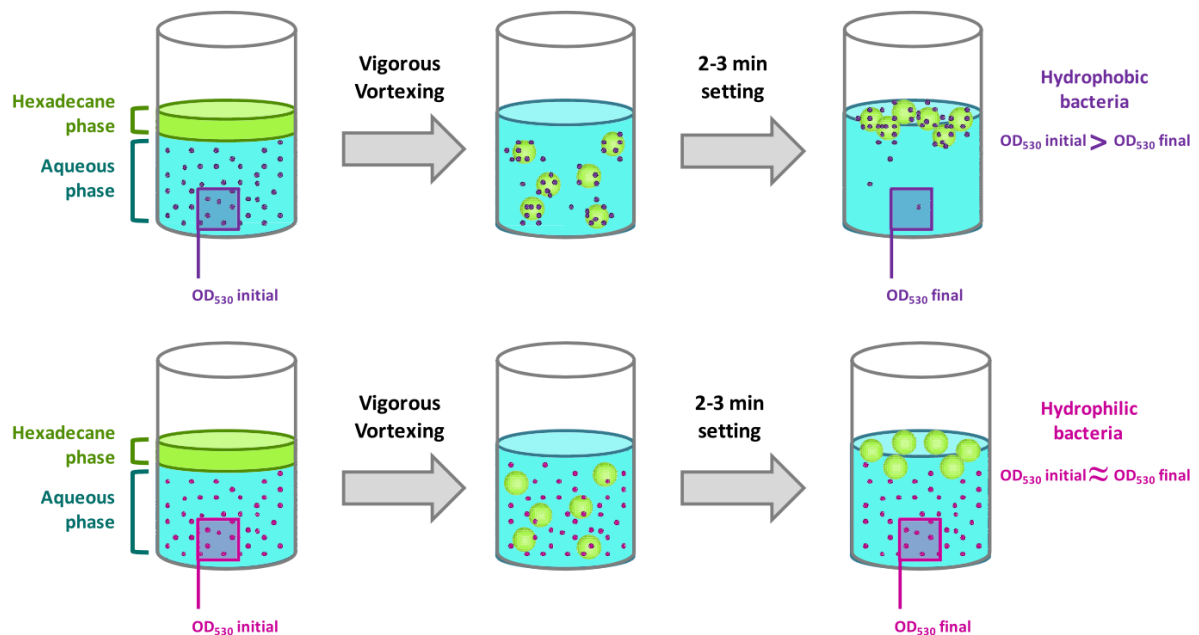


Figure 17 : Principe de la méthode de MATS en prenant l'exemple de la mise en contact de l'hexadecane avec des bactéries hydrophiles et hydrophobes (Burgain *et al.* 2014).

Dès 1924, des chercheurs s'intéressent aux interactions hydrophobes et à la répartition des bactéries aux interfaces huile-eau (Mudd and Mudd 1924). Dans les années 2000, plusieurs études montrent que certaines bactéries peuvent interagir avec les globules gras des matrices laitières, notamment en se positionnant préférentiellement autour de ces globules et en s'y développant (Lopez *et al.* 2006; Li *et al.* 2001; Brisson *et al.* 2010). Ly *et al.* (2006) mettent plus spécifiquement en évidence l'implication des propriétés d'hydrophobicité de surface des bactéries lactiques dans leurs interactions physicochimiques avec les constituants des matrices alimentaires. Ils montrent notamment qu'une souche ayant une plus grande hydrophobicité de surface (LLD18) s'adsorbe davantage sur les lipides et les composés hydrophobes qu'une souche hydrophile (LLD16) (Ly, Vo, *et al.* 2006) (Figure 18).

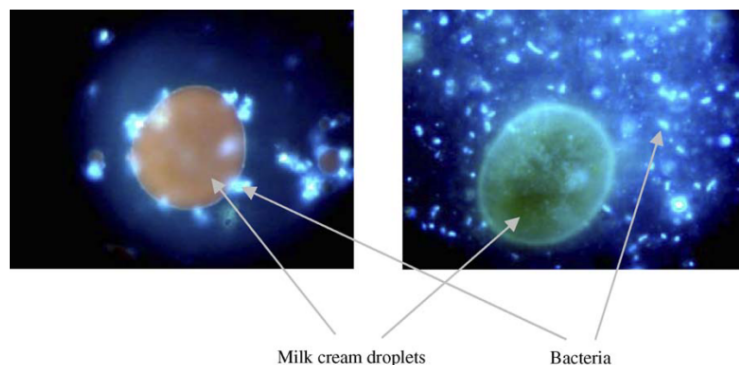


Figure 18 : Observation microscopique de l'adhésion de deux bactéries lactiques ayant des propriétés d'hydrophobicité différentes sur une gouttelette. A gauche, LLD18 avec 30% d'affinité à l'hexadécane et à droite, LLD16 avec 3% d'adhésion à l'hexadécane (Ly, Vo, et al. 2006).

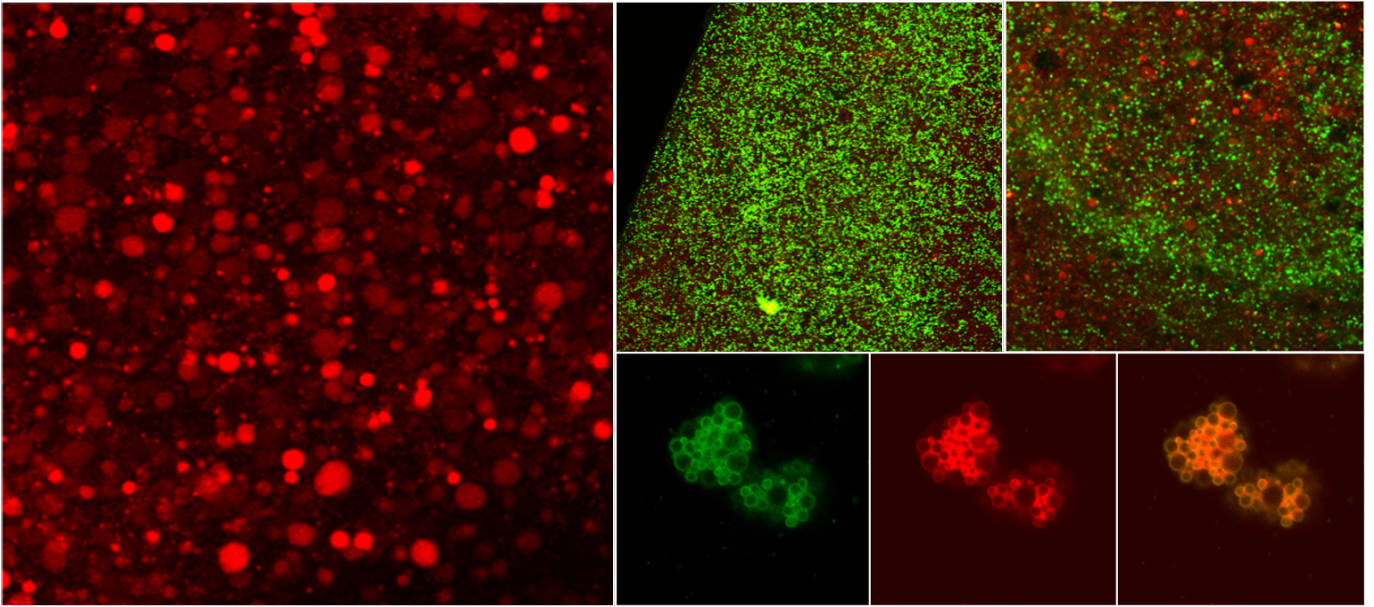
2 – Influence de la composition et de la structure de matrices émulsionnées sur l'efficacité antimicrobienne des conservateurs.

Les matrices cosmétiques émulsionnées sont souvent composées d'une multitude d'ingrédients pouvant interagir avec les agents antimicrobiens. La polarité, la charge de l'antimicrobien et les conditions environnementales, telles que la température, la force ionique et le pH, peuvent jouer un rôle majeur sur l'efficacité d'un antimicrobien (Weiss *et al.* 2015). En effet, le pH de la phase aqueuse de l'émulsion dépend du mélange des différents constituants de la matrice et le milieu est généralement tamponné. Les acides organiques sont majoritairement actifs sous leur forme non dissociée à des pH inférieurs à leur pKa, la plupart du temps à un pH < 5 (Lambert and Stratford 1999; Weiss *et al.* 2015; Scholtyssek 2005). Dans une matrice complexe telle qu'une matrice alimentaire, il existe également des interactions électrostatiques et hydrophobes entre les antimicrobiens, et les constituants tels que des lipides, protéines et polysaccharides chargés (Weiss *et al.* 2015). Une étude montre par exemple que l'addition de protéines (Albumine de Sérum Bovin) dans un milieu de culture gélosé inhibe l'action antimicrobienne du thymol contre *Salmonella* Typhimurium (Juven *et al.* 1994). Certains agents gélifiants tel que l'hydroxypropyl méthylcellulose, peuvent être associés à la perte d'efficacité de certains conservateurs (Scholtyssek 2005). En effet, les agents antimicrobiens vont se placer préférentiellement à certains endroits dans une émulsion h/e en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Selon leur niveau d'hydrophobicité, ils se placent à l'interface des gouttelettes lipidiques, dans la phase aqueuse ou dans la phase lipidique. Les microorganismes se développant essentiellement dans la phase aqueuse, la localisation des conservateurs joue un rôle

déterminant dans l'activité antimicrobienne des émulsions (Terjung *et al.* 2012). Pernin *et al.* (2019) ont étudié l'activité antimicrobienne de deux composés phénoliques naturels, l'acide férulique et l'eugénol, vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* dans une émulsion modèle alimentaire h/e. Ces auteurs ont montré que l'eugénol, ayant un logP élevé perd son efficacité antibactérienne dans les systèmes émulsionnés alors qu'il est efficace dans la phase aqueuse seule. Ils suggèrent alors que l'agent antimicrobien, pourtant introduit dans la phase aqueuse, se répartirait préférentiellement dans les gouttelettes lipidiques quand l'émulsion est constituée et qu'il ne serait alors plus présent en concentration suffisante dans la phase aqueuse pour inhiber la bactérie (Pernin, Bosc, *et al.* 2019). Les émulsifiants peuvent aussi participer à la diminution de l'activité antimicrobienne en séquestrant par exemple les molécules antimicrobiennes dans des micelles (Shimamoto and Mima 1979; Pernin, Bosc, *et al.* 2019; Kirk–Othmer 2013).

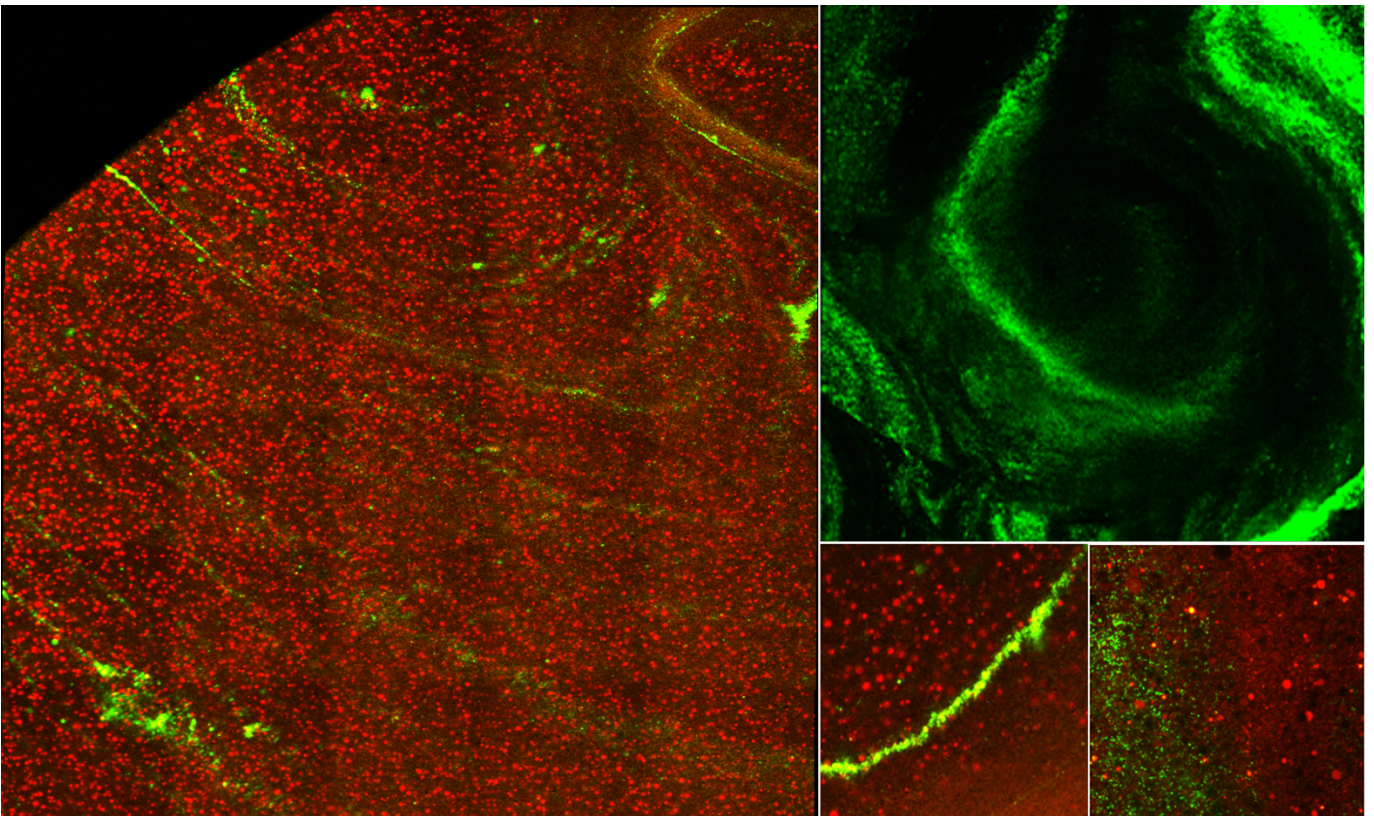
Au contraire, dans d'autres cas, les émulsifiants peuvent augmenter l'efficacité antimicrobienne des conservateurs en perturbant les membranes bactériennes, et facilitant ainsi la pénétration des conservateurs à l'intérieur des bactéries (Halla *et al.* 2018). Les agents chélateurs, tels que l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) ou le GLDA (diacétate de glutamate de tétrasodium) ont la capacité d'augmenter la perméabilité membranaire des bactéries, les rendant plus sensibles aux agents antimicrobiens (Siegert 2014). L'éthylhexylglycérine, généralement utilisé pour ses propriétés tensioactives, émoullientes, humectantes et solubilisantes, peut également, à une certaine concentration, favoriser l'activité antimicrobienne de conservateurs tels que le caprylyl glycol, le phénoxyéthanol et le 1,2-pentanediol (Langsrud *et al.* 2016; Herman 2019). En effet, en raison de sa structure semblable aux tensio-actifs, l'éthylhexylglycérine est capable de déstabiliser la membrane des microorganismes, permettant ainsi au conservateur de pénétrer plus efficacement (Herman 2019).

L'efficacité des agents antimicrobiens dans une matrice émulsionnée peut également dépendre de la structure même de l'émulsion. Des études mettent en évidence l'importance de la taille des gouttelettes de l'émulsion sur l'efficacité des antimicrobiens. Fang *et al.* (2016) ont testé l'efficacité de plusieurs conservateurs utilisés en cosmétique dans des matrices émulsionnées composées de gouttelettes de différentes tailles allant de 100 à 900 nm (Fang *et al.* 2016). Il apparaît que plus la taille des gouttelettes est grande, plus l'activité antimicrobienne est forte (Terjung *et al.* 2012; Fang *et al.* 2016).



CHAPITRE II :

Étude de la distribution spatiale des bactéries dans les formules cosmétiques



I - Introduction

La plupart des produits cosmétiques sont sensibles à la contamination microbienne. Le challenge-test est un test référencé dans la norme NF EN ISO11930, permettant d'évaluer l'efficacité de conservation des formules cosmétiques. Il consiste à inoculer artificiellement des microorganismes dans les formules cosmétiques et à suivre l'évolution de la population microbienne à des intervalles de temps donnés. L'évaluation de la conservation de ces produits peut s'avérer difficile lorsque la composition et la structure des formules cosmétiques sont complexes. Dans cette première partie de thèse, nous nous interrogeons sur la fiabilité de la méthode de challenge-test dans le cas où les bactéries inoculées ne se répartiraient pas de façon homogène dans le produit cosmétique. En effet, si la distribution des bactéries est hétérogène, selon l'endroit du prélèvement on risque soit de ne pas détecter un pathogène soit de devoir augmenter inutilement la concentration des conservateurs dans le produit fini. Jongenburger, Reij, *et al.* (2012) ont par exemple montré que différents paramètres tels que la concentration de l'inoculum et la distribution des bactéries peuvent affecter la quantification des micro-organismes.

Différentes interactions entre les bactéries inoculées et la formule peuvent exister dont certaines sont décrites dans la littérature. Elles peuvent être de type van der Waals, électrostatiques, de type acide/base de Lewis ou d'hydrophobicité. Elles mettent en jeu à la fois les propriétés de surface des bactéries, qui sont directement liées à la composition et la structure des enveloppes bactériennes, mais aussi celles des composantes de la formule telles que les gouttelettes lipidiques dans une émulsion (Ubbink and Schär-Zammaretti 2007; Boonaert and Rouxhet 2000). En effet, selon la composition et les paramètres physicochimiques de l'émulsion (choix du tensio-actif, présence de cations, pH), les bactéries pourront se placer préférentiellement à certains endroits dans l'émulsion. Par exemple, certaines bactéries ayant une surface très hydrophobe vont se regrouper à l'interface des gouttelettes lipidiques (Brisson *et al.* 2010; Lopez *et al.* 2006; Ly, Vo, *et al.* 2006). Ainsi de nombreux paramètres liés à la formule ou aux bactéries pourraient avoir un impact sur la distribution spatiale des bactéries dans les formules cosmétiques.

Au cours de ce chapitre, nous avons cherché à identifier puis à caractériser les déterminants de la distribution spatiale des bactéries dans les matrices cosmétiques grâce à la mise en place d'une méthodologie rapide.

II - Identification des facteurs limitant la répartition homogène des bactéries dans les matrices cosmétiques

1 - Introduction

Afin d'identifier les déterminants d'une mauvaise répartition spatiale des bactéries dans les matrices cosmétiques, nous avons tout d'abord analysé les formules commerciales des laboratoires CLARINS pour les classer en fonction du niveau de distribution spatiale de *S. aureus*. Quinze formules cosmétiques représentatives des principales formes galéniques ont été sélectionnées. Grâce à l'analyse de la composition de la formule induisant une mauvaise répartition bactérienne, nous avons pu faire des hypothèses sur la ou les matières premières pouvant être impliquées dans ce phénomène. Nous avons alors formulé des matrices cosmétiques modèles avec plusieurs concentrations de différentes matières premières pouvant être à l'origine de la distribution hétérogène des bactéries et analysé la qualité de la distribution spatiale en fonction de leur composition.

2 - Matériels et méthodes

2.1 - Souche bactérienne et méthode de culture

La souche bactérienne utilisée est *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 (lot 17310). Cette bactérie à coloration de Gram positive est cultivée en milieu TSA ou TSB (Tryptone Soja Agar/Bouillon) à 30°C. Les souches sont conservées à -80°C dans du TSB contenant du glycérol à 20 %.

2.1.1 Obtention de précultures en milieux gélosés ou liquides

Les précultures ont été effectuées soit sur milieux gélosés soit en milieux liquides. Pour les cultures en milieux gélosés, les bactéries sontensemencées une première fois en stries sur une boîte de TSA à partir d'un cryotube stocké à -80°C (R1). Après incubation à 30°C pendant 24h, un deuxième repiquage est ensuite effectué sur une boîte TSA puis incubé 24h à 30°C (R2). La boîte R1 peut être réutilisée et conservée 7 jours à 4°C. La préparation de la suspension de travail consiste à transférer à l'aide d'un écouvillon, quelques colonies bactériennes issues de la boîte R2, dans 1 ml d'eau physiologique. La suspension est homogénéisée à l'aide d'un vortex. Ce protocole a été utilisé dans le cadre de l'étude de la distribution spatiale des bactéries dans les produits cosmétiques commercialisés car il correspond aux habitudes de repiquage des Laboratoires Clarins.

Pour toutes les autres expérimentations, les cultures ont été faites à partir de milieux liquides afin d'obtenir des cultures plus homogènes d'un point de vue physiologique. Le premier repiquage (R1) a alors consisté à transférer 1 ml d'un cryotube de stockage à -80°C dans 10 ml de TSB puis à incuber la culture à 30°C. Après 7h de croissance 100µl du R1 ont été ajoutés à 100 ml de TSB et incubés une nuit à 30°C (R2).

2.1.2 - Préparation des suspensions de travail

La concentration de la suspension est estimée par turbidimétrie, en mesurant la transmittance (T) à 620 nm par spectrophotométrie. Elle est mesurée en pourcentage et est liée à l'absorbance (A) : $A = -\log(T)$. Dans le cas d'une culture sur boîte, la concentration bactérienne peut être ajustée par ajout d'eau physiologique ou de colonies bactériennes. Dans le cas d'une culture liquide, elle est ajustée en ajoutant de l'eau physiologique au culot bactérien obtenu après une centrifugation à 1575 x g de 10 min à 20°C puis de deux lavages successifs par centrifugation dans les mêmes conditions. La suspension bactérienne est ajustée à 1×10^{10} - 1×10^{11} UFC/ml dans de l'eau physiologique afin de pouvoir observer 10 à 100 bactéries par champ ($290.62 \times 290.62 \times 1.6 \mu\text{m}^3$) au MCBL. Pour obtenir cette concentration cible, la transmittance doit être comprise entre 84 et 86,5% après dilution de la suspension bactérienne au millièème.

2.2 - Matrices cosmétiques

2.2.1 - Produits commerciaux testés

Quinze formules cosmétiques commerciales de différentes compositions et structures, ont été sélectionnées de façon à ce qu'elles soient représentatives des principales formes galéniques, soit 8 crèmes, 3 gels, 2 laits et 2 lotions. Une base de données a été créée répertoriant les principales informations concernant la composition de chaque matrice testée (Tableau 6). Pour chaque produit cosmétique, les essais ont été répétés sur deux lots de fabrication différents.

Tableau 6: Principales caractéristiques des produits cosmétiques commerciaux testés.

| | Numéros | % Phase aqueuse | % Phase grasse | Géifiants et/ou épaississants | Emulsionnants | pH (à 20°C) | Viscosité (cP) ou Pénétrométrie (mm) (à 20°C) |
|---------|---------|-----------------|----------------|---|--|-------------|---|
| CREMES | 1 | 79.54 | 17.46 | 3% glyceryl acrylate/acrylic acid copolymer 1% polyacrylamide 0.2% alcool stéarlique | 3% cetearyl glucoside et cetearyl alcohol 2% monostearate de glycerol 0.2% alcool stéarlique | 4.6-5.6 | 28-36 mm |
| | 2 | 78.98 | 20.82 | 0.3% carbomer | 4.5% cetearyl glucoside et cetearyl alcohol 2% monostearate de glycerol 0.5% steareth-21 | 5-5.6 | 33-39 mm |
| | 3 | 91.58 | 8.42 | 0.5% polyacrylamide aqua c13-14 isoparaffin laureth-7 0.8% ammonium acryloyldimethyltaurate/vp copolymer 2.5% oryza sativa starch | Non | 5.4-6.3 | 20 000 - 30 000 cP |
| | 4 | 65.56 | 33.74 | 0.7% lithium magnesium sodium silicate 0.1% carbomer | 4% stearic acid | 6.8-7.4 | 26-35 mm |
| | 5 | 83.2 | 15.5 | 3% lubrajel msfree-hydrojel 1 % sepigel 305 0.25 % carbomer | 4% stearic acid 1% cetareth-12 | 5-6 | 32-38 mm |
| | 6 | 77.85 | 22.05 | 1.5 % alcool stéarlique | 3% monomyristate de glycerol 1.5% alcool stéarlique 2.25% potassium cetyl phosphate 2% cetearyl glucoside et cetearyl alcohol | 4.7-5.7 | 33-39 mm |
| | 7 | 68.74 | 30.26 | 0.35% acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer 0.2% gomme xanthane | 2.5% cetearyl glucoside et cetearyl alcohol 1% potassium cetyl phosphate | 4.9-5.9 | 34-40 mm |
| | 8 | 62.90 | 37.1 | 1.6% hydroxyethyl acrylate/sodium acryloyldimethyl taurate copolymer | 3.5% cetearyl glucoside et cetearyl alcohol 2.5% monostearate de glycerol ae | 5.8-6.3 | 20-25 mm |
| LAITS | 1 | 76.8 | 22.2 | 1% carbomer 1.5% silicone dc rm 2051 | 2% monostearate de glycerol 2% montanov I | 6.0-7.0 | 12 000-19 000 cP |
| | 2 | 73.45 | 26.55 | Non | 1.5% polysorbate 60 0.5% cetearyl glucoside et cetearyl alcohol 0.4% acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer | 5-6 | 5 300-7 000 cP |
| LOTIONS | 1 | 100 | 0 | 0.5% sodium chloride | 2.5% polysorbate 20 | 5-6 | / |
| | 2 | 100 | 0 | 0.75% sodium chloride | Non | 5.5-6.2 | / |
| GELS | 1 | 100 | 0 | 0.55% carbomer | Non | 5.5-6.5 | 14 000-16 000 cP |
| | 2 | 100 | 0 | 0.55% carbomer 3% aqua PEG-8 butylene glycol PEG-32 phenoxyethanol carbomer | Non | 5.5-6.5 | 14 000 - 16 000 |
| | 3 | 100 | 0 | 1% sodium polyacrylate starch 0.5% ammonium acryloyldimethyltaurate/vp copolymer | 0.5% ammonium acryloyldimethyltaurate/vp copolymer | 6-6.2 | 30 000-38 000 cP |

2.2.2 Matrice modèle

2.2.2.1 - Composition

Une base modèle 35/65 h/e % composée du minimum de matières premières essentielles à la fabrication d'une crème cosmétique a été formulée. Cette matrice est essentiellement composée d'une phase aqueuse, d'une phase lipidique, et d'émulsionnants pour former l'émulsion huile dans eau (h/e) mais aussi d'un gélifiant et de glycérine pour mimer la texture d'une crème. Sa composition ainsi que les propriétés de chaque ingrédient sont détaillées dans le Tableau 7. Au cours des expériences, deux matières premières présentes dans la crème commerciale 8 et susceptibles d'être liées au problème de distribution des bactéries ont été ajoutés dans la base modèle. Ce sont le monostéarate de glycérol et l'hydroxyéthylacrylate/sodium acryldiméthyltaurate copolymère, appelé copolymère polyacrylate par la suite. Le monostéarate de glycérol est un co-émulsionnant aidant à la stabilisation de l'émulsion et a été ajouté dans la base modèle à 2,5%. Le copolymère polyacrylate est pré-neutralisé et d'origine synthétique. Il possède de nombreuses fonctions, dont celles d'épaississant, de stabilisant, de texturant et d'émulsionnant. Il a été ajouté dans la base modèle à des concentrations variables 0,1 - 0,5 - 1,6%.

Tableau 7 : Composition de la matrice modèle 35/65 h/e%.

| Noms matières premières | INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) | Fournisseurs | % Matières premières | Propriétés |
|--|---|--------------------------------|----------------------|--|
| Eau déminéralisée | Aqua | Laboratoire en interne | Ajustée | Diluant / hydratation |
| Carbopol ultrez 10 | Carbomer | Gattefossé (Lyon, France) | 0.25 | Gélifiant |
| Sepinov EMT 10 = copolymère polyacrylate | Hydroxyethyl acrylate/sodium acryloyldimethyl taurate | SEPPIC (Puteaux, France) | 0 - 0.5 - 0.1 - 1.6 | Épaississant |
| Glycérine | Glycerin | Oleon (Ertvelde, Belgium) | 9 | Émollient/humectant/ filmogène/hydratant |
| Cétéaryle isononanoate | Cetearyl isononanoate | BASF France (Lyon, France) | 28.8 - 31,3 | Émollient/ filmogène |
| Cétéaryl glucoside | Cetearyl glucoside | SEPPIC Puteaux, France) | 3.5 | Émulsionnant et épaississant |
| Acétate de tocophérol | Tocopheryl acetate | DSM (Heerlen, the Netherlands) | 0.2 | Anti-oxydant |
| Monostéarate de glycérol | Glyceryl stearate | SEPPIC (Puteaux, France) | 0 - 2.5 | Co-émulsionnant |
| Eau déminéralisée | Aqua | Laboratoire en interne | 2 | Diluant / hydratation |
| Trométhamine | Tromethamine | Azelis (Heusden, Belgium) | 0.15 | Base |

2.2.2.2 - Formulation

La phase aqueuse de l'émulsion est d'abord préparée en saupoudrant le carbomer à la surface de l'eau déminéralisée. Après sédimentation du carbomer, le tout est agité 10 min à 200 tr/min à l'aide d'un homogénéisateur rotatif à pales (Rayneri 33/300P, Group VMI). Le copolymère polyacrylate est ensuite ajouté et homogénéisé à 700 tr/min pendant 10 min. Le mélange est ensuite chauffé à 75°C puis la glycérine est ajoutée et mélangée pendant 5 min. La phase grasse composée de ceteraryl isononanoate, de cetaryl glucoside, d'acétate de tocopheryl et/ou de monostéarate de glycerol est chauffée entre 75 et 80°C puis incorporée à la phase aqueuse. Le mélange est ensuite agité 20 min à 1800 tr/min, permettant ainsi la formation de l'émulsion. Le chauffage est ensuite arrêté et la trométhamine pré-mélangée à de l'eau déminéralisée est ajoutée et mélangée 15 min à 1900 tr/min. Enfin, un volume d'eau déminéralisée est ajouté à 45°C en quantité nécessaire pour remplacer l'eau évaporée lors des étapes de chauffage pendant la formulation. La formule est ensuite stockée à 20°C pour être utilisée le jour suivant.

2.2.3 - Caractérisation physico-chimique des matrices cosmétiques

Un test de stabilité est systématiquement réalisé sur les matrices modèles formulées après un et quatre jours à température ambiante, par la mesure de viscosité, du pH et une observation de l'aspect micro- et macroscopique des matrices. Le pH des crèmes commerciales et des matrices modèles a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre SI Analytics (Lab 870). La viscosité est mesurée par pénétrométrie (pénétromètre PNR10, PetroMesures) : un cône est lâché d'une hauteur fixe dans 300g de matrice et la profondeur de pénétration du cône (en mm \pm 0,1 mm) est mesurée après 5 secondes. Plus le cône s'enfonce profondément, plus la matrice est fluide et inversement. Chaque mesure a été réalisée trois fois.

2.3 – Observation de la répartition bactérienne par microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

2.3.1 - Marquages des bactéries

Plusieurs fluorochromes ont été utilisés pour marquer les bactéries. Le SYTO9 (life technologies) est un fluorochrome traversant passivement la membrane bactérienne et s'intercalant entre les bases de l'ADN. C'est un marqueur total c'est-à-dire qu'il a la capacité de marquer toutes les bactéries, vivantes ou mortes. Il est préparé à une

concentration de 3,34 mM dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO). Le DMSO est un solvant soluble dans l'eau et favorise la pénétration des marqueurs fluorescents à travers les membranes bactériennes (Brayton 1986). Les longueurs d'onde d'absorption et d'émission du SYTO9 sont respectivement de 485 et 498 nm. Le marquage des bactéries se fait en ajoutant 3 µl de SYTO9 dans 100 µl d'une suspension bactérienne à $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11}$ UFC/ml. Le mélange est homogénéisé 30 secondes au vortex puis incubé 30 à 60 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les bactéries apparaissent en vert après excitation du fluorochrome. Le SYBR green (Invitrogen SYBR green I nucleic acid gel stain, life technologies, 10 000 x concentré) est lui aussi un marqueur total, capable de pénétrer passivement dans les bactéries et de marquer l'ADN. Ses longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont respectivement de 497 et 520 nm. Le marquage des bactéries se fait en ajoutant 3 µl de SYBR green dans 100 µl d'une suspension bactérienne à $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11}$ UFC/ml. Le mélange est homogénéisé 10 secondes au vortex et incubé 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.

Le SYTOX green (life technologies, 5 mM dans DMSO) est un marqueur fluorescent vert ayant la capacité de passer uniquement au travers des membranes bactériennes perméabilisées puis de se fixer sur les acides nucléiques. C'est donc un indicateur de cellules mortes. Ses longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont respectivement de 504 et 523 nm. Dans les expériences présentées ci-après, 100 µl d'une suspension bactérienne à $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ UFC/ml sont déposés dans un puits d'une plaque 96 puits, auxquels sont ajoutés 25 µl de SYTOX green 20 µM avant observation par MCBL.

2.3.2 - Marquage et inoculation de la formule cosmétique

Le Rouge de Nil ou Nile Red (lot BCBH3600V, Sigma, 1M dans DMSO) est un fluorochrome hydrophobe ayant une faible solubilité dans l'eau. Il est très utilisé pour localiser et quantifier les lipides surtout les lipides neutres. Les gouttelettes lipidiques apparaissent en rouge dans les formules émulsionnées après excitation par un laser. Ses longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont respectivement de 552 et 636 nm. 3 µl de Nile Red (concentration à 5 mM) sont ajoutés dans $1 \text{ g} \pm 0,05\text{g}$ de matrice. Le mélange est homogénéisé au vortex 1 min, puis incubé 10 min à température ambiante à l'abri de la lumière.

Dix microlitres de suspension bactérienne de *S. aureus* à $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11}$ UFC/ml marquée sont ajoutés dans 1g de matrice préalablement marquée au Nile Red dans un tube conique de 50 ml. Le mélange est ensuite homogénéisé au vortex 1 minute.

2.3.3 – Acquisition par MCBL et analyse d’images

La formule inoculée est déposée au fond d’un puits d’une microplaque de 96 puits (Greiner Bio-one, France) à l’aide d’une seringue. L’échantillon est observé au Microscope Confocal à Balayage Laser Leica SP8 AOBS (Leica® Microsystems, France), par le biais d’un objectif à air 40x ayant une ouverture numérique de 0.85. Les images ont une taille de $290,62 \mu\text{m} \times 290,62 \mu\text{m}$ (512×512 pixels) $\times 1,6 \mu\text{m}$. Trente images par essai sont acquises, à raison de dix images dans 3 puits différents. Chaque image correspond à un volume observé de $1.2 \times 10^5 \mu\text{m}^3$. A ce stade de l’étude, l’analyse de la distribution spatiale des bactéries s’est faite visuellement en comparant les différentes images obtenues par MCBL dans les différentes formules.

3 - Résultats et discussion

3.1 - Analyse de la distribution bactérienne dans les produits cosmétiques commercialisés

Dans les lotions et les gels, le marquage au Nile red ne révèle pas de phase lipidique (aucune structure rouge), ce qui est cohérent puisque ces formules sont composées uniquement d’une phase aqueuse (Figure 19). Dans les crèmes et les laits testés, les gouttelettes lipidiques formant la phase grasse de l’émulsion apparaissent en rouge après marquage au Nile red. Dans certaines formules, les gouttelettes lipidiques sont bien définies (crèmes 1, 3, 5 et laits) alors que pour d’autres systèmes, on peut observer un tapis lipidique rouge assez diffus en arrière-plan des quelques gouttelettes (crèmes 2,6-8). On peut noter également que la taille des gouttelettes n’est pas la même dans toutes les formules. Dans les crèmes 6 et 7, on peut observer une émulsion fine avec une taille homogène des gouttelettes alors que pour la crème 1, les gouttelettes ont des tailles hétérogènes.

Dans les lotions, gels et laits testés, les bactéries marquées au SYTO9 en vert semblent réparties de façon homogène. A ce stade de l’étude, la qualification de l’homogénéité de la distribution spatiale des bactéries dans les formules a été faite visuellement d’après les images acquises par MCBL.

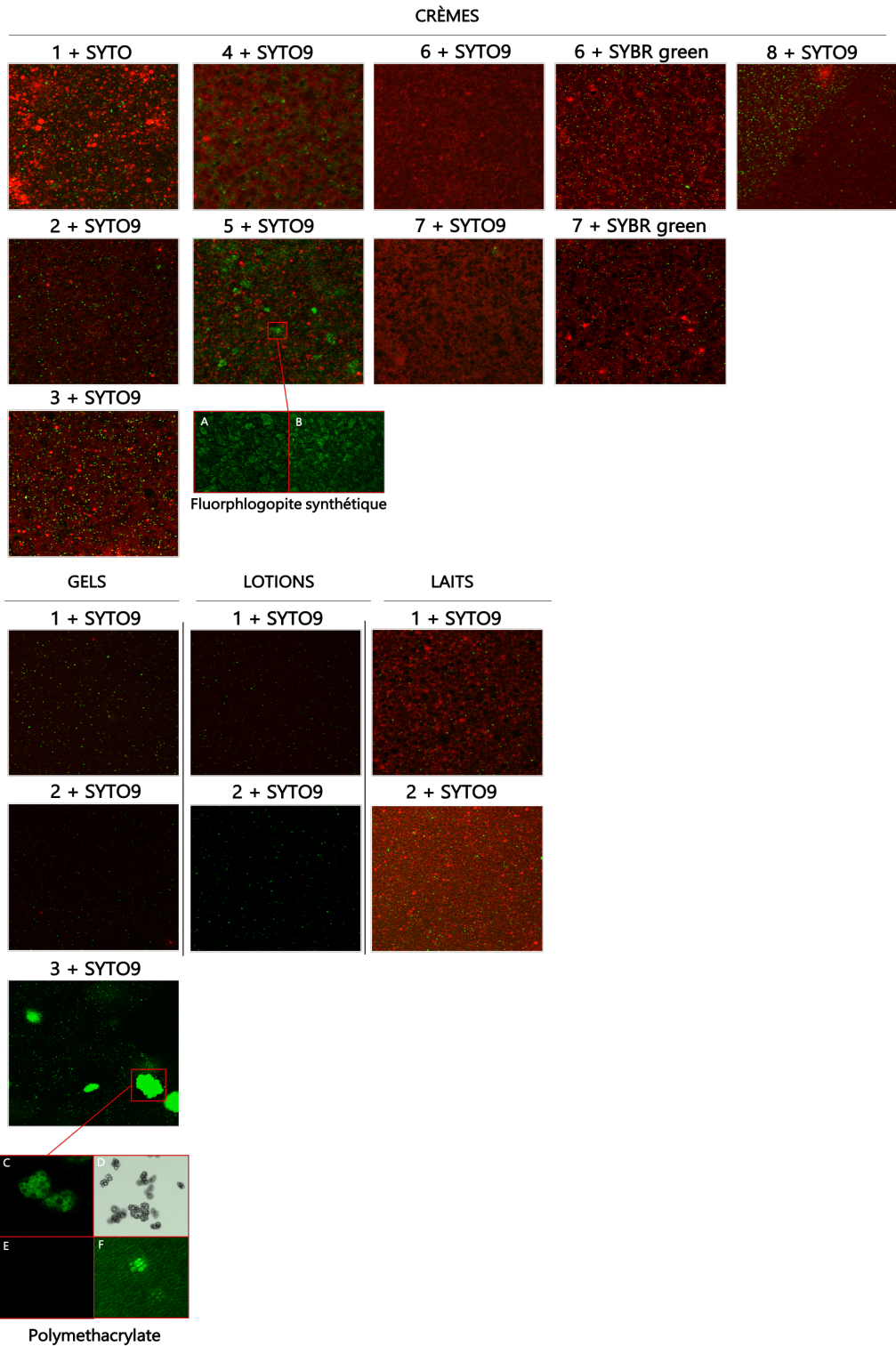


Figure 19 : Images de microscopie représentant la distribution spatiale des bactéries (en vert) dans les produits cosmétiques commercialisées (phase lipidique en rouge) obtenues par MCBL à l'objectif 40x sec. Observation au 40x par MCBL d'une solution de fluorphlogopite synthétique non marquée (A) et marquée au SYTO9 (B). Particules présentes dans le gel 3 observée au 40x avec un zoom 1.5 par MCBL (C) et au microscope optique x 40 (D). Observation au 40x par MCBL d'une solution de polymethacrylate non marquée (E) et marquée au SYTO9 (F).

La distribution spatiale des bactéries marquées au SYTO9 dans les crèmes 1, 2 et 3 est homogène. La répartition des bactéries dans les crèmes 4 et 5 est homogène mais d'importants bruits de fond de couleur verte perturbent l'observation de la fluorescence des bactéries. Après marquage au SYTO9 de certains des composés constituant la crème 5, il a été possible d'identifier la matière première à l'origine de ces structures vertes en arrière-plan : il s'agit de fluorphlogopite synthétique plus communément appelée mica synthétique (Figure 19B). Cette matière première minérale est composée de silicate de magnésium, d'aluminium et de potassium. Elle est utilisée dans de nombreux produits cosmétiques pigmentés plus particulièrement dans les poudres de maquillage pour son effet recouvrant, brillant et nacré (Ohta 2006). Sans apport de fluorochromes, la matière première reste visible par MCBL, il semblerait alors qu'elle soit naturellement autofluorescente (Figure 19A).

Dans le gel 3, des formes globulaires fluorescent également de façon intense (Figure 19C). Ces formes sont également observables au microscope optique (Figure 19D). La matière première à l'origine de ces structures a pu être identifiée après marquage au SYTO9 (Figure 19F), il s'agit de polyméthylméthacrylate utilisé comme adoucissant cutané et lubrifiant. Le composé n'étant visible par MCBL qu'après ajout de fluorochrome (Figure 19E), il n'est pas autofluorescent. Il semblerait alors que cette matière première soit marquée de façon non spécifique par le SYTO9. Des études mettent en évidence que le SYTO9 a l'inconvénient d'induire du bruit de fond (Feng *et al.* 2014; Stiefel *et al.* 2015). Le SYTO9 pourrait se fixer de manière non spécifique sur des composés présents dans le milieu environnant tels que de l'ADN issu des extraits végétaux utilisés comme principes actifs dans certaines formules ou d'autres substances ayant des affinités avec le SYTO9, ce qui pourrait expliquer les résultats de cette étude pour la crème 4 et le gel 3.

Dans les crèmes 6 et 7, malgré le marquage des bactéries au SYTO9, nous n'avons visualisé aucune bactérie dans la formule. Un second marqueur total, le SYBR green, a donc été utilisé afin de comprendre l'origine de ce phénomène. Les bactéries ont ainsi pu être observées avec ce marqueur et leur répartition dans ces deux crèmes s'est avérée homogène. Une hypothèse serait qu'un ou plusieurs constituants présents dans ces deux crèmes puissent interagir négativement avec le SYTO9. En comparant la composition de ces deux crèmes (6 et 7), il s'est avéré que celles-ci avaient un composé en commun, un émulsionnant anionique appelée potassium cetyl phosphate et qui pourrait donc être à l'origine du problème. Afin de comprendre l'interaction de ce

composé avec le marquage au SYTO9, des cellules de *S. aureus* marqués au SYTO9 ont été mises en suspension dans une solution de potassium cetyl phosphate à une concentration équivalente à celle dans la crème 6 soit à 2,25%. Lors de l'observation des cellules au MCBL, une rapide perte de fluorescence a été constatée. L'intensité de fluorescence résultant de la fixation d'un marqueur sur l'ADN peut dépendre de différents paramètres. Elle peut notamment être altérée par la présence de certains composés dans le milieu environnant comme l'albumine de sérum bovin et le rouge de phénol (Feng *et al.* 2014) ou encore par la présence de cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) induisant la photodégradation des marqueurs fluorescents (Wong and Campbell 2011). Une étude montre que le phénomène de bleaching ou « blanchissement » du SYTO9, correspondant à une perte de fluorescence aspécifique au cours du temps, se produirait plus rapidement pour des bactéries mortes que vivantes (Stiefel *et al.* 2015). Le potassium cetyl phosphate pourrait peut-être avoir une activité antimicrobienne qui entrainerait une dégradation du complexe ADN/SYTO9 ou plus probablement agirait sur l'intégrité membranaire des bactéries ce qui engendrerait la fuite de la fluorescence liée à l'ADN dans le milieu extérieur.

Afin de confirmer l'hypothétique action antimicrobienne du potassium cetyl phosphate, nous avons utilisé un troisième marqueur fluorescent, le SYTOX green. Il s'agit d'un marqueur incapable de pénétrer dans les cellules vivantes. En revanche, dans les cellules à la membrane perméabilisée, le marqueur traverse la membrane et se fixe sur les acides nucléiques. Les bactéries marquées au SYTOX green sont mises en suspension dans différentes concentrations de potassium cetyl phosphate, et la fluorescence par MCBL est suivie au cours du temps. On observe alors une augmentation de fluorescence au cours du temps traduisant ainsi une augmentation de la mortalité bactérienne. De plus, plus la concentration de potassium cetyl phosphate est forte, plus la fluorescence augmente rapidement (Figure 20). Pour vérifier l'inactivation des cellules de *S. aureus* en présence de potassium cetyl phosphate, un dénombrement sur boîte a été réalisé en parallèle de l'observation par MCBL. Sans potassium cetyl phosphate, il n'y a pas de régression bactérienne alors qu'à une concentration de 2,25% on observe une perte d'environ 2 log en 20 min. Il semblerait alors que le potassium cetyl phosphate ait bien des propriétés antimicrobiennes agissant sur la membrane bactérienne et pouvant être à l'origine de la perte de fluorescence du SYTO9 des bactéries mortes.

Ainsi, dans certaines formules cosmétiques, le SYTO9 serait inapte à marquer les cellules mortes, contrairement à ce qui est habituellement décrit (Wiederschain 2011). Le SYBR green est utilisé dans divers domaines de la biologie notamment dans les réactions en chaînes par polymérase (PCR) pour suivre en temps réel l'accumulation d'amplicons ou pour marquer l'ADN ou l'ARN après électrophorèse sur gel ou encore pour accéder à l'état physiologique des bactéries et les dénombrer (Patel *et al.* 2007; Gudnason *et al.* 2007; Berney *et al.* 2007). Nous avons montré dans cette partie de thèse que l'utilisation du SYBR green comme marqueur total des bactéries est préférable à celui du SYTO9 dans les formules cosmétiques car il ne semble pas être affecté par un composé à activité antimicrobienne, le cetyl phosphate de potassium.

Enfin, dans la crème 8, on peut observer distinctement des endroits de la crème sans bactéries et d'autres avec au contraire de très nombreuses bactéries. Il semblerait alors que la distribution spatiale des bactéries dans cette crème soit hétérogène.

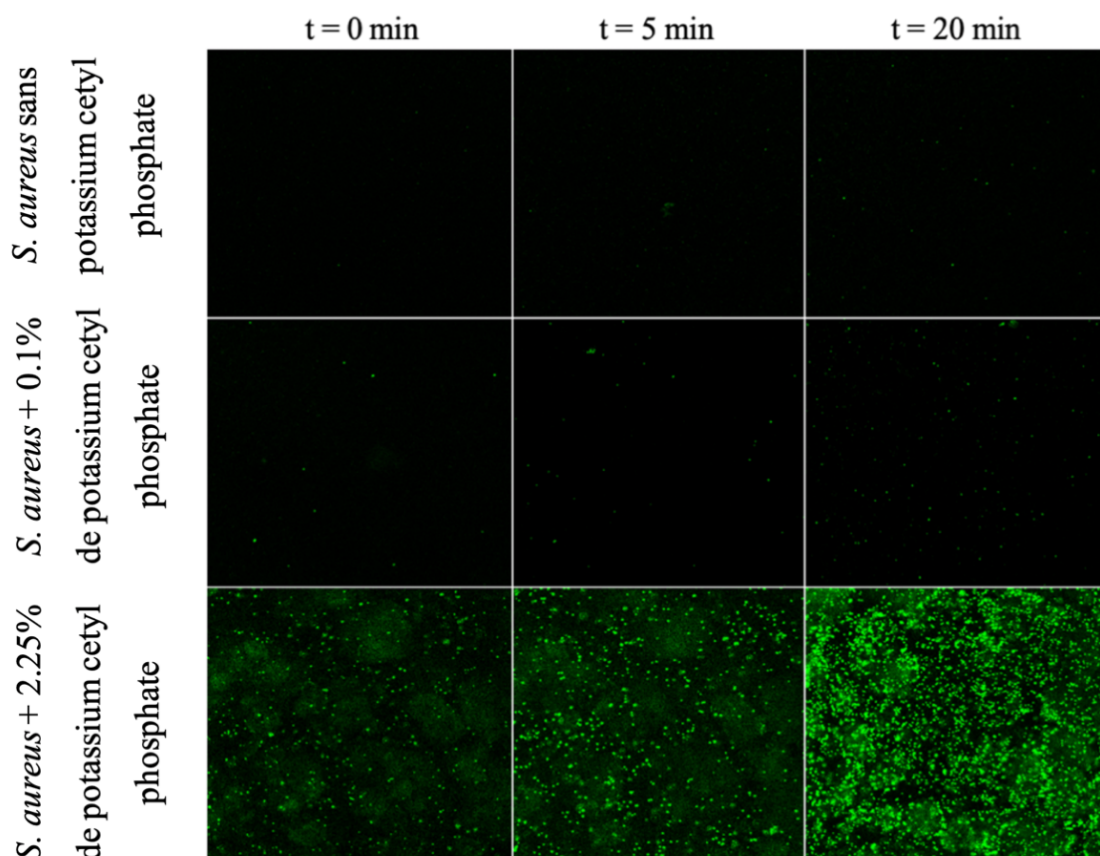


Figure 20 : Suivi de fluorescence par MCBL (40x) après marquage de *S. aureus* au SYTOX green dans de l'eau physiologique contenant différentes concentrations de potassium cetyl phosphate.

3.2 - Mise en évidence des matières premières impliquées dans la distribution spatiale des bactéries par formulation de matrices cosmétiques modèles

Dans l'étude bibliographique réalisée dans le chapitre I, il apparaît que certains facteurs pourraient être impliqués dans la répartition hétérogène des bactéries dans les produits cosmétiques tels que la structuration des émulsions, les propriétés de surface des bactéries ou encore la présence de certaines matières premières (Brisson *et al.* 2010; Chalier *et al.* 2007; Li *et al.* 2001; Lopez *et al.* 2006; Ly *et al.* 2008; Ly, Naitali-Bouchez, *et al.* 2006; Ly, Vo, *et al.* 2006). La crème 8 est celle dont la formulation interfère avec une bonne répartition des bactéries. Afin de mieux comprendre les facteurs impliqués dans cette mauvaise distribution, une base modèle émulsionnée de type crème ayant un ratio de phase grasse/phase aqueuse similaire à la crème 8 (37,1/62,9 h/e %) a été formulée. Deux matières premières, le monostéarate de glycérol et l'hydroxyéthylacrylate/sodium acryldiméthyltaurate copolymère, appelé copolymère polyacrylate par la suite, présentes dans la crème 8 et susceptibles d'être liées au

problème de distribution, ont été ajoutés à différentes concentrations séparément et ensemble.

La distribution spatiale des bactéries dans la base modèle sans les deux matières premières soupçonnées est homogène : c'est le témoin négatif (Tableau 8). En revanche, lorsque celles-ci sont ajoutées ensemble dans la base modèle et aux concentrations équivalentes à celles présentes dans la crème 8, soit avec 1,6% de copolymère polyacrylate et 2,5% de monostéarate de glycérol, elles induisent une distribution hétérogène des bactéries. Cet essai est considéré comme le témoin positif car il mime la répartition des bactéries dans la crème 8. L'ajout de monostéarate de glycérol seul à 2,5% ne semble pas être impliqué dans la répartition hétérogène des bactéries. L'ajout de 1,6% de copolymère polyacrylate seul ne permet pas d'obtenir une émulsion stable. Il a donc été nécessaire d'intégrer à la base modèle le monostéarate de glycérol à la concentration de 2,5% tout en faisant ensuite varier le pourcentage de copolymère polyacrylate. Grâce à sa fonction de co-émulsionnant, le monostéarate de glycérol stabilise l'émulsion. L'ajout du copolymère polyacrylate à 1% entraîne toujours une distribution hétérogène des bactéries mais moins importante qu'avec 1,6%. La distribution des bactéries devient homogène à 0,5%. Pour l'ensemble des formules, les valeurs de pH sont globalement comprises entre 5,3 et 5,9. En revanche, les valeurs de pénétrométrie, varient. En effet, nous observons que plus la concentration de copolymère polyacrylate est élevée et plus la viscosité de la matrice est importante. La distribution hétérogène des bactéries pourrait donc être liée soit à la présence de la molécule de copolymère polyacrylate, soit à la viscosité de la crème induite par la présence de copolymère polyacrylate. Nous investiguerons cette question lors de la prochaine partie de ce chapitre.

Tableau 8 : Synthèse des essais réalisés dans la crème 8 et la matrice modèle avec les images de microscopies associées représentant la distribution spatiale des bactéries (en vert) dans les matrices cosmétiques (en rouge). Pour chaque expérience, un échantillon de trois images représentatives des trente images obtenues au total par MCBL à l'objectif 40x air sont présentées.

| Matrices | pH | Pénétrométrie (mm) | % Matières premières | | Distribution spatiale de <i>S. aureus</i> | Distribution spatiale des bactéries dans les formules observées au MCBL (x40) |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------|---|---|
| | | | Copolymère polyacrylate | Monostéarate de glycérol | | |
| Matrice commerciale (crème 8) | 5,9 | 21,7 | 1,6% | 2,5% | Hétérogène | |
| | 5,7 | 34,2 | 0% | 0% | Homogène | |
| | 5,3 | 26,5 | 1,60% | 2,5% | Hétérogène | |
| Matrices modèles | 5,7 | 33,7 | 0% | 2,5% | Homogène | |
| | Emulsion instable | 27,9 | 1% | 0% | Résultats non significatifs | |
| | | | | 2,5% | Hétérogène | |
| | 5,7 | 31,6 | 0,50% | 2,5% | Homogène | |

4 - Conclusion

L'association de la microscopie confocale à balayage laser et l'utilisation de marqueurs fluorescents ont permis la visualisation de la structuration de la matrice cosmétique émulsionnée ainsi que des gouttelettes lipidiques la composant grâce au marquage au Nile red. Elle a également permis d'accéder à la distribution spatiale des bactéries dans les formules grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents (SYTO9 et SYBR green). C'est par ce biais que nous avons pu montrer que l'observation des bactéries était possible dans les formules cosmétiques émulsionnées, sauf dans quelques cas, notamment lorsque des composés autofluorescents ou marqués de façon non spécifique par le SYTO9 perturbent la visualisation des bactéries dans les formules.

Ces premières expériences nous ont permis de mettre en évidence que la distribution spatiale des bactéries semble être dépendante de la composition de la formule, et notamment de la présence d'épaississant tel que le copolymère polyacrylate. La suite de l'étude sur l'analyse de la distribution spatiale des bactéries a donc portée sur une meilleure compréhension des facteurs influençant la répartition des bactéries dans les matrices.

III - Impact des facteurs influençant la distribution spatiale des bactéries

1 - Synthèse de l'étude

La partie précédente a permis l'identification d'un épaississant, un copolymère polyacrylate, qui entraîne une mauvaise répartition des bactéries dans la matrice.

Cette partie de chapitre vise à i) déterminer si cette mauvaise répartition est seulement liée à l'ajout du copolymère polyacrylate ou si elle est liée à la viscosité induite, ii) à quantifier l'effet de la concentration d'épaississant sur la répartition des bactéries notamment à l'aide d'outils statistiques quantitatifs et iii) à explorer l'impact d'autres facteurs tels que les caractéristiques bactériennes de surface, notamment leur hydrophobicité, sur la distribution spatiale des bactéries. Elle fait l'objet d'un article intitulé « **Mosaic-CLSM assessment of bacterial spatial distribution in cosmetic matrices according to matrix viscosity and bacterial hydrophobicity** ».

Différentes concentrations de copolymère polyacrylate ont tout d'abord été incorporées dans des matrices modèles et la distribution spatiale a été quantifiée par la détermination de la fréquence de distribution de la surface de fluorescence des bactéries marquées après acquisition dans chaque matrice de près de 700 images au

minimum, acquises par MCBL en utilisant le mode mosaïque (acquisition de 15x15 images par échantillon). Un autre épaississant, la gomme de Guar, a également été testé à des viscosités similaires à celles obtenues avec le copolymère polyacrylate pour confirmer l'impact de la viscosité.

Par ailleurs, les profils de distribution spatiale de trois souches de *S. aureus* ayant différentes propriétés de surface et de billes inertes hydrophiles de 1 µm ont été comparés. Le niveau d'hydrophobicité des souches a été déterminé par la méthode « Bacterial Adhesion To Hydrocarbon » (BATH) (Rosenberg *et al.* 1980). Les trois souches testées présentaient des niveaux d'hydrophobicité de 42%, 76% et 95% d'affinité pour l'hexadécane. La charge de surface des souches a également été évaluée par mesure de la mobilité électrophorétique, mais les trois souches se sont toutes révélées chargées négativement de manière similaire, ce qui n'a pas permis de mettre en évidence le rôle de la charge à la surface des bactéries sur leur distribution spatiale dans les formules cosmétiques.

Les travaux présentés dans cet article ont permis, grâce à l'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser associée à l'analyse statistique des fréquences de distribution, de caractériser rapidement la distribution spatiale des bactéries dans une formule cosmétique. L'acquisition semi-automatique des images en mosaïque a permis de prendre plus d'une centaine de photos d'un échantillon dans un même puits d'une microplaque. La macro automatique créée sous le logiciel d'analyse d'image « ImageJ » a ensuite permis la binarisation de lot d'images et de calculer le pourcentage de fluorescence des bactéries marquées pour chaque image. La moyenne, la variance et la fréquence de distribution des pourcentages de fluorescence ont ensuite été calculées sur l'ensemble des images pour chacune des conditions. La comparaison entre la moyenne et la variance nous a ainsi permis de classer la distribution spatiale des bactéries comme uniforme (homogène) ou en cluster (hétérogène).

Les résultats montrent que plus la concentration en copolymère polyacrylate augmente, plus la distribution spatiale des bactéries est hétérogène. Les essais menés avec la gomme de Guar confirment les résultats précédents : lorsque la viscosité de la formule augmente, suite à l'ajout d'épaississant, la distribution spatiale des bactéries ne se fait plus de manière uniforme.

Parallèlement, l'analyse de l'impact du niveau d'hydrophobicité de la surface bactérienne sur la distribution spatiale des trois souches de *S. aureus* a révélé que plus

les bactéries sont hydrophobes et plus leur répartition dans la matrice cosmétique modèle est hétérogène.

Lors des challenge-tests, lors de l'étude de l'évolution de la population au cours du temps, il est évident qu'une répartition hétérogène des bactéries inoculées dans une formule cosmétique de forte viscosité peut engendrer une surestimation ou une sous-évaluation du nombre de bactéries dans un échantillon en fonction de l'endroit de prélèvement. Cet article décrit une méthode rapide qui permet de classer les matrices cosmétiques en fonction de leur capacité à permettre ou non une bonne répartition des bactéries inoculées. Ainsi, il est possible d'adapter le protocole d'échantillonnage en fonction des matrices, en augmentant le volume de prélèvement pour les matrices dans lesquelles la distribution est hétérogène. Par ailleurs et à plus long terme, il serait intéressant de chercher à mettre au point une méthode performante pour améliorer le niveau d'homogénéisation des bactéries dans les matrices cosmétiques visqueuses tout en évitant de déstabiliser la structure de la formule. L'amélioration de la distribution spatiale des bactéries dans les formules cosmétiques au moment de l'inoculation permettrait d'améliorer la fiabilité des résultats issus des challenge-tests.

Les travaux présentés dans cet article ont permis de mettre en évidence deux facteurs impactant la distribution spatiale des bactéries dans les formules cosmétiques : la viscosité des matrices et le niveau d'hydrophobicité des bactéries.

2 - Article 1

« Mosaic-CLSM assessment of bacterial spatial distribution in cosmetic matrices according to matrix viscosity and bacterial hydrophobicity »

Samia Almoughrabie¹, Chrisse Ngari², Romain Briandet¹, Valérie Poulet², and Florence Dubois-Brissonnet¹

¹Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France

²Laboratoires Clarins, 5 Rue Ampère, 95300 Pontoise, France

2.1 - Abstract

The present study aims to quickly identify factors that are susceptible to impair a uniform distribution of inoculated bacteria in cosmetic matrices in the context of challenge-tests. We used mosaic confocal laser scanning microscopy (M-CLSM) to obtain rapid assessment of the impact of the composition and viscosity of cosmetic matrices on *S. aureus* spatial distribution. Several model cosmetic matrices were formulated with different concentrations of two thickeners and inoculated with three *S. aureus* strains having different levels of hydrophobicity. The spatial distribution of *S. aureus* in each matrix was evaluated according to the frequency distribution of the fluorescence values of at least 675 CLSM images. We showed that, whatever the thickener, an increasingly concentration of thickener results in increasingly clustered bacterial distribution. Moreover, higher bacterial hydrophobicity also resulted in a more clustered spatial distribution. In conclusion, CLSM-based method allows a rapid characterization of bacterial spatial distribution in complex emulsified systems. Both matrix viscosity and bacterial surface hydrophobicity affect the bacterial spatial distribution which can have an impact on the reliability of bacterial enumeration during challenge-test.

Keywords: clustered distribution; regular distribution; viscous matrix; thickener; bacterial hydrophobicity; challenge-test; CLSM.

2.2 - Introduction

Controlling the contamination of cosmetic products is essential to avoid alterations of their organoleptic characteristics (color, odor, composition, etc.) and maintain their innocuity for consumers. These products can be contaminated during the processing

or because of consumer's repetitive use. Among other pathogens, *Staphylococcus aureus* has been found in various cosmetic products (Birteksoz Tan *et al.* 2013; Campana *et al.* 2006). This Gram-positive bacteria is present on the skin and mucous membranes of 30% of the population (Ryu *et al.* 2014) and causes a wide range of skin infections such as abscesses, furuncles, impetigo, etc. (Lowy 1998; Tong *et al.* 2015).

Each cosmetic product is characterized by a level of microbiological risk according to the standard ISO 29621:2017, which depends on several parameters such as the formula composition (preservative, ethanol, a_w , pH) or the type of packaging (unidose, airless pump, pots) (Berthele *et al.* 2014; Halla *et al.* 2018).

The preservation efficiency of a cosmetic product is evaluated by a challenge test, as defined in the European standard EN ISO 11930:2019. This procedure consists in artificially inoculating a product with a target microorganism at a defined concentration which is between 1×10^5 and 1×10^6 CFU.ml⁻¹ for bacteria. The evolution of the microbial population is then monitored at defined intervals for 28 days. A preservative system is considered as efficient against bacteria if the formula composition leads to a bacterial logarithm reduction ≥ 3 seven days after inoculation and without the growth of bacteria after 14 and 28 days.

Cosmetic products are complex systems, resulting from a mixture of an aqueous phase, a lipophilic phase, and an emulsifier. Thus, the evaluation of their microbiological contamination is a major challenge. The reliability of the challenge-test could be related to the spatial distribution of microorganisms in the matrix (Jongenburger *et al.* 2011). Microbial clustering can indeed influence the effectiveness of sampling plans. If the bacterial spatial distribution is heterogeneous, the probability of failing to detect a pathogen in a batch is higher than if the distribution is uniform and it can have consequences on public health (Jongenburger, Reij, *et al.* 2012). Many factors can affect contaminant distribution, such as the inoculum preparation step (Gilbert *et al.* 1991; Pembrey *et al.* 1999; Bruinsma *et al.* 2001), inoculum concentration (Jeanson *et al.* 2011), precision of serial dilutions (Hedges 2002), microbial growth or death, sampling process (partitioning, mixing) (Jongenburger, Bassett, *et al.* 2012; Nauta 2005) and composition and structure of the matrix (Lopez *et al.* 2006). In complex systems, many types of physico-chemical interactions are involved between bacteria and the matrix components, including van der Waals, electrostatic, Lewis acid–base, and hydrophobic interactions (Oss 2003). These interactions depend on the properties of the suspending media (ionic strength, temperature) and the interfacial physico-chemical properties of

both the bacteria and matrix components. Bacterial cell-surface properties have already been demonstrated to influence bacterial interactions with food-matrix components (Burgain *et al.* 2014; Ly, Vo, *et al.* 2006) and stability of the emulsion (Dorobantu *et al.* 2004; Li *et al.* 2001; Ly, Naitali-Bouchez, *et al.* 2006). In addition, matrix viscosity may also influence bacterial distribution. Thickeners are added to several types of cosmetic products to stabilize the system and prevent creaming or sedimentation (Pensé-Lhéritier and Masson 2016). The most common thickeners are natural nonionic (guar gum) or anionic (xanthan gum, carrageenan, and alginates) polysaccharides (Kirk-Othmer 2013). Synthetic polyacrylates, such as carbomers, are also widely used in cosmetics. They have a low thickening power in acidic medium but the addition of a base, such as tromethamine, neutralizes the carboxylic acid groups, which increases the electric charge of the macromolecules, causing their expansion in the formula (Kirk-Othmer 2013). The hydroxyethyl acrylate/sodium acryloyl dimethyl taurate copolymer, used in this study, is a pre-neutralized polyacrylate copolymer with many functions, including those of a stabilizer, texturizer, and emulsifier.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) has been extensively used to explore biofilm structure after cell labeling with fluorescent markers. It enables non-destructive fluorescence investigation of bacterial distribution, physiological heterogeneity, and spatial organization in such three-dimensional communities (Bridier *et al.* 2011; Bridier *et al.* 2010). Direct bacterial observation has also been achieved in thick systems, such as dairy matrices (Doherty *et al.* 2010; Auty, Gardiner, *et al.* 2001; Jeanson *et al.* 2011). Here, we took advantage of the confocal laser scanning microscopy to characterize the spatial distribution of *S. aureus* in oil-in-water (O/W) emulsified matrices according to the matrix structure and bacterial surface properties.

2.3 - Materials and Methods

2.3.1 - Bacterial strains and culture conditions

The strains used in this study were *S. aureus* CIP 4.83, *S. aureus* ATCC 29213, and *S. aureus* ATCC 27217. *S. aureus* CIP 4.83 is a strain recommended by the EN ISO 11930:2012 standard for cosmetic-product challenge tests. The other strains were chosen due to their different levels of hydrophobicity. Each strain, stored in cryovials at -80°C, was resuscitated by two successive subcultures in tryptic soy broth (TSB) before each experiment. Cultures were grown at 30°C until the end of the exponential growth phase.

The bacterial inoculum was calibrated to 1×10^{10} to 1×10^{11} CFU.ml⁻¹ in 150 mM NaCl in order to observe at least 10-100 bacteria per CLSM image (290.62 x 290.62 x 1.6 μm³). *S. aureus* cells were labelled with 2 μl Syto 9 (3.34 mM in DMSO, Life Technologies) and incubated in the dark for 1 h at room temperature. Syto 9 is a green cell-permeable nucleic-acid marker that stains live and dead bacteria. One gram of matrix in a 50 ml centrifuge tube was inoculated with the stained inoculum and vortexed for 30 s.

2.3.2 - Chemicals and materials

Acrylate copolymer, ceteryl glucoside, and glyceryl stearate were purchased from SEPPIC (Puteaux, France), carbomer from Gattefossé (Lyon, France), glycerin from Oleon (Ertvelde, Belgium), ceteryl isononanoate from BASF France (Lyon, France), tocopheryl acetate from DSM (Heerlen, the Netherlands), tromethamine from Azelis (Heusden, Belgium), and guar gum and hexadecane from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

When necessary, 200 μl of latex green fluorescent beads latex (L4655, carboxylate-modified polystyrene, 1 μm) from Sigma-Aldrich were added to the model matrices at a concentration of 4.75×10^{10} beads.ml⁻¹.

2.3.3 - Characterization of bacterial surface properties

Bacterial surface hydrophobicity

S. aureus surface hydrophobicity was measured by Bacterial Adherence To Hydrocarbons (BATH) (Rosenberg 1984). Bacterial cells were harvested by centrifugation at 1,575 x g for 10 min and resuspended to an OD₄₀₀ of 0.8 in 150 mM NaCl, precisely measured, and noted as A₀. Hexadecane (0.25 ml) was added to 1.5 ml of bacterial suspension. The two-phase system was vortexed for 2 min and allowed to separate for 15 min at room temperature before the OD₄₀₀ was measured in the aqueous phase (A₁). The percentage of solvent affinity was calculated as: the percentage of solvent affinity = $(1 - A_1/A_0) \times 100$. Each experiment was performed in triplicate with independently grown cultures.

Bacterial electrophoretic mobility

The bacterial electrophoretic mobility (EM) was measured by determining the rate at which bacteria migrate in a constant electric field (120 mV). EM was assessed using a

Zetameter ZetaCOMPACT™ from CAD instrumentation (Les Essarts le Roi, France). Bacterial cells were harvested by centrifugation at 1,575 x g for 10 min, washed twice in 150 mM NaCl, and resuspended in several phosphate buffers with a pH from 3 to 8. Each measurement recorded the movements of approximately 100 individual bacterial cells by automated video analysis. Each experiment was performed at least six times with two independent cultures.

2.3.4 - Cosmetic matrices

Commercial matrices

Six commercial matrices (Laboratoires CLARINS, Pontoise, France), named from 1 to 6, were selected to represent the main emulsified cosmetic products, such as body lotions or creams.

Preparation of the emulsified model matrix (35/65 O/W %)

The aqueous phase was first prepared with 0.25% carbomer in water, with the addition of acrylate copolymer (0.4 to 1.6%) when necessary and heated to 75°C before glycerin (moisturizer, 9%) was added. The oil phase, composed of 28.8% cetearyl isononanoate (emollient), 3.5% cetearyl glucoside (emulsifier), 0.2% tocopheryl acetate (antioxidant), and 2.5% glyceryl stearate (co-emulsifier), was heated to 75 to 80°C before being blended with the aqueous phase at 1,800 rpm using a rotor-stator homogenizer (Rayneri 33/300P, Group VMI) to obtain an emulsion. Tromethamine (base, 0.15%) was finally added. Guar gum was pre-mixed with glycerin and added to a final concentration of 2.5% when necessary.

2.3.5 - Characterization of the emulsified matrices

Viscosity measurements

The viscosity of industrial or model matrices was measured by penetrometry using a penetrometer (PNR10, PetroMesures). A specific cone was released in 300 g of matrix and the penetration depth measured (in mm \pm 0.1 mm) after 5 s: the deeper the cone sinks into the matrix, the softer the matrix. Three replicates were performed for each measurement.

Determination of lipid droplet electrophoretic mobility

Emulsified matrices, with or without acrylate copolymer, were diluted 1,500 times in appropriate phosphate buffer prior to analysis. Electrophoretic mobility (EM) was measured at pH 4 to 6 using a ZetaCOMPACT™ zetameter (CAD instrumentation; Les Essarts le Roi, France).

2.3.6 - Enumeration of the bacterial population

Just after bacterial inoculation, 15 samples were harvested from different locations of the contaminated matrix and enumerated by serial dilution. Enumeration was performed on tryptone soya agar (TSA, Biomérieux) by the drop-plate method (Chen *et al.* 2003). Plates were incubated at 30°C for 24 to 48 h before counting. Each experiment was performed in triplicate. The ratio of recovery is the log CFU/g divided by the log inoculated CFU/g (Figure 23A). The enumerated bacterial population was similar to the level of inoculation if the ratio of recovery is equal to 1 (Figure 23A).

2.3.7 - Mosaic-Confocal Laser Scanning Microscopy (M-CLSM) and image analysis

The inoculated matrix was dropped into the wells of polystyrene 96-well microtiter plates (Greiner Bio-One, France). Image acquisition was performed using a Leica SP8 AOBS Confocal Laser Scanning Microscope (Leica Microsystems, France) at the INRAE MIMA2 microscopy platform (<https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12>). Syto 9 and Nile red were excited at 488 nm and 561 nm and the emitted fluorescence collected from 498 to 560 nm and 630 to 750 nm, respectively.

Each image was acquired using a 40x air objective (Numerical Aperture = 0.85) and its size was 290.62 x 290.62 x 1.6 μm^3 (512 x 512 pixels). The CLSM control software was programmed to take in each well a mosaic of 15 x 15 images, each of them corresponding to an observed volume of 1.3×10^{-7} ml. Acquiring mosaics instead of single images allows to visualize bigger volumes of matrix and to decrease the detection threshold per g. Each experiment was performed at least in triplicate.

The percentage of surface fluorescence (SF) for each image was calculated by binarizing the images using the MaxEntropy function in an automatic macro executed in the ImageJ software, (National Institutes of Health, USA) (Schneider *et al.* 2012). In our experimental conditions, the range of SF that can be visualized on one image is between 0.0005% (one bacteria) to 100% (over 2×10^5 bacteria).

The equivalent CFU.ml⁻¹ for each image acquired by CLSM was calculated first by dividing the SF of the image by the SF of one bacterium leading to a number of bacteria per image. Bacterial concentration was then calculated in bacteria per g taking into account the volume observed for one image and the matrix density (1.15 g/ml). The ratio of recovery is the equivalent log bacteria/g divided by log inoculated CFU/g.

The bacterial spatial distribution was quantified by calculating the frequency distribution, the mean and the variance of the fluorescence values obtained on at least 675 and up to 1125 images. A variance superior, equal or inferior to its mean indicates a clustered, uniform or regular spatial distribution respectively (Jongenburger, Bassett, *et al.* 2012).

2.3.8 - Statistical analysis

All statistical analyses were performed using a free version of XLSTAT (Addinsoft). Factors were considered to have a statistically significant effect for a critical probability associated with the Fisher test *P* value lower than 0.05.

2.4 - Results

2.4.1 - Determination of bacterial surface properties

Bacterial surface hydrophobicity

The three *S. aureus* strains were chosen according to their hydrophobicity to evaluate the impact of bacterial surface properties on bacterial distribution in matrices. *S. aureus* CIP 4.83 was the most hydrophobic strain (95% affinity for hexadecane), whereas *S. aureus* ATCC 292312 and ATCC 27217 had 76% and 42% affinity, respectively. We also tested the behavior of fluorescent polystyrene microspheres. These inert beads have similar morphology to that of *S. aureus* (sphere of 1 μm in diameter) but are more hydrophilic than the tested bacteria (5% affinity for hexadecane).

Bacterial surface charge

The electrophoretic mobility of the three strains was measured at a pH from 3 to 8 (Figure 21A). All strains were negatively charged at an ionic strength of 1 mM. Their electrophoretic mobility was near -3 μm.s⁻¹.V⁻¹.cm⁻¹ at pH 3, increased to approximately -1.5 μm.s⁻¹.V⁻¹.cm⁻¹ at pH 6, and remained constant from pH 6 to 8. There were no significant differences in electrophoretic mobility between the three strains.

2.4.2 - Determination of matrix properties

Matrix viscosity

Among the six commercial cosmetic matrices, matrices 1 and 4, which were body lotions, had penetrometry values of 38.0 ± 0.1 mm and 34.1 ± 0.2 mm, respectively. Matrices 2, 3, 5, and 6 were creams and had penetrometry values of 35.2 ± 0.4 mm, 34.4 ± 0.1 mm, 32.1 ± 0.6 mm, and 23.2 ± 0.1 mm, respectively.

Model matrices formulated with 0, 0.4, 0.8, or 1.6% acrylate copolymer had penetrometry values of 31.5 ± 0.4 mm, 28.5 ± 0.3 mm, 27.7 ± 0.4 mm, and 26.6 ± 0.3 mm, respectively. Those with 2.5% guar gum had a penetrometry value of 25.5 ± 0.4 mm.

Matrix droplet electrophoretic mobility

Model matrices had a pH between 5 and 6. The mobility of droplets was near zero at pH 4 and slightly decreased from pH 5 to 6 for matrices with or without acrylate copolymer (Figure 21B). There was no significant difference between the electrophoretic mobility of droplets in either matrix.

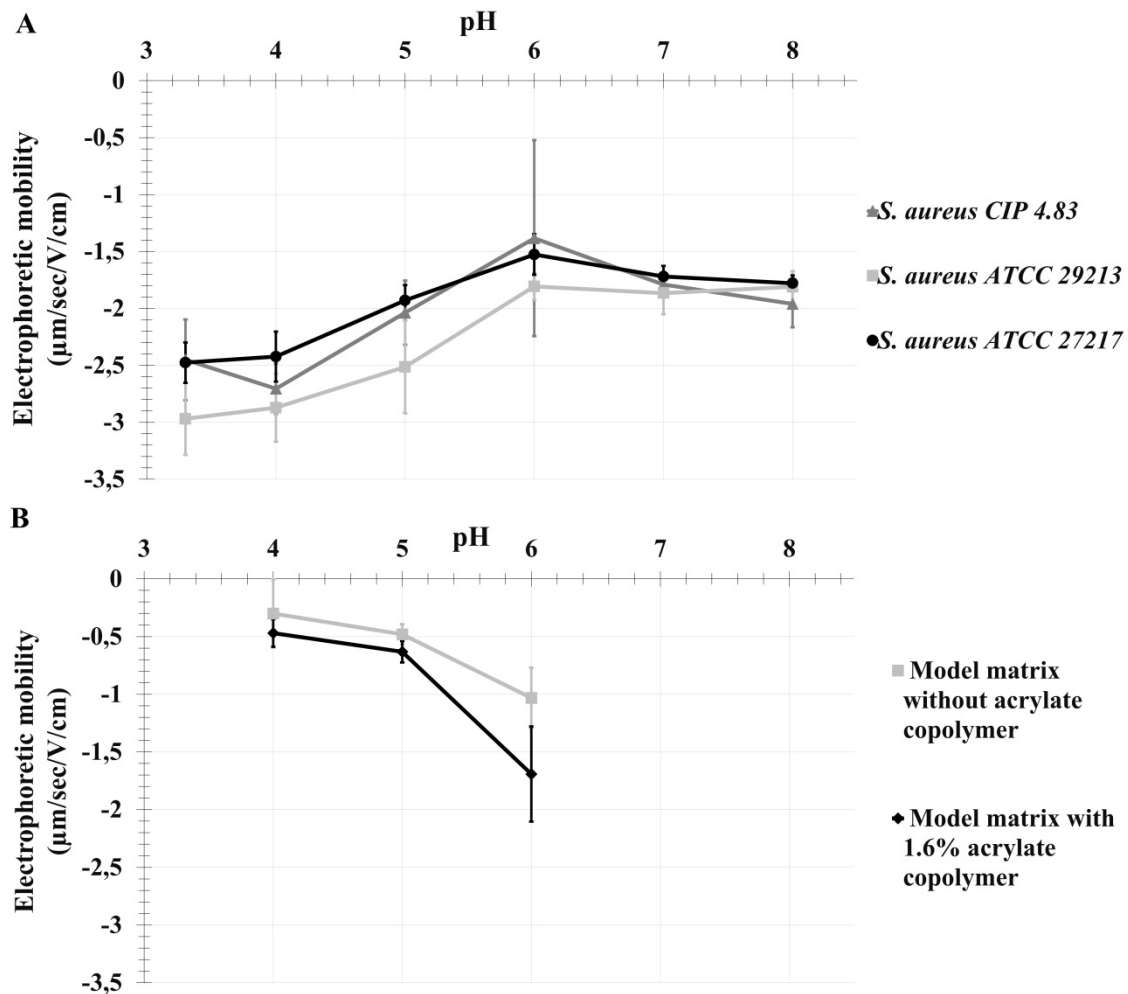


Figure 21 : Electrophoretic mobility of three *S. aureus* strains (A) and the lipid droplets of a model matrix (B) at a pH from 3 to 8. Data are expressed as the mean \pm standard deviation of two biological replicates.

2.4.3 - Bacterial spatial distribution in commercial emulsions

We assessed the spatial distribution of *S. aureus* CIP 4.83 in six commercial cosmetic matrices of various viscosities by CLSM imaging to identify the formulas in which uniform homogenization is not complete.

Figure 22A and B show the frequency distribution of surface fluorescence (SF), the mean and the variance for two of the six matrices taken as examples. For matrix 1, the variance of the SF is inferior to the mean which indicates a regular bacterial distribution. Figure 22C illustrates the regular distribution in matrix 1 showing one series of 225 images. Matrices 2 to 5 showed similar regular distribution with SF means being between 0.03% and 0.45% (data not shown). The matrices 1 to 5 had low viscosities, with penetration values superior to 32 mm. In contrast, matrix 6 showed clustered

bacterial distribution with a variance of SF superior to the mean (Figure 22B and D). Figure 22B shows the higher dispersion of frequency distribution values in comparison to matrix 1 (Figure 22A). Matrix 6 had the highest viscosity, with a penetration value of 23.2 ± 0.1 mm.

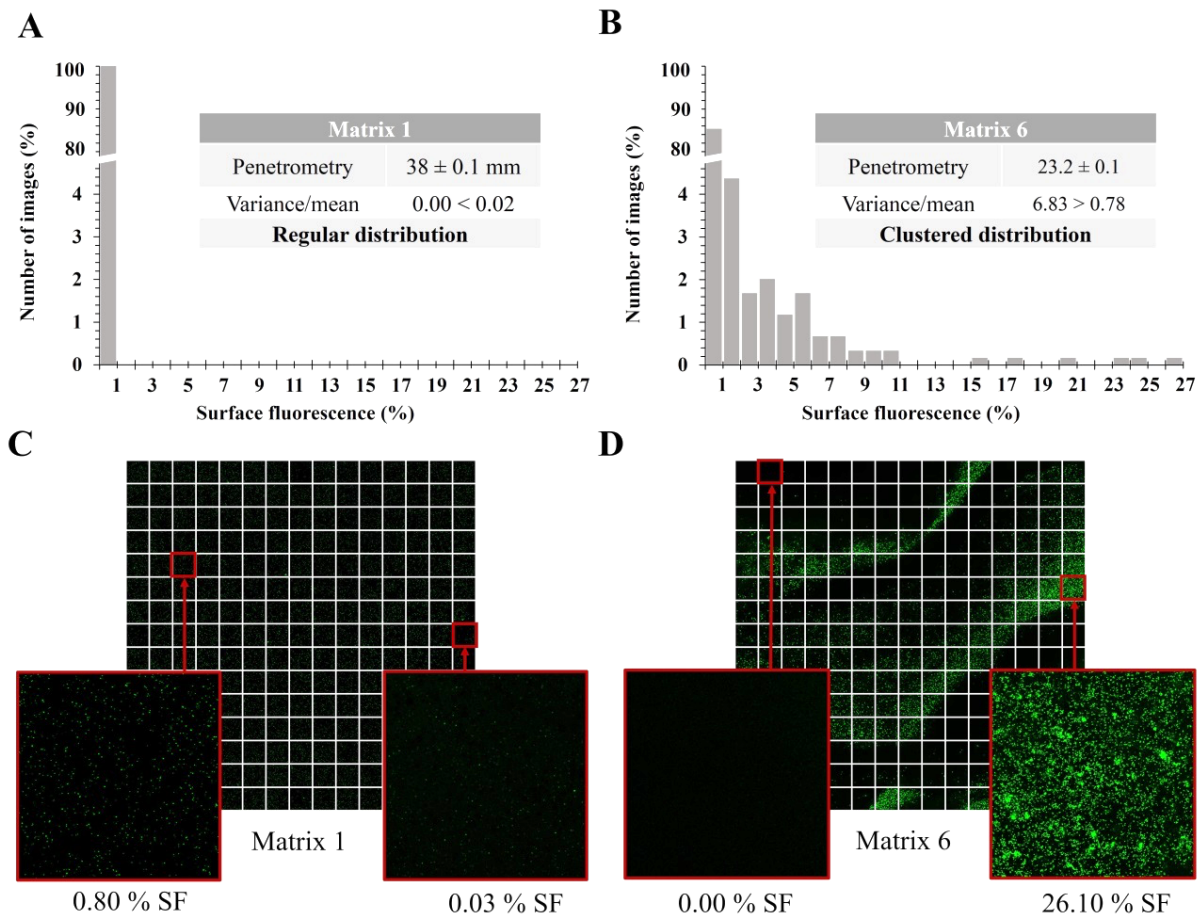


Figure 22 : Frequency distribution of *S. aureus* CIP 4.83 surface fluorescence among 675 images mean and variance associated in matrices 1 (A) and 6 (B) and a series of 225 CLSM images in matrices 1 (C) and 6 (D).

2.4.4 - Bacterial spatial distribution and enumeration in matrices with thickener

From the matrix 6 composition, several assays were conducted to identify the component that impairs the regular distribution of *S. aureus* in the matrix. It appears to be the acrylate copolymer (data not shown). To confirm the impact of its presence, we formulated two emulsified model matrices, without or with acrylate copolymer at 1.6% and evaluated the ratio of recovery between the initial inoculum and by plate count (Figure 23A) or by M-CLSM enumeration (Figure 23B). Bacterial enumeration by

both methods was significantly more variable in matrices with 1.6% acrylate copolymer than in the matrix without acrylate copolymer ($p < 0.05$). We can note a higher variability of enumeration by CLSM imaging than by plate count, due to the substantially smaller analyzed volume (1.5×10^{-7} g compared to 1g).

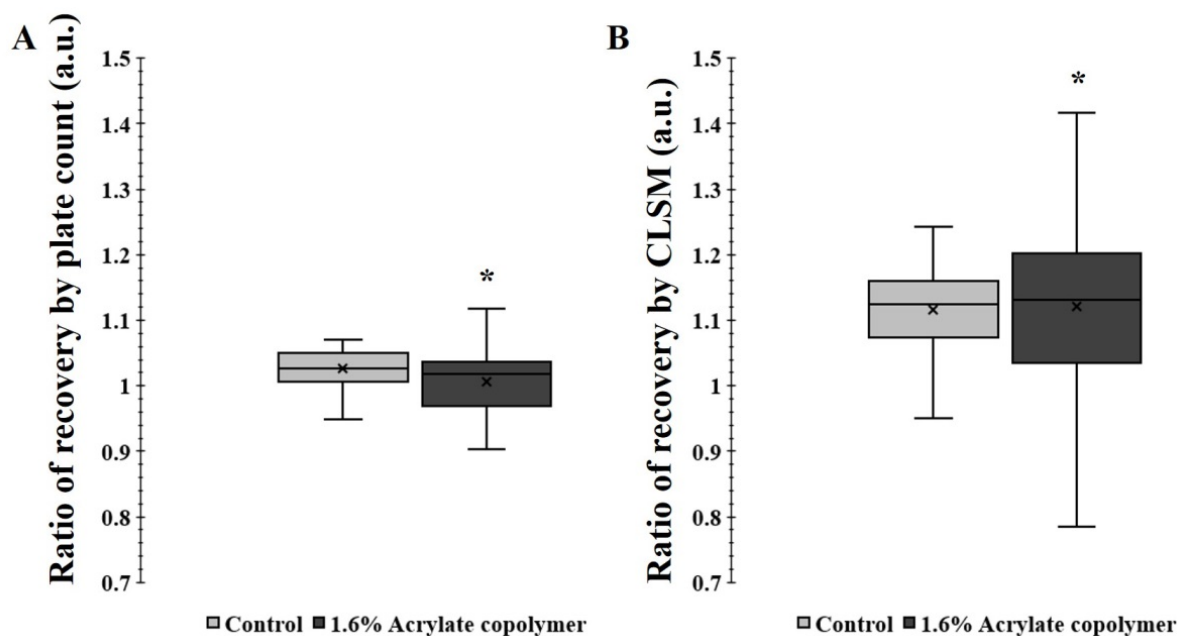


Figure 23 : Ratio of bacterial recovery obtained with 0% or 1.6% acrylate polymer by plate count (A) and by CLSM enumeration from five series of 225 images (B).

We further investigated the impact of the concentration of thickener by formulating four model matrices with 0, 0.4, 0.8, or 1.6% acrylate copolymer and inoculating them with three different *S. aureus* strains or fluorescent beads. The frequency distribution of surface fluorescence is more dispersed with increasing acrylate copolymer concentration, regardless of the strain. The variance is superior to the mean for 0.8% and far more for 1.6% acrylate copolymer resulting in clustered bacterial distribution (Figure 24D-I). Without acrylate copolymer or with 0.4% (data not shown), the variance is inferior to the mean resulting in regular distribution. The results are similar for hydrophilic beads which are regularly distributed in matrices with 0% to 0.4% acrylate polymer, contrarily to 0.8% and 1.6% (data not shown).

We intend next to determine if the clustered bacterial distribution is due to the viscosity which increases when the concentration of acrylate copolymer increases or if it is due to this thickener itself. We thus formulated model matrices with guar gum, another thickener. The viscosity obtained with 2.5% guar gum is similar to that obtained with 1.6% acrylate copolymer (25.5 ± 0.3 mm *versus* 26.2 ± 0.1 mm). The spatial distribution

of *S. aureus* was clustered with the guar gum (Figure 24A-C) but not without (Figure 24J-L), regardless of the strain. The results are similar for hydrophilic beads (data not shown).

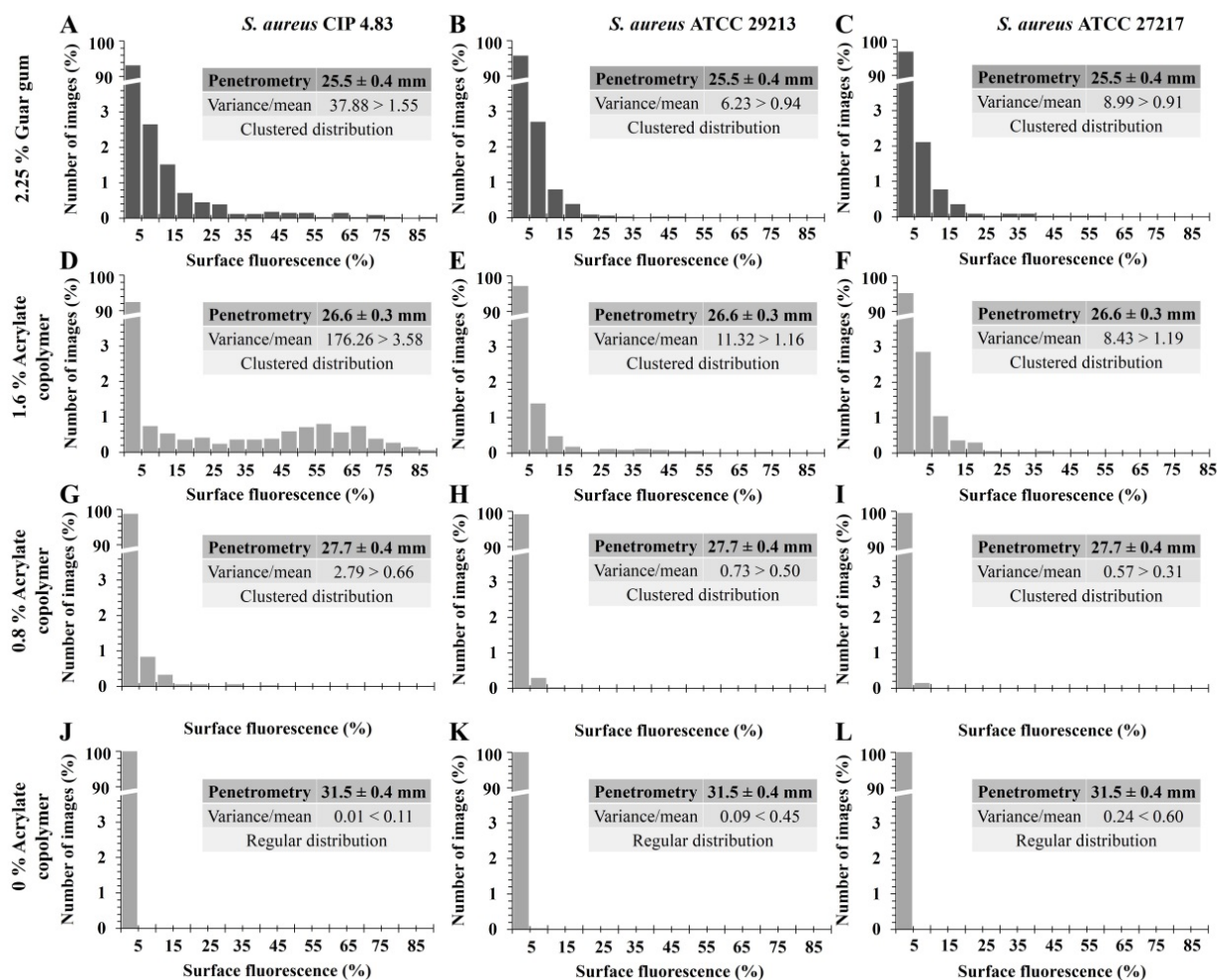


Figure 24 : Frequency distribution of three strains of *S. aureus* of surface fluorescence among five series of 225 CLSM images in matrices with various concentrations of acrylate copolymer (from 0% to 1.6%) or guar gum (2.5%), mean and variance associated.

2.4.5 - Spatial distribution of three *S. aureus* strains according to their level of hydrophobicity in matrices with thickener

Spatial distribution was not affected by the level of hydrophobicity of the three bacterial strains in matrices with 0 (Figure 24J-L) or 0.4% acrylate copolymer (data not shown). Conversely, in the matrix with 1.6% acrylate copolymer, the variance of SF is highly superior to the mean and reached 176.26 for *S. aureus* CIP 4.83, 11.32 for *S. aureus* ATCC29213, 8.43 for *S. aureus* ATCC27217 (Figure 24D-F). The most hydrophobic bacteria also showed the most clustered spatial distribution in the matrix

with 2.5% guar gum (Figure 24A). Hence, the spatial distribution was increasingly clustered with increasing hydrophobicity of the strain in high viscosity matrices.

2.5 - Discussion

The study of the spatial distribution of three *S. aureus* strains with different levels of hydrophobicity in several matrices with specific characteristics allowed us to understand the determinants of their distribution. First, we succeeded to obtain accurate M-CLSM images that allow rapid characterization of the bacterial spatial distribution in emulsified matrices. Despite the light diffraction by high lipid-content droplets, we optimized the settings to obtain high resolution images with a low fluorescence background signal. The mosaic mode allows lowering the threshold of bacterial enumeration and each mosaic image (225 images) was quickly acquired in only 8 min. An Image J macro was developed to batch, accelerate and standardize image quantification. Afterwards, the calculation of the frequency distribution together with the comparison of the variance and the mean of SF allowed to classify the spatial distribution as clustered, uniform or regular, as did Jongenburger, Bassett, *et al.* (2012) for bacterial spatial distribution in milk powders. M-CLSM appears to be a quick and relevant *in situ* approach for both bacterial enumeration and investigation of spatial distribution in complex matrices.

The results demonstrate that an increasingly viscous matrix, due to increasing the concentration of thickener, results in increasingly clustered bacterial distribution. By consequence, the heterogeneity of the enumeration results, affected by the clustered bacterial spatial distribution, also appeared to be driven by matrix viscosity. In the field of metal production, in which metallic particles are added before solidification, the distribution of such particles is critical and can affect the quality of the final product. It was shown that viscosity, among other factors, influences metal particle distribution in the matrices (Hashim *et al.* 2002). In an agar-based food model system, Wimpenny *et al.* (1995) also stated that the distribution of bacteria is affected by agar concentration. The structure of emulsions, especially droplet size, may also play a role in bacterial spatial distribution. Brocklehurst *et al.* (1995) studied the spatial distribution of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a hexadecane/water emulsion. They showed that droplet size correlates with viscosity: the smaller the droplet size, the higher the emulsion viscosity, and thus the greater the bacterial immobilization. Furthermore, Jongenburger, Reij, *et al.* (2012) simulated homogeneous and

heterogeneous distribution of bacterial contaminants in batches of powdered infant formula and they showed that a low level of contamination and a heterogeneous bacterial distribution lead to a higher variability of bacterial enumeration.

Besides viscosity of the matrix, our results also show that increasing *S. aureus* surface hydrophobicity induces increasing clustered spatial distribution. These observations are in accordance with those of Ly, Vo, *et al.* (2006), who demonstrated the existence of physicochemical interactions between bacteria and the constituents of food matrices. They highlighted the role of the surface hydrophobicity of lactic-acid bacteria showing that the LLD18 strain, with a highly hydrophobic surface, interacts more with lipids and hydrophobic compounds than a hydrophilic strain (LLD16). Another study showed that hydrophobic bacteria can stabilize oil-in-water emulsions by adhering to the interface and preventing droplets from coalescing, whereas hydrophilic bacteria cannot (Dorobantu *et al.* 2004). The emulsified matrix used in our study consisted of a 65% hydrophilic phase and a 35% lipophilic phase. Our hypothesis is that the hydrophobic *S. aureus* strain was more highly trapped at the surface of the hydrophobic droplets than the two other strains, which led to a more heterogeneous distribution of the bacteria. This shows that the choice of the bacterial strain can have a strong impact on bacterial spatial distribution and thus on the results of enumerations after sampling.

Interactions between bacteria and emulsions can also be affected by the surface charge of the bacteria cell wall. Li *et al.* (2001) studied interactions between *E. coli* and emulsion droplets (hexadecane/water). *E. coli* and these droplets having opposite surface charges, the bacteria were attracted to the surface of the droplets and destabilized the emulsion. However, in our study, the *S. aureus* strains showed no difference in electrophoretic mobility at an ionic strength of 1 mM. The negative charge was the smallest at a pH of 5 to 6. Moreover, at these pHs, the negative charge of the droplets of the emulsified matrices, with or without acrylate copolymer, was very low. By consequence, in this study, the bacterial surface charge cannot explain the difference of bacterial distribution between strains.

2.6 - Conclusion

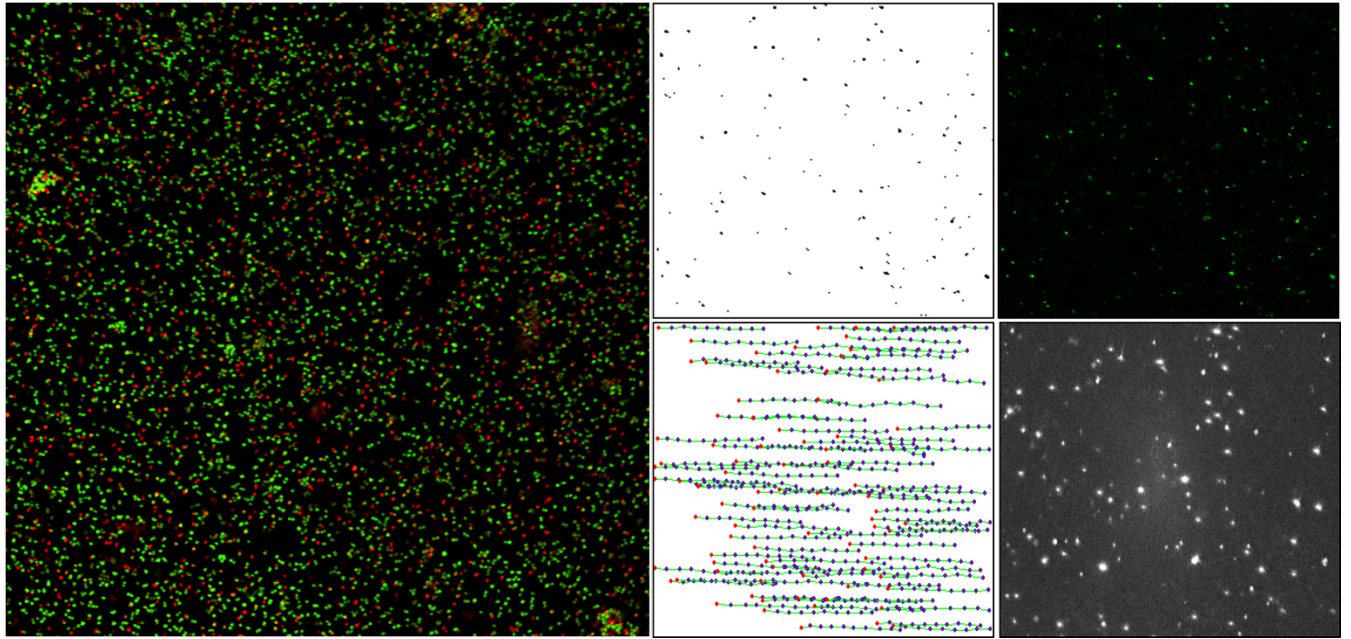
M-CLSM is a rapid and relevant technique to characterize the bacterial spatial organization in complex emulsified systems. Both matrix viscosity and bacterial surface hydrophobicity were shown to affect the *S. aureus* spatial distribution in cosmetic matrices. The method could be used to quickly determine the ability of a formula to allow or not regular bacterial distribution and thus to classify cosmetic matrices upon this parameter. This will be helpful for increasing the reliability of challenge-tests by adapting the sampling plans to the class of matrices. The proposed M-CLSM methodology could also be used to analyze spatial patterns of microbial contamination in food matrices or medical functional biogels.

Acknowledgments

The zeta potential measurements were performed at the DIVVA platform (AgroSup Dijon, Université de Bourgogne–Franche-Comté. We thank Elena Exposito-Garcia and Aurelie Trainoy (Laboratoires CLARINS) for their expertise in cosmetic formulation and Julien Deschamps (INRAE, Micalis Institute) for his support in the CLSM analyses.

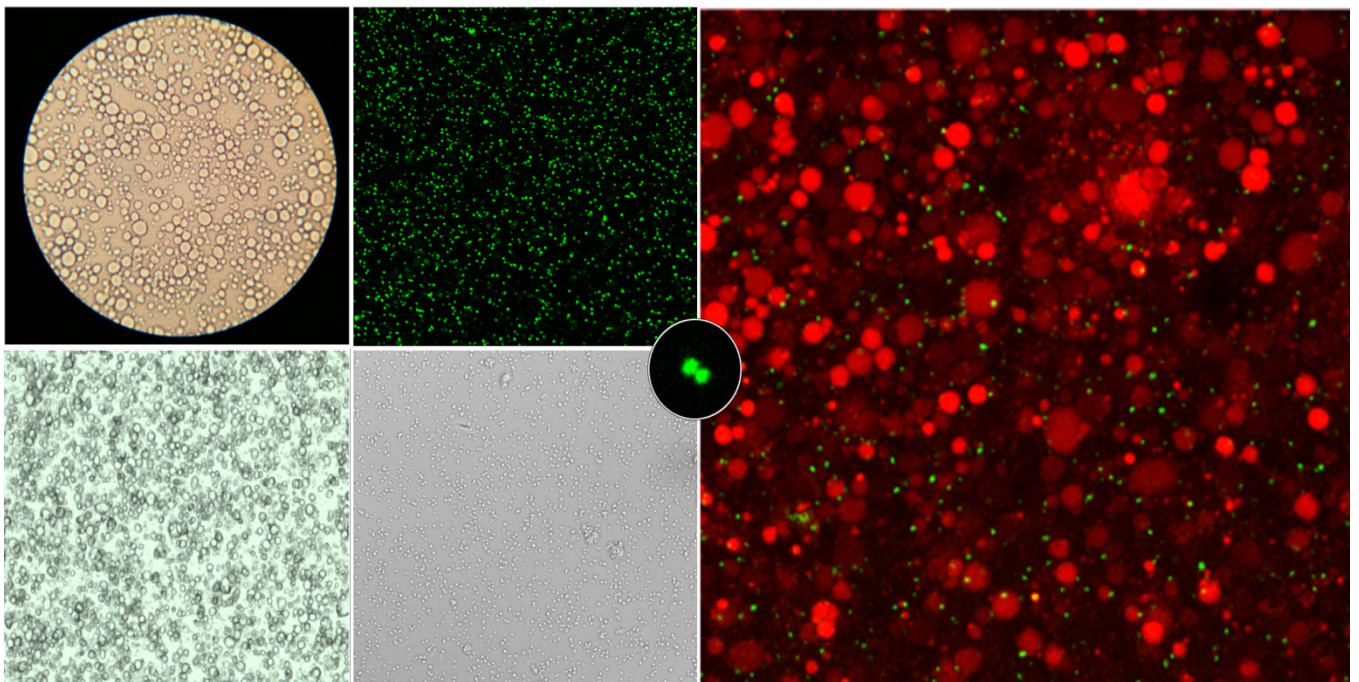
Conflict of interest

This study has received raw materials and funds from Laboratoires CLARINS. V. Poulet and C. Ngari are employed by the company Laboratoires CLARINS. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial relationships.



CHAPITRE III :

Évaluation et prévision de l'action antimicrobienne dans les formules cosmétiques



I - Synthèse de l'étude

Pour assurer la sécurité microbiologique des produits cosmétiques, plusieurs stratégies de conservation peuvent être mises en place. L'une des plus courantes consiste en l'utilisation de conservateurs qu'ils soient synthétiques ou naturels. Comme présenté précédemment, l'évaluation de la conservation d'une formule cosmétique est généralement effectuée par un challenge-test, réglementé par la norme NF EN ISO 11930. Cependant, les challenge-tests sont chronophages et requièrent une grande mobilisation des opérateurs en laboratoire. De plus, le dénombrement bactérien sur milieux gélosés de microorganismes spécifiques inoculés dans la formule devant être réalisé à 7 jours, 14 jours puis 28 jours, il faut alors attendre environ 30 jours au total pour obtenir une validation de l'efficacité de la conservation d'une formule. C'est dans ce contexte que nos travaux ont eu pour objectif de mettre au point une méthode rapide d'évaluation de la capacité de protection d'une formule. Cette méthode est basée sur l'enregistrement de l'évolution de la population bactérienne dans la formule sur un temps court par MCBL et sur la prévision de la régression bactérienne après plusieurs jours, grâce à l'utilisation de modèles primaire et secondaire d'inactivation bactérienne. Cette méthode permet ainsi d'évaluer et de comparer le comportement des conservateurs dans des matrices complexes. Ce travail fait l'objet d'un article intitulé « **Rapid assessment and prediction of preservative efficiency in cosmetic products using HCS-CLSM** ».

Afin de suivre l'inactivation bactérienne sur des temps courts, une suspension de *S. aureus* a été inoculée selon les spécifications du challenge-test dans des matrices cosmétiques modèles formulées avec différentes concentrations de conservateurs. Deux conservateurs ont été testés : la chlorphénésine ou 3-(4-chlorophenoxy)-1,2-propanediol et l'alcool benzylique. La base modèle émulsionnée de forme huile dans eau (h/e) utilisée dans cette étude est composée de 20 % de phase grasse et de 80 % de phase aqueuse (20/80 h/e%), ce qui est représentatif de la plupart des produits cosmétiques de type crème ou lait. Cette matrice modèle a été choisie car la distribution spatiale des bactéries y est homogène.

Grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité fluorescent, la calcein-AM, il a été possible de suivre l'augmentation de la mortalité bactérienne, corrélée à la perte de fluorescence, au cours du temps grâce à un module de MCBL appelé HCS pour « High Content Screening » ou criblage à haut débit (CHD). Ce module permet de programmer automatiquement la platine du microscope où se trouve l'échantillon préalablement

déposé dans une microplaque, pour passer automatiquement de puits en puits à des intervalles spécifiés et ce jusqu'à 17h en continu. C'est un réel avantage pour éviter le photoblanchiment. Une fois les images acquises, les images sont traitées et analysées par une macro automatique créée sous ImageJ afin d'extraire le nombre de bactéries comptées sur chaque image. Nous avons alors pu vérifier que le dénombrement des bactéries dans une formule cosmétique par « HCS-CLSM » était corrélé avec leurs dénombrements sur milieux gélosés pour un niveau de population supérieur au seuil de détection de la technique de microscopie (6×10^6 bactéries/g). Grâce à ces valeurs de dénombrements, nous avons alors obtenu les cinétiques d'inactivation bactérienne pour chaque concentration de conservateur. Le temps de réduction logarithmique a ensuite pu être calculé pour chaque concentration de conservateur grâce à l'application d'un modèle linéaire d'inactivation sur les cinétiques. Puis, nous avons pu modéliser l'effet de la concentration sur le temps de réduction décimale grâce l'application de deux modèles semi-log, dérivés de celui de Mafart et al. (2001) et ayant des paramètres de forme différents.

Par la suite, nous avons cherché à prédire le nombre de réductions logarithmiques qui seraient obtenues sur des temps longs (jusqu'à 7 jours). Pour cela, grâce au modèle secondaire le plus pertinent, nous avons calculé le temps de réduction décimale correspondant à chacune des concentrations de conservateurs testées. Puis nous avons appliqué deux modèles primaires d'inactivation, le modèle linéaire de Bigelow et le modèle non-linéaire IQ pour calculer le nombre de réductions décimales attendues à des temps longs (1-7 jours) pour chaque concentration. Nous avons alors comparé les valeurs de régressions prédites avec les valeurs réelles obtenues par dénombrements sur milieu gélosé, et nous avons constaté que le modèle IQ s'ajustait mieux que le modèle linéaire à nos données expérimentales, avec une différence moins marquée pour l'alcool benzylique. Le paramètre caractéristique du modèle IQ, le coefficient Q, donne une indication du niveau d'inhibition ou « quenching » du conservateur dans la matrice (Lambert and Johnston 2000). Ainsi, il s'avère que la chlorphénésine subit une perte d'efficacité non négligeable par « quenching » dans la matrice, ce qui n'est pas le cas de l'alcool benzylique.

Ainsi, cette étude permet de proposer une méthode automatisée et rapide par « HCS-CLSM », permettant d'évaluer et de prédire l'action antimicrobienne des conservateurs ainsi que leur comportement dans des formules cosmétiques émulsionnées.

II - Article 2

« Rapid assessment and prediction of preservative efficiency in cosmetic products using High Content Screening – Confocal Laser Scanning Microscopy »

Running title: Assessment and prediction of preservative efficiency by HCS-CLSM

Samia Almoughrabie^a, Chrise Ngari^b, Laurent Guillier^c, Romain Briandet^a, Valérie Poulet^b, and Florence Dubois-Brissonnet^{a#}

^aUniversité Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France

^bLaboratoires Clarins, 5 Rue Ampère, 95300 Pontoise, France

^cANSES, Agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Direction de l'évaluation des risques, 94700, Maisons-Alfort, France

1 - Abstract

Most cosmetic products are susceptible to microbiological spoilage due to contaminations during manufacturing or consumer use. Their composition must guarantee efficient bacterial inactivation all along with the product shelf life which is assessed by challenge-tests. These consist in inoculating specific bacteria, including *Staphylococcus aureus*, in the formula and in investigating the bacterial log reduction over time. The main limitation of this method is relative to the time-consuming protocol and the necessary delay for obtaining results (30 days). In this study, we proposed a rapid alternative method coupling High Content Screening - Confocal Laser Scanning Microscopy (HCS-CLSM), image analysis and modeling. It consists in acquiring real-time *S. aureus* inactivation kinetics on short-time periods (typically 4h) and in predicting the preservation efficiency of preservatives on longer scale periods (up to 7 days). The action of two preservatives, chlorphenesin and benzyl alcohol, against *S. aureus* was first characterized at several concentrations in a cosmetic matrix. From these datasets, we compared two secondary models to evaluate the logarithm reduction time (Dc) for each concentration of preservative. Furthermore, we predicted the log reductions for up to 7 days using two primary inactivation models and compared them to the observed log reductions. The IQ model better fits datasets and the Q value gives information about the matrix level of interference.

Keywords: bacterial inactivation; model; cosmetic matrix; preservative; fluorescence; CLSM.

2 - Introduction

Each year around the world, official authorities in Europe (Rapid Alert System for Non-Food Products) or USA (US Consumer Product Safety Commission) notified many recalls of cosmetic products due to microbiological contamination (SGS 2020; Lundov and Zachariae 2008; ANSM 2020). Cosmetic formulas are complex and are susceptible to microbiological spoilage due to their composition rich in water and nutrients such as lipids, polysaccharides, proteins...(Herrera 2004). They can be contaminated during their fabrication but also because of consumer's repetitive manipulation. The main pathogens frequently found in cosmetic formulas are *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter gergoviae*, and *Serratia marcescens* (Lundov *et al.* 2009; Hugbo *et al.* 2005; Lundov and Zachariae 2008; Halla *et al.* 2018). *S. aureus* has been found in various cosmetic products such as shaving cream, moisturizing cream, face care cream and depilatory cream (Birteksoz Tan *et al.* 2013; Tran *et al.* 1994; Campana *et al.* 2006). It is a Gram-positive bacteria present on human skin and mucous membranes in 30% of the population (Ryu *et al.* 2014). Many *S. aureus* strains produce exfoliative toxins secreted on the skin that cause a wide range of clinical infections, including abscesses, furuncles or impetigo (Findley and Grice ; Lowy 1998; Tong *et al.* 2015; Bukowski *et al.* 2010).

Each cosmetic product has a different level of microbiological risk according to the standard ISO 29621:2017, which depends on several parameters such as the formula composition (preservative, ethanol, a_w , pH) or the type of packaging (unidose, airless pump, pots) (Berthele *et al.* 2014). Preservatives that can be used in cosmetic products are listed in Annex V of the European Regulation No. 1223/2009. Among them are listed chlorphenesin and benzyl alcohol, which have been tested in this study. Chlorphenesin or 3-(4-chlorophenoxy)-1,2-propanediol is an antifungal and antibacterial agent (active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria). It can be used at a maximum concentration of 0.32% in rinse-off products and up to 0.30 % in leave-on products (Johnson *et al.* 2014). Benzyl alcohol can be used in various cosmetic formulations as a preservative, but also as a solvent, a fragrance or a viscosity controlling agent. Its maximum in-use concentration is 1% (Nair 2001).

The preservation efficiency of a given product is evaluated by proceeding to a challenge-test, as defined in the European standard EN ISO 11930:2019. During this procedure, specific microorganisms including *S. aureus*, are inoculated in the product at a final concentration between 1×10^5 and 1×10^6 CFU.ml⁻¹ for bacteria, and 1×10^4 and 1×10^5 CFU.ml⁻¹ for molds or yeast. After inoculation, the microbial population is evaluated at defined time intervals by enumerating the survivors at 7, 14 and 28 days. A preservative system is considered as efficient against bacteria if the formula composition leads to a bacterial logarithm reduction ≥ 3 seven days after inoculation and without the growth of bacteria after 14 and 28 days. Challenge-test, as described in the European standard involves numerous steps including sampling, neutralization, serial dilutions, bacterial plating in duplicate, incubation time and colony counting. The reliability of challenge-tests can depend on several parameters such as the manipulation errors (pipetting and serial dilutions) (Hedges 2002), the type of plating method (spiral or pour plating), the level of bacterial enumeration (Augustin and Carlier 2006), and on the ability of stressed microorganisms to recover and growth on agar plates (Stephens and Mackey 2003). It also relies on the efficiency of the neutralization step which consists of stopping the antimicrobial activity of preservatives by diluting the surviving population in a quenching solution (Johnston *et al.* 2002). Nevertheless, the main limitation of the challenge-test procedure is relative to the time-consuming protocol (inoculation, sampling, counting) and to the duration of the whole test (last sample analyzed on day 28).

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) allows *in-situ* 3-D visualization of microbial consortia thanks to various fluorescent markers. It is commonly used to investigate complex microbial spatial organizations such as biofilms (Bridier *et al.* 2010), to analyze interactions between bacteria and oil droplets (Dorobantu *et al.* 2004) to evaluate bacterial distribution in food systems (Doherty *et al.* 2010; Auty, Gardiner, *et al.* 2001; Jeanson *et al.* 2011). Moreover, CLSM was previously used to study the spatiotemporal action of biocide in biofilms (Davison *et al.* 2010; Bridier *et al.* 2010; Bridier *et al.* 2011; Karampoula *et al.* 2016; Takenaka *et al.* 2008). This method enables a real-time and *in situ* visualization of the bacterial inactivation kinetics after biocide addition. Typically, alive cells are stained with an esterase viability marker, such as cFDA or calcein-AM, and after subsequent biocide addition, the fluorescence is lost due to the leakage of the fluorescent marker out of the cell when the cell membrane is altered.

In this study, we used CLSM and image analysis for acquiring datasets of bacterial inactivation kinetics upon a very short period (4h) in model cosmetic matrices containing various concentrations of preservatives and intended to accurately predict the number of bacterial log reductions on longer periods similar to challenge-test times.

3 - Materials and Methods

3.1 - Chemicals and materials

Cetearyl glucoside and glyceryl stearate were purchased from SEPPIC (Puteaux, France), carbomer from Gattefossé (Lyon, France), glycerin from Oleon (Ertvelde, Belgium), cetearyl isononanoate from BASF France (Lyon, France), tocopheryl acetate from DSM (Heerlen, the Netherlands), tromethamine from Azelis (Heusden, Belgium), chlorphenesin and benzyl alcohol from Thor (Compiègne, France). Eugon LT 100 supplemented broth was purchased from Indicia production (Saint Genis l'Argentière, France).

3.2 - Bacterial strain and culture conditions

The strain used in this study is *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 recommended by the EN ISO 11930:2012 standard for cosmetic-product challenge tests. It was stored in cryovials at -80°C and resuscitated by two successive subcultures in tryptic soy broth (TSB, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) before each experiment. Cultures were grown at 30°C until the end of the exponential growth phase.

3.3 - Preparation and characterization of the emulsified model matrix

The aqueous phase was first prepared with 0.25% carbomer in water and heated to 75°C before glycerin (moisturizer, 9%) was added. The oil phase is composed of 28.8% cetearyl isononanoate (emollient), 3.5% cetearyl glucoside (emulsifier), 0.2% tocopheryl acetate (antioxidant), and 2.5% glyceryl stearate (co-emulsifier). It was heated to 75-80°C before it was blended with the aqueous phase (20/80 o/w %) at 1,800 rpm using a rotor-stator homogenizer (Rayneri 33/300P, Group VMI) to obtain an emulsion. Benzyl alcohol and chlorphenesin at 7 different concentrations (respectively from 1.00 to 1.85 % and from 0.30 to 0.60 %) were respectively pre-mixed with glycerin or water at 40°C. Tromethamine (base, 0.15%) was finally added. The viscosity is measured using a penetrometer (PNR10, PetroMesures). A specific cone was released in 300 g of matrix

and the penetration depth measured (in mm \pm 0.1 mm) after 5 s. The penetrometry measured on each batch in triplicate is 33.06 mm \pm 1.33 mm. The pH, measured using pH-meter (SI Analytics, Lab 870) on each batch in triplicate, is 5.76 \pm 0.03.

3.4 - Bacterial staining and matrix inoculation

Bacterial cells were harvested by centrifugation at 1,575 *g* for 10 min and washed twice in 150 mM NaCl. The bacterial suspension was calibrated to 1×10^{10} to 1×10^{11} CFU.ml⁻¹ in 150 mM NaCl to observe at least 10-100 bacteria per CLSM image (290.6 x 290.6 x 1.6 μm^3). 300 μl of bacterial suspension were labeled with 13 μl calcein-AM (53.55 μM in DMSO, Invitrogen by Thermofisher Scientific), incubated in the dark for 1h30 at 37°C and inoculated in 30 g of model cosmetic matrix which was vortexed for 30 s. The average of the bacterial concentration in the matrix is 1×10^8 to 1×10^9 bacteria/g. Calcein-AM is a viability marker that penetrates passively into a cell where it is cleaved by cytoplasmic esterases and leads to green fluorescence. Each experiment was performed respectively two or three times from independent cultures for benzyl alcohol and chlorphenesin.

3.5 - Enumeration of the bacterial population by drop-plate method

For each enumeration, 1 g of inoculated matrix was dispersed in 9 ml of neutralization solution (Eugon LT 100 supplemented broth). After 30 minutes, the bacterial population is enumerated by serial dilution in 150 mM NaCl on tryptone soya agar (TSA, Biomérieux) using the drop-plate method (Chen *et al.* 2003). Plates were incubated at 30°C for 24 to 48 h before counting. Bacterial enumeration is processed every twenty minutes for four hours after inoculation and then at least once every day until seven days. Each enumeration was performed at least in duplicate.

3.6 - Acquisition of bacterial inactivation curves by High Content Screening - Confocal Laser Scanning Microscopy (HCS-CLSM)

The evolution of bacterial population was acquired upon a short time (typically 4h) for 7 different concentrations in duplicate for benzyl alcohol and in triplicate for chlorphenesin. To obtain one inactivation curve, the inoculated matrix containing a specific concentration of a preservative was dropped into several wells of polystyrene 96-well microtiter plates (Greiner Bio-One, France) and CLSM acquisition was achieved in each well at a specific time to avoid photobleaching. Thanks to the HCS- CLSM, the

stage was programmed to move automatically to the next well every 15 min during 4h or every hour during 13h for low concentrations.

Image acquisition was performed using a Leica SP8 AOBS Confocal Laser Scanning Microscope (Leica Microsystems, France) at the MIMA2 imaging platform (<https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12>). Calcein-AM is excited at 488 nm and the emitted fluorescence collected in the range 498 to 560 nm. Images size were $290.6 \times 290.6 \times 1.6 \mu\text{m}^3$ (512 x 512 pixels) and were acquired at 600 Hz using a 40x air objective (N.A. = 0.85) and a hybrid detector. The HCS-CLSM control software was programmed to take a mosaic of 10 x 10 images per well, corresponding to a volume of 1.3×10^{-5} ml. The number of bacteria by mosaic was counted by binarizing each image using the MaxEntropy algorithm in an automatic macro executed in ImageJ software (National Institutes of Health, USA) (Schneider *et al.* 2012). The obtained number of bacteria per ml was converted per g according to the matrix density (1.15 g/ml). In our experimental conditions, we consider that our threshold value is at 1 bacteria per image or 100 bacteria per mosaic, which corresponds to 6×10^6 bacteria/g.

3.7 - Primary models for bacterial inactivation

Two different models were used to describe the inactivation of the bacterial population as a function of time. The log-linear model of Bigelow *et al.* (Bigelow and Esty 1920) is described in equation (1).

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) - \frac{t}{Dc} \quad (\text{eq.1})$$

where N_0 is the initial bacterial population, N is the bacterial population at the sampling time, Dc is the decimal reduction time and t is the time (min).

The intrinsic quenching model (Lambert and Johnston 2000) was constructed with the hypothesis that the disinfection concentration decreases during the test period and can be described by the equation (2).

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) - \frac{(1-e^{-Q.t})}{Q.Dc} \quad (\text{eq.2})$$

where N_0 is the initial bacterial population, N is the bacterial population at the sampling time, Dc is the decimal reduction time, t is the time (min) and Q is the quenching coefficient. Q was the estimated parameter.

Both log-linear and IQ models were used to predict the reduction of the bacterial population on longer periods (up to 7 days).

3.8 - Secondary model for estimation of the Dc-value according to the concentration

We fitted the log-linear model fitted to each CLSM inactivation curve, with GinaFiT, a freeware add-in for Microsoft Excel (Geeraerd *et al.* 2005), and we obtained the corresponding Dc values. We applied a factor of correction to Dc according to the correlation between CLSM enumeration and plate enumeration. We obtained a dataset of Dc, each of them corresponding to a specific concentration of one preservative.

From these datasets of Dc, the Dc values were fitted according to concentration using a semi-log approach, derived from Mafart *et al.* (2001) (Mafart *et al.* 2001), and expressed in equation 3.

$$\log_{10}(Dc) = \log_{10}(Dc^*) - \left(\frac{C-C^*}{z_c}\right)^n \quad (\text{eq. 3})$$

where Dc is the decimal reduction time for the concentration C , Dc^* is the decimal reduction time for the reference concentration C^* , z_c is the increase of concentration which leads to a ten-fold reduction of the decimal reduction, n is a shape parameter which can be set to 1 (model #1, linear model) or 2 (model #2, second-degree model). Dc^* and z_c were the estimated parameters.

The model parameters were fitted with nls R function according to the minimization of the residual sum of square errors (RRS). Confidence intervals of fitted parameters were assessed by bootstrap using nlsBoot function from nlsMicrobio R package (Baty *et al.* 2015). The two models were compared according to the Bayesian information criterion (BIC) (equation 4). The lower the BIC, the better the model fits the dataset.

$$BIC = p \cdot \ln\left(\frac{RSS}{p}\right) + k \cdot \ln(p) \quad (\text{eq. 4})$$

Where p is the number of experimental points and k the number of parameters of the model.

3.9 - Prediction of the log-reduction of the bacterial population over a period of several days

To predict the log reduction of the bacterial population over several days, we first predict Dc with model #2 at some tested concentrations of preservative. Afterward, thanks to primary models, namely log-linear model (eq 1) or IQ model (eq 2), we calculated the logarithm reduction of the population that should be obtained after a defined time, from 1 to 7 days. To optimize and validate the model, a dataset of log-reductions of the bacterial population was acquired by plate enumeration on the

corresponding periods (1 to 7 days) for 7 concentrations of each preservative, as described before.

The model parameters were fitted with nls R function according to the minimization of the residual sum of square errors (RRS). Confidence intervals of fitted parameters were assessed by bootstrap using nlsBoot function from nlsMicrobio R package (Baty *et al.* 2015).

4 - Results

4.1 - Correlation between enumeration by CLSM and plate counting

Model cosmetic matrices were formulated with different concentrations of chlorphenesin or benzyl alcohol. Bacterial enumeration of *S. aureus* was achieved at several contact times (between 10 min and 4h) by both plate counting (log CFU/g) and CLSM enumeration (log bacteria/g). Figure 25 gives the relationship between both techniques. The relationship between both techniques is linear ($y = 1.530x - 5.342$; $R^2 = 0.907$) for a level of population over the detection threshold of the technique (6×10^6 bacteria/g).

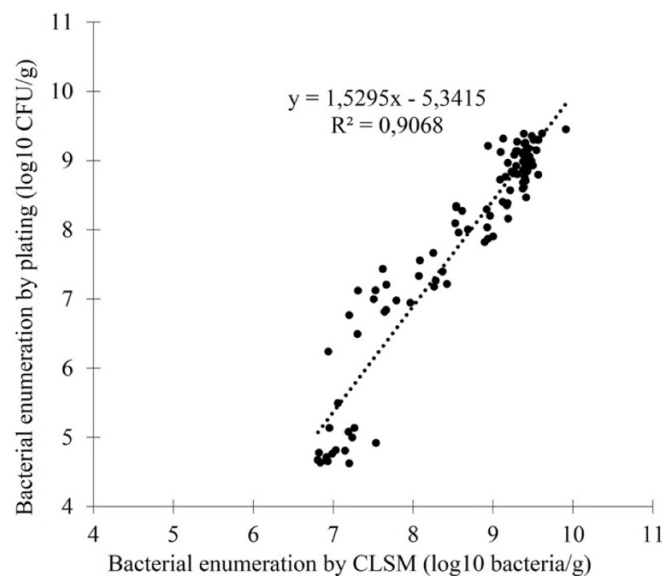


Figure 25 : Correlation between bacterial enumeration by plating (log10 CFU/g) and bacterial enumeration by CLSM imaging (log10 bacteria/g).

4.2 - Inactivation of *S. aureus* according to the concentration of the preservative

Figure 26 shows the kinetics of bacterial reduction obtained by CLSM during four hours for seven different concentrations of chlorphenesin (Figure 26A) or benzyl alcohol

(Figure 26B). According to the correlation between enumeration by CLSM and plate counting (Figure 25), we only took into account data in the range of population above 6×10^6 (maximum 2.5 log₁₀ reductions).

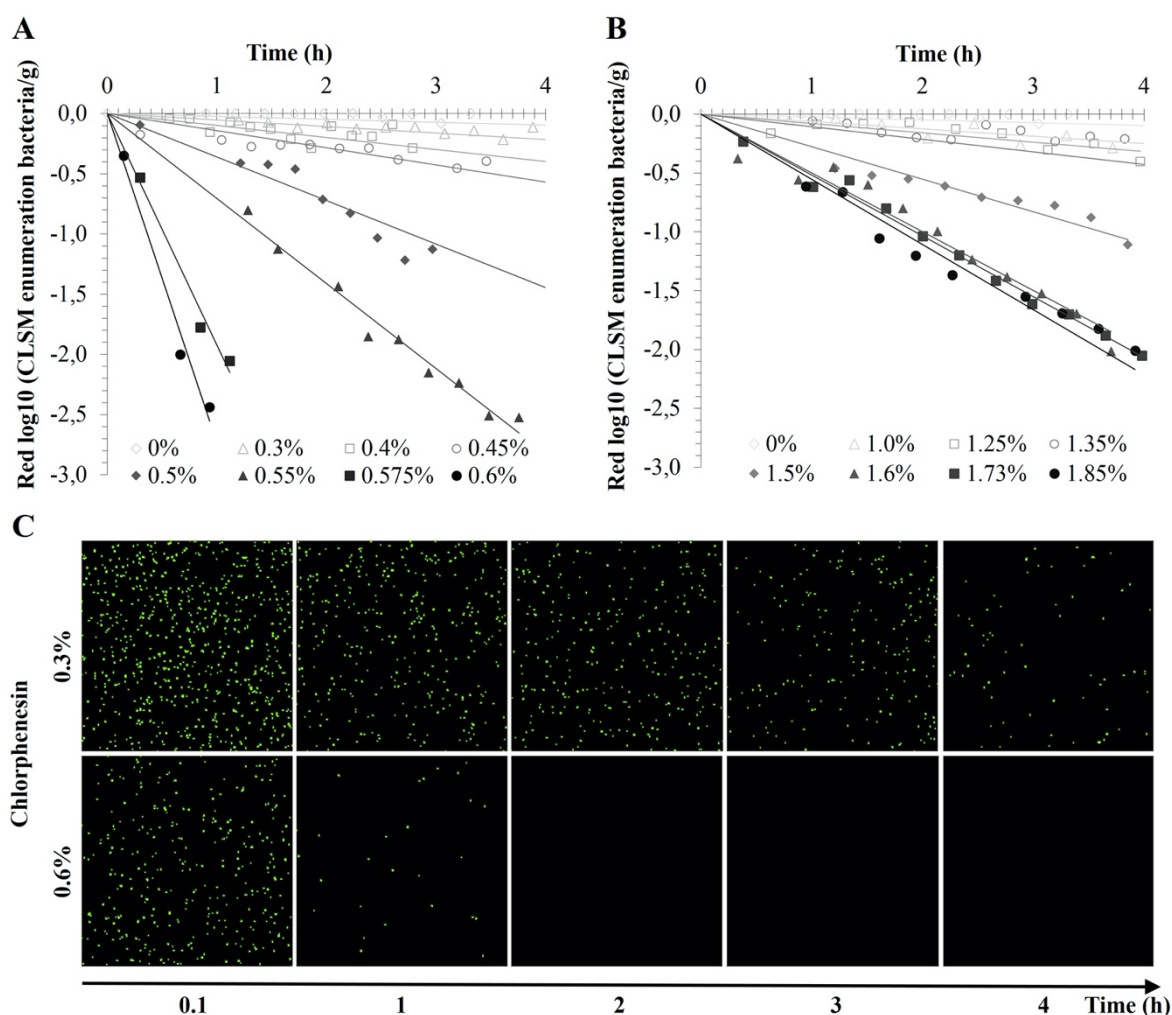


Figure 26 : *S. aureus* inactivation kinetics obtained by HCS-CLSM in cosmetic model matrices with several concentrations of chlorphenesin (A) and benzyl alcohol (B). Example of the loss of bacterial fluorescence assessed by HCS-CLSM over time for two concentrations of chlorphenesin (C).

The higher the concentration of preservative, the higher the slope of inactivation and the lower the D_c. For chlorphenesin, 0.3% is the smallest concentration for which D_c is measurable (17.89 h ± 1.12) on a CLSM kinetics (maximum 17h). For the range between 0.40 and 0.50%, D_c varies between 10.05 h ± 0.44 and 3.55 h ± 1.04. For the range between 0.55 to 0.60%, D_c varies between 1.48 h ± 0.10 and 0.45 h ± 0.07. For benzyl alcohol, D_c for the smallest concentration 1% is 28.09 h ± 7.50. From 1.5% D_c increasingly decreases to reach 1.07 h ± 0.05 at 1.85 %.

To obtain similar log reductions of *S. aureus* with both preservatives, it can be noted that higher concentrations of benzyl alcohol are needed in comparison to chlorphenesin. For example, we obtained one log reduction in $0.45 \text{ h} \pm 0.07$ with 0.6% chlorphenesin whereas $1.07 \text{ h} \pm 0.05$ is necessary with 1.85% benzyl alcohol. Figure 26C illustrates the fluorescence loss of *S. aureus* in a model matrix with 0.3% and 0.6% chlorphenesin over time. With 0.3% chlorphenesin, the number of fluorescent bacteria decreases very slowly over time. At 4 h, the slight decrease of fluorescent bacteria number corresponds to a bacterial reduction of about 0.2 log bacteria/g (Figure 26A). In contrast, with 0.6% chlorphenesin, the fluorescent bacteria number decreased rapidly in 1h and it corresponds to about 5×10^2 bacteria/g (Figure 26A). After 2h, no bacteria was visible anymore.

4.3 - Estimation of Dc value according to the preservative concentration

Semi-log models were used to fit datasets of Dc values upon the preservative concentration. The shape parameter was set at 1 in model #1 (linear-model, Figure 27 A and C) or model#2 (second-degree model, Figure 27 B and D).

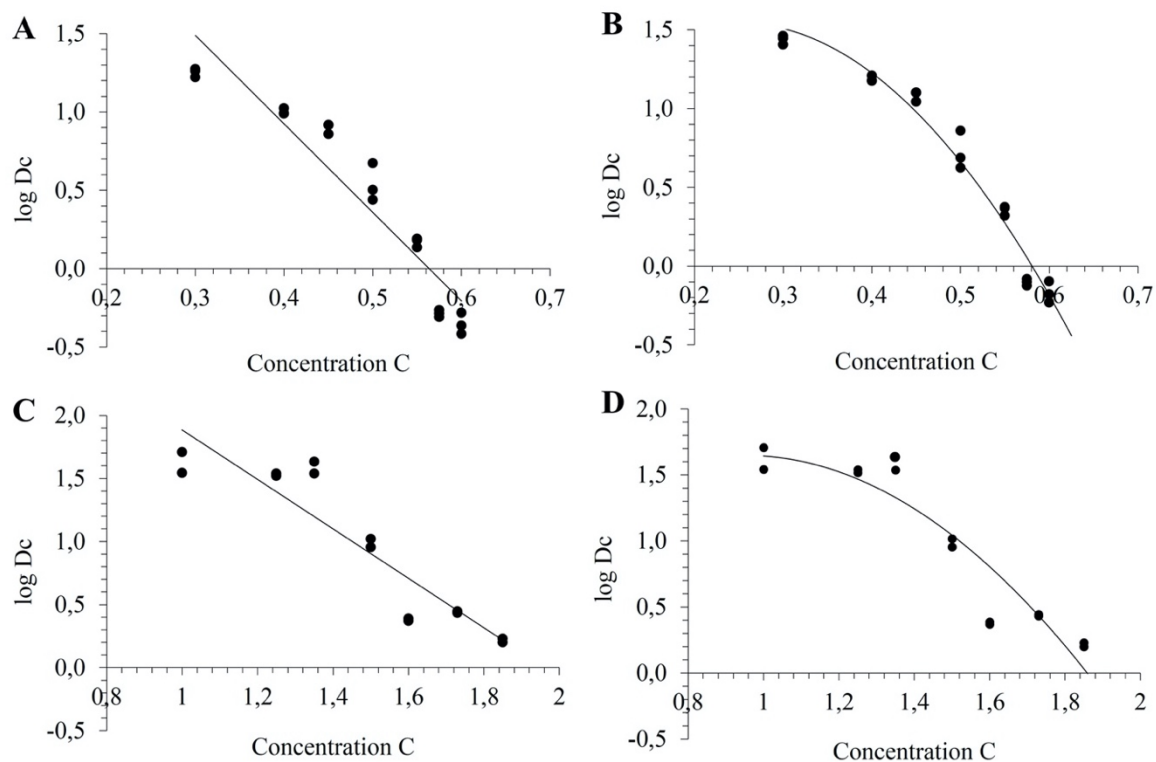


Figure 27 : Relation between the Dc value and the concentration of chlorphenesin (A, B) and benzyl alcohol (C, D) by fitting of model#1 (A and C) and model#2 (B and D).

Model parameters of the two models, which are Dc^* and z_c , are given in Tableau 9 together with the BICs for both preservatives. Second-degree model allows the lowest BIC for both preservatives, meaning that the shape parameter is significant.

Accordingly, to the BIC, model #1 does not fit well and was not used for the following prediction.

Tableau 9 : Estimated parameters (and their 95% CI intervals) and performance criteria of both secondary models.

| | Chlorphenesin | | Benzyl alcohol | |
|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | model#1 | model#2 | model#1 | model#2 |
| n | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Number of data | 21 | 21 | 14 | 14 |
| C* | 0.25 | 0.25 | 0.95 | 0.95 |
| log (Dc*) | 1.96 [1.76-2.16] | 1.54 [1.47 – 1.62] | 1.98 [1.70 – 2.22] | 1.65 [1.44 – 1.78] |
| z_c | 0.18 [0.15-0.21] | 0.27 [0.26 – 0.28] | 0.51 [0.41 – 0.65] | 0.71 [0.64 – 0.79] |
| RSS | 0.76 | 0.20 | 0.72 | 0.60 |
| BIC | -63.49 | -91.48 | -36.22 | -38.86 |

4.4 - Prediction of bacterial log reduction on long periods

Dc values at specific concentrations were first estimated from model #2. The logarithm reduction of the bacterial population was then calculated for specific times (from 1 to 7 days) using the Bigelow linear-model (eq. 1) or the IQ model (eq. 2).

Figure 28 presents the relationships between predicted and experimental bacterial reductions.

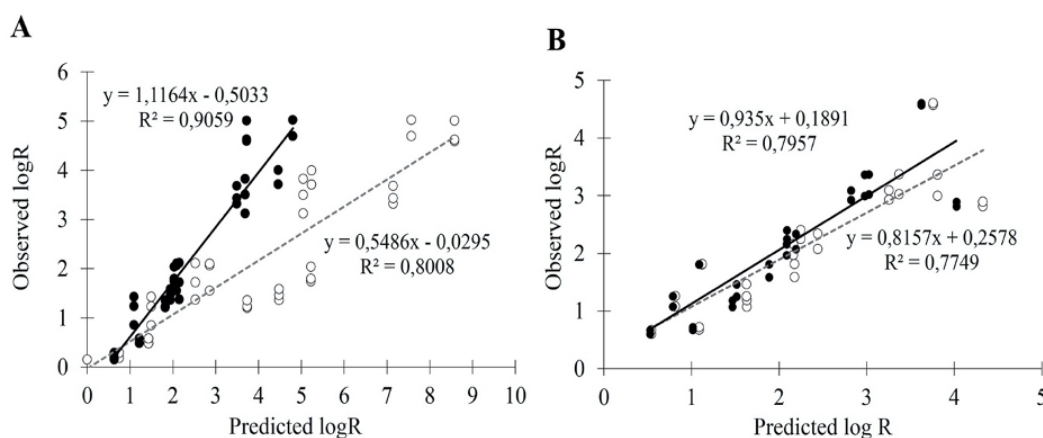


Figure 28 : Correlation between the observed bacterial log-reductions and the predicted ones using Bigelow linear-model (white dots) or IQ model (black dots) for chlorphenesin (A) and benzyl alcohol (B).

For both preservatives, the best combination is obtained when using IQ model for log-reduction estimation. For chlorphenesin (Figure 28A), the IQ model prediction for log-reduction datasets is far better than the linear model. The Q coefficient is optimized at 0.0141 (CI 95% 0.0124 – 0.0156) and the slope of regression curve is 1.12 (R²=0.906). Linear models is less relevant with a slope around 0.55 and lower R². For benzyl alcohol (Figure 28B), predictions with both models are less different. The Q coefficient is optimized at 0.0043 (CI 95% 0.0022 – 0.0076) and the slope of the regression curve with the IQ model is 0.93 (R²=0.796). One could note that the prediction is relevant only for maximum 5 log-reductions because of the initial level of contamination and the experimental protocol used to obtain the observed datasets. Figure 29 shows the prediction of the evolution of bacterial enumerations over seven days for 4 tested concentrations of chlorphenesin (Figure 29A) or benzyl alcohol (Figure 29B) with Bigelow linear-model (dotted lines) or IQ model (plain lines). These curves could be generated for any concentrations in the range of 0.3 to 0.6 % of chlorphenesin and 1 to 1.9 % for alcohol benzyl from model #2 and IQ model with respective Q to 0.014 for chlorphenesin and 0.003 for benzyl alcohol.

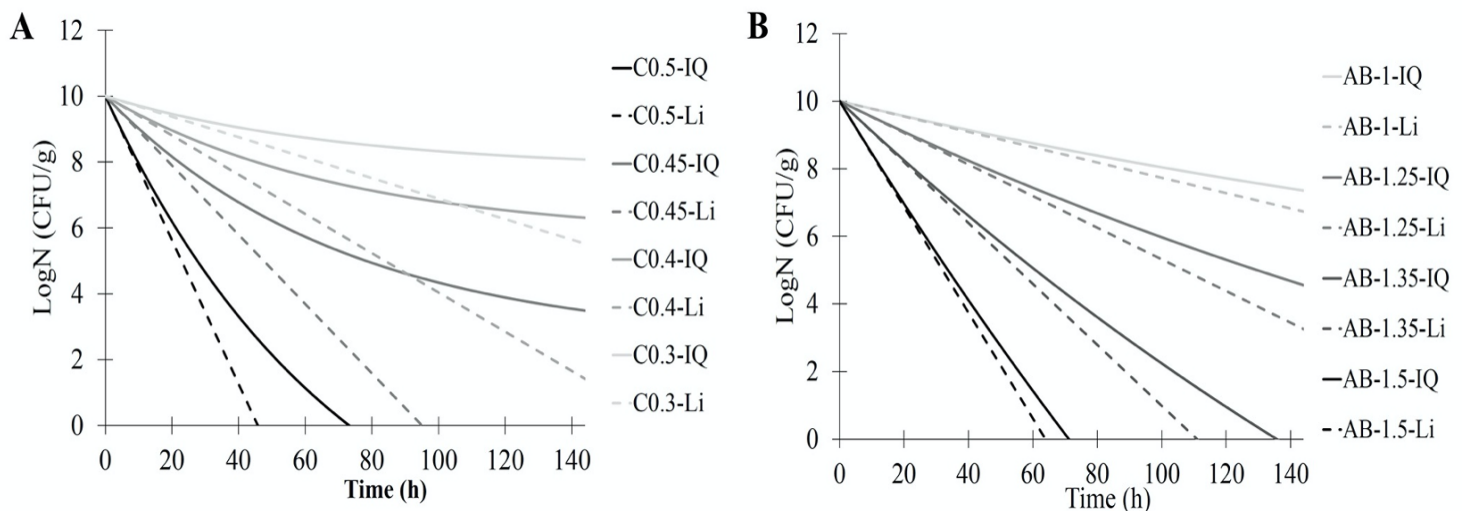


Figure 29 : Illustration of the possible prediction of the evolution of the bacterial population over seven days for four concentrations of chlorphenesin (A) or benzyl alcohol (B) with Bigelow linear-model (dotted lines) or IQ model (plain lines).

5 - Discussion

Challenge-tests are necessary to assess the efficiency of preservation in cosmetic products. Nevertheless, the procedure of the challenge-test is time-consuming due to the numerous enumerations by plate-counting necessary and to the results that are available only 48h after the last assessment point (day 28). By consequence, the challenge-test method lacks reactivity and flexibility for optimizing the preservation of

a formula. In this study, we propose a new alternative method allowing the prediction of the log reduction of a bacterial population in long-term preservation by acquiring data on a short-time period. This method relies on the acquisition of CLSM kinetics of bacterial inactivation in the presence of several concentrations of preservatives during 4h (and till 13h for very low concentrations). Bacteria are first stained with a viability fluorescent marker, calcein-AM. This marker is widely used to assess bacterial viability by CLSM or by flow cytometry (Chitarra *et al.* 2006; Davison *et al.* 2010). Its precursor diffuses passively into the cytoplasm, where it is cleaved by intracellular esterases into green-fluorescent calcein (Kaneshiro *et al.* 1993). This non-permeant fluorescent dye is released out of the cell when the membrane is altered (dead cell).

We have first shown that the enumeration obtained by CSLM and dedicated image analysis can be correlated to bacterial plate-counting during the action (10 min to 4h) of the preservative (chlorphenesin or benzyl alcohol at specific concentrations). Our detection threshold by CLSM imaging is 6×10^6 bacteria/g which is lower than the one obtained by CLSM by Auty *et al.* (Auty, Gardiner, *et al.* 2001) (1×10^8 bacteria/ml). This is probably because we increased the observed surface to a mosaic of 100 CLSM images. Here, bacterial CLSM enumeration is always higher (between 0.5 and 1 log) than the enumeration by plate counting. Auty *et al.* (Auty, Gardiner, *et al.* 2001) also compared enumeration by CLSM and plate counting before they assess the viability of human probiotic strains in dairy products. They used Live/Dead BacLight marker and also underlined an overestimation of the CLSM enumeration of about 1 log. They suggested that this might be due to the bacterial clumping on plates. Indeed, the accuracy of enumeration by plate counting is usually estimated in the range of 0.3 to 0.7 log (Augustin and Carlier 2006; Afssa 2007). However, we can notice that the difference between both techniques gets higher when enumeration decreases. Lower enumerations correspond to populations that remain after action of the preservative. The stressed bacteria thus probably constitute a higher fraction of the population. They could not have the ability to recover and growth on agar plates while they are still stained by the viability marker by CLSM (Stephens and Mackey 2003).

We used CLSM enumeration technique to follow the action of two preservatives at different concentrations in model cosmetic matrices. The bacterial inactivation kinetics was assessed by acquiring the calcein-AM loss of fluorescence for the order of a few hours. These acquisitions were only possible thanks to the HCS-module of the CLSM. The automated high content screening (HCS) system is an emerging software solution

that allows a CLSM to acquire automatically high content images for analysis of numerous samples thanks to an automatically xyz-positioning in multiple wells as a function of time (Canette *et al.* 2019). Automatic movements from well to well allows to acquire images of one same sample over time using several wells which allows to lighten a specific well only once. This is a real advantage to avoid photobleaching. Moreover, we can also investigate several preservative concentrations on the same lapse of time.

The CLSM method used during this study is very well suited to evaluate the efficiency of preservatives that cause membrane permeabilization. Chlorphenesin is a phenol ether with a chlorine atom and it belongs to the class of organo-halogen organic compounds. Phenols disrupt the cytoplasmic membrane and induce leakage of potassium ions of the cytosol and the halogenation is known to improve their antibacterial activity (Al-Adham *et al.* 2013). Benzyl alcohol is an organic aromatic alcohol. Alcohols are known to damage cell membranes and denature bacterial proteins that are essential to the metabolism cell which leads to the cell lysis (Al-Adham *et al.* 2013).

Chlorphenesin seems to be more effective than benzyl alcohol against *S. aureus* in the model cosmetic matrix. We observed that obtaining the same logarithm reduction needed lower concentrations of chlorphenesin than benzyl alcohol. According to the literature, the partition coefficient (logP) can be a parameter influencing bacterial inactivation (Pernin *et al.* 2018). The higher the logP, the higher the antibacterial activity. Chlorphenesin could have a better ability than benzyl alcohol to intercalate into the bacterial membrane of *S. aureus* because its logP is higher (1.713) than the one of benzyl alcohol (1.100) (The Good Scents Compagny information system ; The Good Scents Compagny information system).

In this study, we were able to predict the number of log reductions at any time for one preservative at any concentration in a specific range from inactivation datasets obtained over short-term times. We fitted the datasets with two models describing the effect of the concentration on the log reduction time. These models derived from Mafart models (Mafart *et al.* 2001) can take several forms by setting the shape parameter at 1 (linear model#1) or 2 (second-degree model#2). Mafart *et al.* (2001) compared these two first semi-log models for describing the effect of pH on the heat resistance of spores (reduction time D_T) and showed that second-degree model presents a better safety than the linear one. From our side, we used the BIC calculation

for choosing the most relevant model while adjusting the minimum number of parameters. BICs of model#2 are better than model#1 for both chlorphenesin and benzyl alcohol (Tableau 9). The linear model is thus discarded for the following prediction. This indicates that the preservative concentration and the contact time do not have a similar impact on the reduction time. As noticed by Mafart *et al.* (2001) for the effect of pH on the resistance of spores, we can hypothesize that the relationship between D_c and the preservative concentration is more complex than that of the effect of temperature on heat resistance. We have also tried log-log Chick-Watson and Hom models used by Lambert *et al.* (2001) to model the relationship between effective time and concentration of quaternary ammonium compounds (data not shown). These models badly fitted to our datasets and were not selected for the following predictions.

The next step was to predict, from the D_c values calculated with model#2, the log reduction of the bacterial population on longer times (up to seven days) using two primary models, the Bigelow linear model and the IQ model. The Q coefficient is the characteristic parameter of the IQ model. It indicates the level of quenching of the preservative in the matrix (Lambert et al 2000). Below 0.005, which appears to be the case of benzyl alcohol, the level of quenching is very low and the inactivation curves are quite similar to linear log-survivor curves. On the contrary, the Q coefficient for chlorphenesin is 0.014 which indicates a quenching of the preservative in the matrix. The level of quenching increases over time as it is demonstrated by the comparison between the predictions of linear-model and IQ models (Figure 29). As it is not similar for both preservatives, we can hypothesize that it is influenced by the interactions between the antimicrobial and the matrix. As the model cosmetic matrix used here is an emulsion, we can hypothesize that chlorphenesin which has a higher log P (1.713) than benzyl alcohol (1.100) could progressively partition into the hydrophobic droplets, thus losing its preservative efficiency. Pernin *et al.* (2019) studied the antimicrobial activity of two natural phenolic compounds, ferulic acid and eugenol, against *Listeria monocytogenes* in a model oil-in-water emulsion. They showed that eugenol, which have the highest logP, loses its antibacterial efficacy in emulsified systems, in contrast of ferulic acid. The authors suggest that once in the emulsion, the more hydrophobic antimicrobial agent would preferentially partition in the lipid droplets and thus being in too small concentration in the aqueous phase for inhibiting microorganisms (Pernin, Bosc, *et al.* 2019). Polarity, antimicrobial charge, and environmental conditions such as temperature, ionic strength, and pH can also play a major role in the effectiveness of

an antimicrobial (Weiss *et al.* 2015). Electrostatic and hydrophobic interactions between antimicrobials and the matrix constituents, such as lipids, proteins and charged polysaccharides, could interfere with the antimicrobial activity (Weiss *et al.* 2015). For example, the addition of bovine meat proteins decreases the antimicrobial activity of phenolic compounds (Bouarab-Chibane, Forquet, *et al.* 2018; Juven *et al.* 1994). Some gelling agents, such as hydroxypropylmethylcellulose, may be associated with the loss of effectiveness of preservatives (Scholtyssek 2005). Emulsifiers can also participate in the reduction of antimicrobial activity by sequestering antimicrobial molecules in micelles (Kirk–Othmer 2013; Pernin, Bosc, *et al.* 2019; Shimamoto and Mima 1979).

Nevertheless, from the estimations of D_c with model#2 and then of the log-survivors from IQ model, we propose here a method of prediction of the efficiency of two preservatives. The log-reduction of *S. aureus* population could be estimated at any concentration and after any time in a period of a few days for both tested preservatives.

This prediction is matrix- and preservative- dependent because the Q is characteristic of the interactions between them. This method should be challenged for many other couples of preservatives and matrices before it can be used for industrial prediction purposes. Moreover, some other microorganisms should be tested besides *S. aureus*, notably environmental strains isolated from contaminated cosmetic products. Indeed, some strains could have efflux pumps that release the fluorescence outside the alive bacteria and prevent cell visualization (Joux and Lebaron 2000). To limit these pump interferences, it was suggested to add sodium azide in the staining solution (Joux and Lebaron 2000) as used for the observation of biofilms (Bridier *et al.* 2011). Unfortunately, we cannot add this molecule in cosmetic matrices because it could modify the structure and composition of the formula. However, other impermeant fluorescent dyes should be evaluated.

6 - Conclusions

We propose here a rapid HCS-CLSM method associated with modeling to predict the preservative efficacy in a cosmetic matrix. This method could provide a quick evaluation of preservative efficiency and save a lot of time by replacing many microbiological analyses. It could be beneficially used for screening preservatives or for optimizing the formulation of a cosmetic product.

Acknowledgments

We thank Elena Exposito-Garcia and Aurélie Trainoy (Laboratoires CLARINS) for their expertise in cosmetic formulation, Julien Deschamps (INRAE, Micalis Institute) for his support in the HCS-CLSM analyses and Roza Mohammedi (INRAE, Micalis Institute) for her technical assistance during her internship.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: SA FDB CN VP. Performed the experiments: SA. Analyzed the data and performed the modeling: SA LG FDB. Contributed reagents/materials: CN VP. Wrote or revise the manuscript: SA FDB RB CN.

Discussion générale et perspectives

Une évaluation du système de conservation est systématiquement réalisée avant la mise sur le marché d'un produit cosmétique grâce au challenge-test. Comme dit précédemment, les challenge-tests présentent certaines limites notamment du fait de la lourdeur des expérimentations et du délai d'obtention des résultats d'environ 1 mois. De plus, la fiabilité de ces tests peut dépendre de différents facteurs notamment de la galénique des produits et des nombreuses étapes dues aux dénombrements des microorganismes sur milieux gélosés. C'est dans ce contexte que nous avons pu définir l'objectif général de cette thèse qui est de mieux comprendre, d'évaluer, de prévoir et d'optimiser le fonctionnement des systèmes conservateurs au sein de matrices cosmétiques avec deux volets, le premier, visant à comprendre les déterminants de la répartition des microorganismes dans les formules cosmétiques et leur impact sur les Challenge-tests, et le deuxième, visant à mettre au point une méthode rapide d'évaluation et de prévision de l'activité antibactérienne des conservateurs dans les formules cosmétiques.

Le premier objectif de cette thèse a été d'identifier les déterminants de la distribution spatiale des microorganismes dans les matrices cosmétiques émulsionnées de forme huile dans eau (h/e). Il est en effet indispensable de s'assurer que la répartition des bactéries est bien homogène dans la matrice pour que les résultats de challenge-test soient fiables. Pour initier l'identification des déterminants de la distribution spatiale des bactéries dans les matrices cosmétiques, nous avons tout d'abord testé la distribution spatiale de *Staphylococcus aureus* dans diverses formules cosmétiques commerciales de natures variées, en utilisant la microscopie confocale à balayage laser (MCBL) associée à l'utilisation de marqueurs fluorescents. Nous avons ainsi identifié certaines formules ne permettant pas une distribution homogène des bactéries. Par analyse de la composition des formules et grâce à la fabrication de matrices modèles de composition ajustable, nous avons pu préciser le rôle de la matrice (composition et structure) et des propriétés de surface des bactéries dans la distribution spatiale des bactéries en mettant en évidence deux facteurs clés : la viscosité des matrices et l'hydrophobicité de surface des bactéries. Plus la viscosité augmente et/ou plus l'hydrophobicité de surface bactérienne augmente, plus la distribution spatiale est hétérogène.

Le deuxième objectif de cette thèse a été de mettre en place une méthode permettant d'évaluer et de prédire l'efficacité des conservateurs dans les formules cosmétiques, ce que nous avons pu faire en combinant l'acquisition de cinétiques d'inactivation bactérienne par microscopie confocale à balayage laser et l'utilisation de modèles de microbiologie prévisionnelle. La perte de viabilité a pu être suivie grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité, la calcéine-AM, dont la fluorescence est libérée dans la cellule par les estérases puis relarguée à l'extérieur après perméabilisation de la membrane par l'agent antimicrobien. Il est intéressant de souligner qu'il est courant dans ce genre d'analyse de faire face à des problèmes de photostabilité des fluorochromes. En effet, chaque molécule fluorescente peut être excitée un nombre de fois précis avant sa dégradation; par exemple, la fluorescéine peut subir environ 10^4 à 10^5 excitations, sachant qu'en moyenne le passage du laser sur l'échantillon pour former un pixel d'une image induit quelques centaines d'excitations (Brown and Poujol 2006). Afin de pallier ce problème, nous avons utilisé un module appelé HCS (High Content Screening) ou criblage à haut débit (CHD) associé à la MCBL, ce qui a permis le déplacement automatique de la platine de puits en puits d'une plaque 96 puits (Canette *et al.* 2019). Ce module permet ainsi l'acquisition de centaines d'images dans plusieurs puits différents et à des intervalles de temps personnalisés limitant ainsi le phénomène de photobleaching. Grâce aux traitements et à l'analyse d'images automatisés par une macro-instruction créée sous « ImageJ », cette approche de microscopie nous a permis d'acquérir des cinétiques d'inactivation bactériennes sur des durées courtes de 4 à 17h, dans des matrices cosmétiques modèles formulées avec différents types de conservateurs à différentes concentrations. Nous avons tout d'abord démontré qu'il était possible par cette méthode « HCS-CLSM », de dénombrer les bactéries directement dans une formule. À partir des données de cinétiques obtenues et l'utilisation de modèles mathématiques d'inactivation bactérienne primaire et secondaire, nous avons pu observer la réduction logarithmique au cours du temps et modéliser l'effet de la concentration des conservateurs sur le temps de réduction décimale. Nous avons ensuite pu obtenir la prévision, à partir de ces données obtenues sur un temps court, de l'action antimicrobienne des conservateurs sur des temps plus longs, équivalents à ceux testés lors des challenge-tests. De plus, grâce à l'utilisation du modèle IQ, nous avons pu mettre en évidence un phénomène de « quenching » de la chlorphénésine mais pas de l'alcool benzylique dans la matrice cosmétique. Cette inhibition peut résulter d'interactions entre le conservateur et diverses autres matières premières présentes dans la matrice (**Chapitre I-IV-2**).

Plusieurs perspectives s'ouvrent suite à ce travail et de nouvelles questions peuvent se poser :

La méthode Mosaic-MCLB serait-elle utile à l'optimisation d'un nouveau protocole de mélange des bactéries dans les matrices cosmétiques de forte viscosité ?

La méthode de caractérisation de la distribution spatiale que nous avons utilisée dans cette étude est une méthode rapide permettant de classer les matrices cosmétiques selon le niveau d'homogénéité du mélange bactéries-matrice obtenu suite au protocole d'inoculation. Actuellement, la norme NF EN ISO11930 explicitant le protocole à effectuer pour les challenge-tests stipule de « bien mélanger de façon à obtenir une répartition homogène de l'inoculum » mais il ne décrit ni les conditions de mélange (type d'homogénéisateur, vitesse, temps d'homogénéisation) ni la méthodologie permettant de vérifier l'homogénéité de la répartition des microorganismes dans la formule. Pour les formules cosmétiques les plus visqueuses, cette étape cruciale peut interférer avec la bonne réalisation des tests d'évaluation de la protection antimicrobienne. Il serait alors intéressant de mettre en place des moyens plus efficaces de mélange des bactéries dans les matrices cosmétiques les plus visqueuses. On pourrait par exemple utiliser un homogénéisateur de paillasse muni d'un embout avec des pales à usage unique. Il est à noter que les systèmes d'agitation ne doivent pas être trop violents car la structure émulsionnée doit être préservée. La méthode proposée ici pourrait permettre de tester rapidement de nouveaux protocoles.

La charge bactérienne a-t-elle un impact sur la distribution spatiale des bactéries dans les matrices cosmétiques de forte viscosité ?

Du fait des caractéristiques des souches avec lesquelles nous avons travaillé, nous n'avons pas pu évaluer l'impact de la charge des bactéries sur leur distribution spatiale. L'étude mériterait donc d'être poursuivie par l'étude de ce facteur car d'autres études ont montré que la charge pouvait jouer un rôle, notamment lorsque l'émulsifiant utilisé a une charge opposée à celle de la surface des bactéries (Li et al. 2001; Ly, Naitali-Bouchez, et al. 2006; Ly et al. 2008). Il serait alors intéressant de faire varier la charge des conservateurs et des émulsifiants en analysant la répartition de microorganismes ayant des charges différentes afin de comprendre les interactions possibles et d'identifier celles qui peuvent être néfastes à la fiabilité des tests d'évaluation de l'efficacité des conservateurs.

Comment approfondir la connaissance sur les interactions matrice/conservateur/bactérie pour optimiser la conservation des formules cosmétiques ?

L'association de la MCBL, du HCS et de la microbiologie prévisionnelle pourrait permettre aux entreprises cosmétiques de gagner un temps non négligeable dans l'évaluation de l'efficacité d'un système de conservation. La méthode HCS-MCBL pourrait être une alternative ou être complémentaire aux challenge-tests. Cependant, avant de pouvoir être utilisée à des fins industrielles, il serait pertinent de tester cette méthode avec d'autres conservateurs ajoutés séparément puis ensemble afin d'observer des effets synergiques ou antagonistes entre conservateurs. Il serait également judicieux d'appliquer cette méthode dans d'autres matrices modèles émulsionnées de compositions en phase grasse et en phase aqueuse différentes, ou même avec des galéniques différentes, et à termes dans des formules cosmétiques plus complexes de type industriel. De plus, grâce à l'utilisation du modèle IQ, il serait intéressant de classer des couples de conservateur ou des couples de conservateur-matrice selon leur coefficient Q afin de connaître les couples compatibles ou incompatibles et ainsi d'aider dans l'amélioration des systèmes de conservation. Cette méthode pourrait également permettre de tester d'autres microorganismes que ceux cités dans la réglementation cosmétique par exemple des souches environnementales isolées des sites de fabrication ou de produits cosmétiques contaminés, tels que *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter gergoviae*, et *Serratia marcescens* (Lundov *et al.* 2009; Hugbo *et al.* 2005; Lundov and Zachariae 2008; Halla *et al.* 2018).

Quel est l'impact de l'hydrophobicité de surface des bactéries sur l'activité antibactérienne des conservateurs ?

Il existe une grande variété d'agents antimicrobiens agissant sur différentes cibles cellulaires des microorganismes telles que les membranes cytoplasmiques, les systèmes enzymatiques, les acides nucléiques et les ribosomes. Une fois l'agent antimicrobien dans la matrice, la surface externe des bactéries est la première barrière rencontrée par les antimicrobiens (Maillard 2002). L'hydrophobicité d'un agent antimicrobien dépend de la structure même de la molécule. Dans ce travail de thèse, l'action de deux conservateurs, la chlorphénésine ($\log P_{(o/w)} = 1,713$) et l'alcool benzylique ($\log P_{(o/w)} = 1,100$), a été étudiée sur une souche de *Staphylococcus aureus*. D'après la littérature, le coefficient de partage ($\log P$) permettant de déterminer si une

molécule est hydrophile ($\log P < 0$) ou hydrophobe ($\log P > 0$), peut être un déterminant de l'efficacité antimicrobienne (Pernin *et al.* 2018). Jusqu'à un certain seuil, Plus le $\log P$ est élevé, plus l'activité antibactérienne est élevée. La chlorphénésine ayant un $\log P$ plus élevé que celui de l'alcool benzylique, elle aurait une meilleure capacité à s'insérer dans la membrane bactérienne de *S. aureus* (CIP 4.83) qui a de plus une hydrophobicité de surface élevée (95% d'affinité avec l'hexadécane). Il serait intéressant par la suite d'évaluer l'action antimicrobienne d'autres souches de *S. aureus* ayant des niveaux d'hydrophobicité plus faibles, afin de déterminer l'impact de l'hydrophobicité de surface des bactéries sur l'action des conservateurs. Il serait notamment judicieux de tester les deux souches de *S. aureus* (ATCC 292312 et ATCC 27217) utilisées dans la première partie de cette thèse pour l'étude de la distribution des bactéries (**Chapitre II**).

Quel est l'impact de la concentration de l'inoculum bactérien sur l'efficacité des conservateurs ?

Dans notre étude, nous avons inoculé les matrices cosmétiques à de fortes concentrations bactériennes soit à 1×10^8 et 1×10^9 CFU/g de formule afin d'observer suffisamment de bactéries par champ au microscope confocal à balayage laser. En comparaison, les niveaux d'ensemencement lors des challenge-tests industriels selon la norme ISO 11930 sont plus bas, à des niveaux de 1×10^5 et 1×10^6 CFU.g⁻¹. Nous pouvons ainsi nous poser la question de l'impact du niveau de concentration bactérienne sur l'efficacité antibactérienne. Karabit (1990) a montré dans une étude sur *S. aureus* que la concentration microbienne jusqu'à 1×10^6 bactéries.ml⁻¹ n'affecte pas l'activité antimicrobienne d'un conservateur de type phénol. Cependant, au-delà de cette limite, le temps de réduction décimale augmente avec la concentration de l'inoculum. Une autre étude a également montré qu'à partir de 1×10^7 bactéries.ml⁻¹, une augmentation de la concentration bactérienne entraîne une réduction de l'efficacité de la désinfection (Lambert and Johnston 2001). De plus, Johnston *et al.* (2000) montrent que l'ajout de bactéries mortes dans une suspension vivante de *S. aureus* influence l'efficacité antibactérienne d'un désinfectant, le sulfate de sodium et de dodécyle (SDS) : plus la concentration de bactéries mortes est importante et plus la valeur de la réduction logarithmique diminue. Par exemple, pour un ajout de 1×10^8 bactéries mortes/ml dans une suspension de 1×10^8 bactéries vivantes/ml, en présence de SDS, il est observé une réduction logarithmique d'environ 1,5 log contre 5 log lorsque 3.13×10^6 bactéries mortes/par ml sont ajoutées. Les auteurs font l'hypothèse

que les structures microbiennes (même non viables) seraient capables d'interagir avec les antimicrobiens et de limiter leur efficacité. Ce serait le cas des composants membranaires des bactéries mortes tels que la phosphatidyléthanolamine et les triacylglycérols présents dans le milieu, du fait de leur structure similaire à celle des agents émulsifiants tels que le tween et la lécithine utilisés comme agents neutralisants (Johnston *et al.* 2000). Il serait alors intéressant de réaliser des acquisitions de cinétiques bactériennes en faisant varier la concentration de l'inoculum afin d'évaluer son impact sur l'efficacité des conservateurs dans les formules cosmétiques par dénombrement bactériens sur milieux gélosés. Il sera probablement difficile d'utiliser la méthode de MCBL développée ici à cause du seuil de détection, à moins d'analyser un nombre de puits beaucoup plus élevé que celui utilisé dans ce travail afin d'augmenter le volume d'échantillon observable.

Quel est l'impact de la composition des émulsions sur la distribution des conservateurs dans les formules cosmétiques et sur leur efficacité ?

Pour être actifs, les conservateurs doivent être présents au contact des microorganismes dans la phase aqueuse. Donsi *et al.* (2012) montrent par exemple, que l'activité antimicrobienne de composés naturels d'huiles essentielles (cavacrol, limonène et cinnamaldéhyde), est corrélée avec la concentration de la molécule active dans la phase aqueuse (Donsi *et al.* 2012). Johnston *et al.* (2000) montre également que plus la quantité de désinfectant (sulfate de sodium et de dodécyle) libre dans le milieu diminue, plus le taux de réduction de la population bactérienne diminue (Johnston *et al.* 2000). Dans le cas de matrices cosmétiques, il est possible d'émettre l'hypothèse que la coexistence de plusieurs phases induise une distribution hétérogène des conservateurs, ce qui pourrait alors induire des biais lors de l'évaluation de la conservation par les challenge-tests. Il a été montré que les propriétés d'hydrophobicité des molécules antimicrobiennes peuvent jouer un rôle dans leur distribution au sein d'une émulsion constituée d'une phase hydrophobe et d'une phase hydrophile. Selon leur affinité pour la phase hydrophobe, qui peut notamment être caractérisée par leur coefficient de partage ($\log P_{\text{octanol/water (o/w)}}$), les molécules antimicrobiennes se localisent préférentiellement dans la phase aqueuse, dans la phase lipidique ou encore à la surface des gouttelettes d'émulsion (Pernin, Bosc, *et al.* 2019; Bouarab-Chibane, Oulahal, *et al.* 2018). Une étude montre également qu'il est possible d'avoir des interactions hydrophobes entre certains agents antimicrobiens et des composés présents dans le milieu, tels que les protéines, ayant pour conséquence une

diminution de l'activité antimicrobienne (Bouarab-Chibane, Oulahal, *et al.* 2018). Au cours de ce travail de thèse, nous avons été confrontés à un problème d'interaction entre la chlorphénésine et un co-émulsionnant, le monostéarate de glycérol (GMS) (données non montrées dans le manuscrit car manque de répétitions des expériences). La matrice cosmétique modèle sans ce co-émulsionnant et contenant 0,6% de chlorphénésine ajouté dans la phase aqueuse avant l'émulsification induisait une réduction bactérienne d'environ 3 log en une heure. Le co-émulsionnant a ensuite été rajouté dans la phase lipidique afin d'améliorer la stabilité de la formule. Nous avons alors observé que la réduction logarithmique n'était plus que de 0.5 log en une heure à la même concentration de chlorphénésine. Pour éviter les interactions possibles entre les deux composés lors de la formation de l'émulsion, nous avons alors incorporé la chlorphénésine après l'émulsification, ce qui a permis de rétablir l'activité antimicrobienne initiale soit 3 log de réduction bactérienne en une heure. Une hypothèse pour expliquer ce résultat pourrait être que lorsque la chlorphénésine rentre en contact avec la phase lipidique contenant le GMS pendant l'émulsification, des interactions de type hydrophobe interviendraient entre la chlorphénésine et les gouttelettes lipidiques de l'émulsion, ce qui entrainerait le piégeage du conservateur dans ces gouttelettes. De la même façon, ces interactions pourraient aboutir également au piégeage de la chlorphénésine dans des micelles de GMS lors de l'émulsification. Afin d'optimiser la protection antimicrobienne des formules cosmétiques, il serait intéressant par la suite, d'étudier ces interactions notamment en étudiant les équilibres de partition des conservateurs dans des systèmes complexes tels que les émulsions. On pourrait imaginer par exemple doser le ou les conservateurs dans chacune des phases par analyse chromatographique (Collinge and Noirfalise 1981; Salvador and Chisvert 2011). La résonance magnétique nucléaire (RMN) pourrait également être une technique intéressante qui nous permettrait de caractériser les interactions possibles entre le monostéarate de glycérol et la chlorphénésine. En effet, cette technique permet d'accéder à la structure moléculaire d'un composé chimique et d'identifier les possibles interactions entre différents groupes fonctionnels chimiques grâce à l'analyse spectrale du déplacement chimique d'un atome après avoir appliqué un champ magnétique (Chaghi *et al.* 2010).

Quelles sont les alternatives à l'utilisation des conservateurs ?

Certaines matières premières utilisées dans une formule cosmétique peuvent avoir des propriétés antimicrobiennes. C'est le cas par exemple du caprylyl glycol et du caprylate

de glycéryle qui déstabilisent la membrane bactérienne. Ce type d'ingrédient est de plus en plus recherché par les industries cosmétiques qui tendent à remplacer définitivement les conservateurs controversés (Halla *et al.* 2018). D'autres ingrédients tels que l'éthanol et la glycérine, peuvent également limiter la prolifération microbienne. De plus, plusieurs études montrent qu'il peut être possible d'assurer la conservation des formules cosmétiques en ajustant et en adaptant certaines conditions physicochimiques des formules cosmétiques, tel que le pH ou l' a_w (Berthele *et al.* 2014; Halla *et al.* 2018; Ghalleb *et al.* 2015; Enigl and Sorrells 1997). En perspective de ce travail de thèse, la méthode de MCBL développée pourrait permettre d'examiner l'efficacité antimicrobienne de ces ingrédients non reconnus par la réglementation cosmétique comme étant des conservateurs, mais aussi de plusieurs conditions physico-chimiques tel que le pH et l' a_w .

Par ailleurs, les potentiels effets synergiques entre ingrédients et conservateurs dans des matrices cosmétiques pourront être étudiés en utilisant par exemple la méthode Fractional Concentration Index pour déterminer si les effets antimicrobiens cumulés entre conservateurs, ingrédients et paramètres physico-chimiques sont synergiques, indifférents, additifs ou antagonistes (Stanojevic *et al.* 2009). La méthode de microscopie développée dans ces travaux de thèse pourrait donc être un moyen plus rapide que les challenge-tests pour évaluer l'effet antimicrobien de ces ingrédients et de ces paramètres et permettrait d'optimiser rapidement les formules en utilisant leurs propriétés antimicrobiennes intrinsèques tout en baissant les doses de conservateur.

En conclusion, nos travaux présentent une avancée majeure dans l'évaluation rapide de la conservation des formules pour l'industrie cosmétique et pourrait également fournir un outil à plus large échelle pour le criblage de nouvelles molécules à effet antimicrobien.

Références bibliographiques

- Afssa. 2007. '*Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments concernant les références applicables aux denrées alimentaires en tant que critères indicateurs d'hygiène des procédés*'.
- Al-Adham, Ibrahim, Randa Haddadin, and Phillip Collier. 2013. 'Types of microbicidal and microbistatic agents', *Russell, Hugo & Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. 5-70.
- Alvarez-Lerma, F., E. Maull, R. Terradas, C. Segura, I. Planells, P. Coll, H. Knobel, and A. Vazquez. 2008. 'Moisturizing body milk as a reservoir of *Burkholderia cepacia*: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit', *Critical Care*, 12: 6.
- Amos, W.B., and J.G. White. 2003. 'How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research', *Biology of the Cell*, 95: 335-42.
- Anelich, L.E., and L. Korsten. 1996. 'Survey of micro-organisms associated with spoilage of cosmetic creams manufactured in South Africa', *International Journal of Cosmetic Science*, 18: 25-40.
- ANSES. 2011. '*Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques'. <https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-staphylococcus-0>.
- ANSM. 2007. 'Estimation de la période après ouverture (PAO)', Accessed 2 février 2020. [https://www.anism.sante.fr/Activites/Surveillance-du-marche-des-produits-cosmetiques/Periode-apres-ouverture-PAO/\(offset\)/1](https://www.anism.sante.fr/Activites/Surveillance-du-marche-des-produits-cosmetiques/Periode-apres-ouverture-PAO/(offset)/1).
- . 2016. 'Bonnes pratiques de fabrication des produits cosmétiques', Accessed 31 janvier 2020. [https://www.anism.sante.fr/Activites/Syntheses-des-campagnes-d-inspection/Syntheses-d-inspection-Bonnes-pratiques/\(offset\)/0](https://www.anism.sante.fr/Activites/Syntheses-des-campagnes-d-inspection/Syntheses-d-inspection-Bonnes-pratiques/(offset)/0).
- . 2020. 'Informations de sécurité : retraits de lots et de produits'. www.anism.sante.fr/S-informer/Informations-de-securite-Retraits-de-lots-et-de-produits.
- Augustin, Jean-Christophe, and Vincent Carlier. 2006. 'Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: Analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts', *Food Microbiology*, 23: 1-38.
- Auty, M. A. E. 2013. '4 - Confocal microscopy: principles and applications to food microstructures.' in V. J. Morris and K. Groves (eds.), *Food Microstructures* (Woodhead Publishing).

- Auty, M. A., G. E. Gardiner, S. J. McBrearty, E. O. O'Sullivan, D. M. Mulvihill, J. K. Collins, G. F. Fitzgerald, C. Stanton, and R. P. Ross. 2001. 'Direct *in situ* viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy', *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 420-25.
- Auty, Mark A. E., Myra Twomey, Timothy P. Guinee, and Daniel M. Mulvihill. 2001. 'Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products', *Journal of Dairy Research*, 68: 417-27.
- Baty, Florent, Christian Ritz, Sandrine Charles, Martin Brutsche, Jean-Pierre Flandrois, and Marie Delignette-Muller. 2015. 'A toolbox for nonlinear regression in R : the package nlstools', *Journal of Statistical Software*, 66: 1-21.
- Bellon-Fontaine, M. N., J. Rault, and C. J. van Oss. 1996. 'Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7: 47-53.
- Berney, Michael, Frederik Hammes, Franziska Bosshard, Hans-Ulrich Weilenmann, and Thomas Egli. 2007. 'Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry', *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3283-90.
- Berthele, H., O. Sella, M. Lavarde, C. Mielcarek, A. M. Pense-Lheritier, and S. Pirnay. 2014. 'Determination of the influence of factors (ethanol, pH and a(w)) on the preservation of cosmetics using experimental design', *International Journal of Cosmetic Science*, 36: 54-61.
- Bigelow, W. D. 1921. 'The logarithmic nature of thermal death time curves', *The Journal of Infectious Diseases*, 29: 528-36.
- Bigelow, W. D., and J. R. Esty. 1920. 'The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms', *The Journal of Infectious Diseases*, 27: 602-17.
- Birteksoz Tan, A. S., M. Tuysuz, and G. Otuk. 2013. 'Investigation of preservative efficacy and microbiological content of some cosmetics found on the market', *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26: 153-7.
- Boonaert, C. J., and P. G. Rouxhet. 2000. 'Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties', *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2548-54.
- Bouarab-Chibane, Lynda, Valérian Forquet, Yohann Clement, Pierre Lanteri, Claire Bordes, Jalloul Bouajila, Pascal Degraeve, and Nadia Oulahal. 2018. 'Effect of interactions of plant phenolics with bovine meat proteins on their antibacterial activity', *Food Control*, 90: 189-98.

- Bouarab-Chibane, Lynda, Nadia Oulahal, Emilie Dumas, Nga Trinh Thi Thanh, Jalloul Bouajila, Jean-Pierre Souchard, and Pascal Degraeve. 2018. '**Effect of interaction with food constituents on plant extracts antibacterial activity**', *Food Science and Applied Biotechnology*, 77-85%V 1.
- Boudjemaa, Rym, Romain Briandet, Karine Steenkeste, and Marie-Pierre Fontaine-Aupart. 2006. '**Taking Advantage of Fluorescent-Based Tools to Puzzle out Successes and Failures of Antibiotics to Inactivate Infectious Bacteria**', *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1-18.
- Brayton, C. F. 1986. '**Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review**', *The Cornell veterinarian*, 76: 61-90.
- Bridier, A., F. Dubois-Brissonnet, A. Boubetra, V. Thomas, and R. Briandet. 2010. '**The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method**', *Journal of Microbiological Methods*, 82: 64-70.
- Bridier, A., F. Dubois-Brissonnet, G. Greub, V. Thomas, and R. Briandet. 2011. '**Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms**', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55: 2648-54.
- Bridier, A., F. Hammes, A. Canette, T. Bouchez, and R. Briandet. 2015. '**Fluorescence-based tools for single-cell approaches in food microbiology**', *International Journal of Food Microbiology*, 213: 2-16.
- Brisson, Guillaume, Hannah F. Payken, John P. Sharpe, and Rafael Jiménez-Flores. 2010. '**Characterization of *Lactobacillus reuteri* interaction with milk fat globule membrane components in dairy products**', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 5612-19.
- Brochette, Pascal. 2013. '**Émulsification élaboration et étude des émulsions**', *Techniques de l'ingénieur Cosmétiques : procédés de formulation*, base documentaire : TIB634DUO.
- Brocklehurst, T. F., M. L. Parker, P. A. Gunning, H. P. Coleman, and M. M. Robins. 1995. '**Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II-Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth**', *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 609-15.
- Brown, Spencer, and Christel Poujol. 2006. '**Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie**', *Cours de l'Université de Bordeaux*.
- Bruinsma, Gerda M., Minie Rustema-Abbing, Henny C. Van der Mei, and Henk J. Busscher. 2001. '**Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa***', *Journal of Microbiological Methods*, 45: 95-101.

- Buffet-Bataillon, Sylvie, Pierre Tattevin, Martine Bonnaure-Mallet, and Anne Jolivet-Gougeon. 2012. 'Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39: 381-89.
- Bukowski, Michal, Benedykt Wladyka, and Grzegorz Dubin. 2010. 'Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*', *Toxins*, 2: 1148-65.
- Burgain, J., J. Scher, G. Francius, F. Borges, M. Corgneau, A. M. Revol-Junelles, C. Cailliez-Grimal, and C. Gaiani. 2014. 'Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components', *Advances in Colloid and Interface Science*, 213: 21-35.
- Campana, R., C. Scesa, V. Patrone, E. Vittoria, and W. Baffone. 2006. 'Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems', *Letters in Applied Microbiology*, 43: 301-06.
- Canette, Alexis, Julien Deschamps, and Romain Briandet. 2019. 'High content screening confocal laser microscopy (HCS-CLM) to characterize biofilm 4D structural dynamic of foodborne pathogens.' in Arnaud Bridier (ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens: Methods and Protocols* (Springer New York: New York, NY).
- Cardona, Jaime A Rincón, Cristián Huck Iriart, and María Lidia Herrera. 2013. 'Applications of confocal laser scanning microscopy (CLSM) in foods.' in, *Confocal Laser Microscopy-Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences*.
- Chaghi, Radhouane, Louis-Charles de Ménorval, Clarence Charnay, and Jerzy Zajac. 2010. 'Competitive interactions between components in surfactant–cosurfactant–additive systems', *Journal of Colloid and Interface Science*, 344: 402-09.
- Chalier, Pascale, Bérénice Angot, Dominique Delteil, Thierry Doco, and Ziya Gunata. 2007. 'Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains', *Food Chemistry*, 100: 22-30.
- Chen, Chin-Yi, Gary W. Nace, and Peter L. Irwin. 2003. 'A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*', *Journal of Microbiological Methods*, 55: 475-79.
- Chitarra, Luiz G., Peter Breeuwer, Tjakko Abee, and Ruud W. Bulk. 2006. 'The use of fluorescent probes to assess viability of the plant pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by flow cytometry', *Fitopatologia Brasileira*, 31: 349-56.

- Collinge, A, and A Noirfalise. 1981. 'Dosage de sept agents conservateurs dans les denrées alimentaires par chromatographie liquide a haute performance', *Analytica Chimica Acta*, 132: 201-04.
- Coroller, Louis, Sabine Jeuge, Olivier Couvert, Souad Christieans, and Mariem Ellouze. 2015. 'Extending the gamma concept to non-thermal inactivation: a dynamic model to predict the fate of *Salmonella* during the dried sausages process', *Food Microbiology*, 45: 266-75.
- Cosmetic Valley. 2020. Accessed 29 January 2020. <https://www.cosmetic-valley.com/page/presentation/chiffres-cles/>.
- Cox, Guy. 2002. 'Biological confocal microscopy', *Materials Today*, 5: 34-41.
- Davison, W. M., B. Pitts, and P. S. Stewart. 2010. 'Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54: 2920-7.
- De Chaumont, Fabrice, Stéphane Dallongeville, Nicolas Chenouard, Nicolas Hervé, Sorin Pop, Thomas Provoost, Vannary Meas-Yedid, Praveen Pankajakshan, Timothée Lecomte, and Yoann Le Montagner. 2012. 'Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research', *Nature methods*, 9: 690.
- Devlieghere, F., A. De Loy-Hendrickx, M. Rademaker, P. Pipelers, A. Crozier, B. De Baets, L. Joly, and S. Keromen. 2015. 'A new protocol for evaluating the efficacy of some dispensing systems of a packaging in the microbial protection of water-based preservative-free cosmetic products', *International Journal of Cosmetic Science*, 37: 627-35.
- Ding, K., and S. Gunasekaran. 1998. 'Three-dimensional image reconstruction procedure for food microstructure evaluation.' in S. Panigrahi and K. C. Ting (eds.), *Artificial Intelligence for Biology and Agriculture* (Springer Netherlands: Dordrecht).
- Doherty, S. B., V. L. Gee, R. P. Ross, C. Stanton, G. F. Fitzgerald, and A. Brodkorb. 2010. 'Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG.', *Journal of Microbiological Methods*, 80: 231-41.
- Donsì, Francesco, Marianna Annunziata, Mariarosaria Vincensi, and Giovanna Ferrari. 2012. 'Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier', *Journal of Biotechnology*, 159: 342-50.
- Dorobantu, L. S., A. K. C. Yeung, J. M. Foght, and M. R. Gray. 2004. 'Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic bacteria', *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 6333-6.

- Enigl, Davin C, and KM Sorrells. 1997. 'Water activity and self-preserving formulas', *cosmetic science and technology series*: 45-74.
- Epstein, Howard. 2006. *Skin care products* (CRC Press: Boca Raton, FL).
- Fang, B., M. Yu, W. Zhang, and F. Wang. 2016. 'A new alternative to cosmetics preservation and the effect of the particle size of the emulsion droplets on preservation efficacy', *International Journal of Cosmetic Science*, 38: 496-503.
- Feng, Jie, Ting Wang, Shuo Zhang, Wanliang Shi, and Ying Zhang. 2014. 'An optimized SYBR Green I/PI assay for rapid viability assessment and antibiotic susceptibility testing for *Borrelia burgdorferi*', *PloS one*, 9: e111809.
- Ferreira, Tiago, and Wayne Rasband. 2012. 'ImageJ user guide', *ImageJ/Fiji*, 1: 155-61.
- Feuilloley, M.; Orange, N. 2018. *Évaluation des produits cosmétiques - La sécurité* (Chartres, France).
- Findley, Keisha, and Elizabeth A. Grice. 2014. 'The skin microbiome: a focus on pathogens and their association with skin disease', *PLoS pathogens*, 10: e1004436-e36.
- Fukui, H. 2017. 'Chapter 12 - Water.' in Kazutami Sakamoto, Robert Y. Lochhead, Howard I. Maibach and Yuji Yamashita (eds.), *Cosmetic Science and Technology* (Elsevier: Amsterdam).
- Futsaether, C. M., B. Kjeldstad, and A. Johnsson. 1993. 'Measurement of the intracellular pH of *Propionibacterium acnes*: comparison between the fluorescent probe BCECF and 31P-NMR spectroscopy', *Canadian Journal of Microbiology*, 39: 180-86.
- Geeraerd, A. H., V. P. Valdramidis, and J. F. Van Impe. 2005. 'GlnaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves', *International Journal of Food Microbiology*, 102: 95-105.
- Ghalieb, S., S. De Vaugelade, O. Sella, M. Lavarde, C. Mielcarek, A. M. Pense-Lheritier, and S. Pirnay. 2015. 'Predictive microbiology for cosmetics based on physicals, chemicals and concentration parameters', *International Journal of Cosmetic Science*, 37: 70-5.
- Gilbert, Peter, Fiona Caplan, and Michael R. W. Brown. 1991. 'Centrifugation injury of Gram-negative bacteria', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27: 550-51.
- Gimeno, P., A. F. Maggio, C. Bousquet, A. Quoirez, C. Civade, and P. A. Bonnet. 2012. 'Analytical method for the identification and assay of 12 phthalates in cosmetic products: application of the ISO 12787 international standard "Cosmetics-Analytical methods-Validation criteria for analytical results using chromatographic techniques"', *Journal of Chromatography A*, 1253: 144-53.
- Gorman, S., and E. Scott. 2007. 'Chemical Disinfectants, Antiseptics and Preservatives.' in, *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*.

- Gudnason, Haukur, Martin Dufva, Dang Duong Bang, and Anders Wolff. 2007. 'Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature', *Nucleic acids research*, 35: e127.
- Guillaume, Pierre. 2010. '*Biochemical characterization of algal exopolymers from Marennes-Oléron and study of the physico-chemical surface properties of microorganisms involved in their adhesion*'.
- Halla, N., I. P. Fernandes, S. A. Heleno, P. Costa, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, A. E. Rodrigues, I. Ferreira, and M. F. Barreiro. 2018. 'Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies', *Molecules*, 23.
- Hashim, J., L. Looney, and M. S. J. Hashmi. 2002. 'Particle distribution in cast metal matrix composites—Part I', *Journal of Materials Processing Technology*, 123: 251-57.
- Hedges, A. J. 2002. 'Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts', *International Journal of Food Microbiology*, 76: 207-14.
- Herman, Anna. 2019. 'Antimicrobial ingredients as preservative booster and components of self-preserving cosmetic products', *Current Microbiology*, 76: 744-54.
- Herrera, A. G. 2004. 'Microbiological analysis of cosmetics', *Methods in Molecular Biology*, 268: 293-5.
- Hope, CK, D Clements, and M Wilson. 2002. 'Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling', *Journal of Applied Microbiology*, 93: 448-55.
- Hugbo, Peter, Anthony Onyekweli, and Ijoma Igwe. 2005. 'Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetic creams', *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2.
- Ioannou, Christopher J., Geoff W. Hanlon, and Stephen P. Denyer. 2007. 'Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51: 296-306.
- Jang, Hyeung-Jin, Chantal Nde, Freshteh Toghrol, and William E. Bentley. 2008. 'Microarray analysis of toxicogenomic effects of Ortho-phenylphenol in *Staphylococcus aureus*', *BMC Genomics*, 9: 411.
- Jeanson, S., J. Chadoeuf, M. N. Madec, S. Aly, J. Floury, T. F. Brocklehurst, and S. Lortal. 2011. 'Spatial distribution of bacterial colonies in a model cheese', *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 1493-500.
- Johnson, Wilbur, Wilma Bergfeld, Donald Belsito, Ronald Hill, Curtis Klaassen, Daniel Liebler, James Marks, Ronald Shank, Thomas Slaga, and Paul Snyder. 2014.

- 'Safety assessment of chlorphenesin as used in cosmetics', *International journal of toxicology*, 33: 5S-15S.
- Johnston, M. D., E. A. Simons, and R. J. Lambert. 2000. 'One explanation for the variability of the bacterial suspension test', *Journal of Applied Microbiology*, 88: 237-42.
- Johnston, M.D., R.J.W. Lambert, G.W. Hanlon, and S.P. Denyer. 2002. 'A rapid method for assessing the suitability of quenching agents for individual biocides as well as combinations', *Journal of Applied Microbiology*, 92: 784-89.
- Jongenburger, I., J. Bassett, T. Jackson, M. H. Zwietering, and K. Jewell. 2012. 'Impact of microbial distributions on food safety I. Factors influencing microbial distributions and modelling aspects', *Food Control*, 26: 601-09.
- Jongenburger, I., M. W. Reij, E. P. J. Boer, L. G. M. Gorris, and M. H. Zwietering. 2011. 'Random or systematic sampling to detect a localised microbial contamination within a batch of food', *Food Control*, 22: 1448-55.
- Jongenburger, I., M. W. Reij, E. P. J. Boer, M. H. Zwietering, and L. G. M. Gorris. 2012. 'Modelling homogeneous and heterogeneous microbial contaminations in a powdered food product', *International Journal of Food Microbiology*, 157: 35-44.
- Joux, F., and P. Lebaron. 2000. 'Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level', *Microbes and Infection*, 2: 1523-35.
- Juven, B. J., J. Kanner, F. Schved, and H. Weisslowicz. 1994. 'Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents', *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626-31.
- Kamgang, J. O., R. Briandet, J. M. Herry, J. L. Brisset, and M. Naitali. 2007. 'Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis* using a gliding discharge in humid air', *Journal of Applied Microbiology*, 103: 621-8.
- Kaneshiro, Edna S., Michael A. Wyder, Yi-Ping Wu, and Melanie T. Cushion. 1993. 'Reliability of calcein acetoxymethyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes', *Journal of Microbiological Methods*, 17: 1-16.
- Karabit, Mufid Shamil. 1990. 'Studies on the evaluation of preservative efficacy V. Effect of concentration of micro-organisms on the antimicrobial activity of phenol', *International Journal of Pharmaceutics*, 60: 147-50.
- Karampoula, Foteini, Efstathios Giaouris, Julien Deschamps, Agapi I. Doulgeraki, George-John E. Nychas, and Florence Dubois-Brissonnet. 2016. 'Hydrosol of *Thymbra capitata* is a highly efficient biocide against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilms', *Applied and Environmental Microbiology*, 82: 5309-19.

- Kirchhof, Mark G, and Gillian C de Gannes. 2013. 'The health controversies of parabens', *Skin Therapy Letter*, 18: 5-7.
- Kirk-Othmer. 2013. *Chemical Technology of Cosmetics* (Wiley: New Jersey).
- Kozlowski, A.C. 2009. *Formulating Strategies in Cosmetic Science* (Alluredbooks).
- Lakowicz, Joseph. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.
- Lambert, R. J., and M. Stratford. 1999. 'Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response', *Journal of Applied Microbiology*, 86: 157-64.
- Lambert, R.J.W., and M.D. Johnston. 2000. 'Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves', *Journal of Applied Microbiology*, 88: 907-13.
- . 2001. 'The effect of interfering substances on the disinfection process: a mathematical model', *Journal of Applied Microbiology*, 91: 548-55.
- Langsrud, Solveig, Katrin Steinhauer, Sonja Lüthje, Klaus Weber, Peter Goroncy-Bermes, and Askild L. Holck. 2016. 'Ethylhexylglycerin Impairs Membrane Integrity and Enhances the Lethal Effect of Phenoxyethanol', *PloS one*, 11: e0165228-e28.
- Le Loir, Y., F. Baron, and M. Gautier. 2003. '*Staphylococcus aureus* and food poisoning', *Genetics and Molecular Research*, 2: 63-76.
- Li, J., D. J. McClements, and L. A. McLandsborough. 2001. 'Interaction between emulsion droplets and *Escherichia coli* cells', *Journal of Food Science*, 66: 570-657.
- Lichtman, Jeff W., and José-Angel Conchello. 2005. 'Fluorescence microscopy', *Nature methods*, 2: 910-19.
- Lochhead, R. Y. 2017. 'Chapter 13 - The use of polymers in cosmetic products.' in Kazutami Sakamoto, Robert Y. Lochhead, Howard I. Maibach and Yuji Yamashita (eds.), *Cosmetic Science and Technology* (Elsevier: Amsterdam).
- Lopez, C., M. B. Maillard, V. Briard-Bion, B. Camier, and J. A. Hannon. 2006. 'Lipolysis during ripening of emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5855-67.
- Lowy, Franklin D. 1998. '*Staphylococcus aureus* infections', *New England Journal of Medicine*, 339: 520-32.
- Lundov, M. D., J. D. Johansen, C. Zachariae, and L. Moesby. 2011. 'Low-level efficacy of cosmetic preservatives', *International Journal of Cosmetic Science*, 33: 190-96.
- Lundov, M. D., and C. Zachariae. 2008. 'Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008', *International Journal of Cosmetic Science*, 30: 471-74.
- Lundov, Michael Dyrgaard, Lise Moesby, Claus Zachariae, and Jeanne Duus Johansen. 2009. 'Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy', *Contact Dermatitis*, 60: 70-78.

- Ly, M. H., M. Aguedo, S. Goudot, M. L. Le, P. Cayot, J. A. Teixeira, T. M. Le, J. M. Belin, and Y. Waché. 2008. 'Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability', *Food Hydrocolloids*, 22: 742-51.
- Ly, M. H., M. Naitali-Bouchez, T. Meylheuc, M. N. Bellon-Fontaine, T. M. Le, J. M. Belin, and Y. Wache. 2006. 'Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions', *International Journal of Food Microbiology*, 112: 26-34.
- Ly, M. H., N. H. Vo, T. M. Le, J. M. Belin, and Y. Wache. 2006. 'Diversity of the surface properties of *Lactococci* and consequences on adhesion to food components', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52: 149-53.
- Macheix, JJ, A Fleuret, and P Sarni-Manchado. 2006. 'Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles', *Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris*. 390-99.
- Madani, T. A., S. Alsaedi, L. James, B. S. Eldeek, A. A. Jiman-Fatani, M. M. Alawi, D. Marwan, M. Cudal, M. Macapagal, R. Bahlas, and M. Farouq. 2011. '*Serratia marcescens*-contaminated baby shampoo causing an outbreak among newborns at King Abdulaziz University Hospital, Jeddah, Saudi Arabia', *Journal of Hospital Infection*, 78: 16-19.
- Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, and I. Leguerinel. 2002. 'On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model', *International Journal of Food Microbiology*, 72: 107-13.
- Mafart, P., O. Couvert, and I. Leguérinel. 2001. 'Effect of pH on the heat resistance of spores: Comparison of two models', *International Journal of Food Microbiology*, 63: 51-56.
- Mafart, P., I. Leguérinel, O. Couvert, and L. Coroller. 2010. 'Quantification of spore resistance for assessment and optimization of heating processes: A never-ending story', *Food Microbiology*, 27: 568-72.
- Mai-Prochnow, Anne, Flavia Evans, Doralyn Dalisay-Saludes, Sacha Stelzer, Suhelen Egan, Sally James, Jeremy S. Webb, and Staffan Kjelleberg. 2004. 'Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*', *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3232.
- Maillard, J.-Y. 2002. 'Bacterial target sites for biocide action', *Journal of Applied Microbiology*, 92: 16S-27S.
- Membré, Jeanne-Marie, and Ronald J. W. Lambert. 2008. 'Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up to risk assessment', *International Journal of Food Microbiology*, 128: 10-15.
- Molenaar, D, H Bolhuis, T Abee, B Poolman, and W N Konings. 1992. 'The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in *Lactococcus lactis*', *Journal of Bacteriology*, 174: 3118-24.

- Moore, S.L and Paynes, D.N. 2008. '**Types of Antimicrobial Agents.**' in, *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization.*
- Mudd, S., and E. B. Mudd. 1924. '**Certain interfacial tension relations and the behavior of bacteria in films**', *Journal of Experimental medicine*, 40: 647-60.
- Nair, Bindu. 2001. '**Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate**', *International journal of toxicology*, 20: 23-50.
- Naïtali, Murielle, Laurent Guillier, and Florence Dubois-Brissonnet. 2017. *Risques microbiologiques alimentaires.*
- Nakama, Y. 2017. '**Chapter 15 - Surfactants.**' in Kazutami Sakamoto, Robert Y. Lochhead, Howard I. Maibach and Yuji Yamashita (eds.), *Cosmetic Science and Technology* (Elsevier: Amsterdam).
- Nauta, Maarten J. 2005. '**Microbiological risk assessment models for partitioning and mixing during food handling**', *International Journal of Food Microbiology*, 100: 311-22.
- Neu, Thomas R. 1996. '**Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces**', *Microbiological reviews*, 60: 151.
- Ohta, Shun-ichi. 2006. '**Synthetic mica and its applications**', *Clay science*, 12: 119-24.
- Oss, Carel Jan van. 2003. '**Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions**', *Journal of Molecular Recognition*, 16: 177-90.
- Ozkan, Pinar, and Raj Mutharasan. 2002. '**A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM**', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572: 143-48.
- Paddock, Stephen W. 2000. '**Principles and practices of laser scanning confocal microscopy**', *Molecular Biotechnology*, 16: 127-49.
- Patel, A., R. T. Noble, J. A. Steele, M. S. Schwalbach, I. Hewson, and J. A. Fuhrman. 2007. '**Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I**', *Nature Protocols*, 2: 269-76.
- Paulus, Wilfried. 2005a. '**Alcohols.**' in Wilfried Paulus (ed.), *Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook* (Springer Netherlands: Dordrecht).
- . 2005b. '**Aldehydes.**' in Wilfried Paulus (ed.), *Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook* (Springer Netherlands: Dordrecht).
- . 2005c. '**Microbiocide datas.**' in, *Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook* (Springer Science & Business Media).
- Pembrey, R. S., K. C. Marshall, and R. P. Schneider. 1999. '**Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties?**', *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2877-94.

- Pensé-Lhéritier, A. M., and C. Masson. 2016. *Conception des produits cosmétiques - La formulation*.
- Pernin, Aurélia, Véronique Bosc, Marie-Noëlle Maillard, and Florence Dubois-Brissonnet. 2019. 'Ferulic acid and eugenol have different abilities to maintain their inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* in emulsified systems', *Frontiers in microbiology*, 10: 137-37.
- Pernin, Aurélia, Florence Dubois-Brissonnet, Stéphanie Roux, Marine Masson, Véronique Bosc, and Marie-Noëlle Maillard. 2018. 'Phenolic compounds can delay the oxidation of polyunsaturated fatty acids and the growth of *Listeria monocytogenes*. structure-activity relationships', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 5401-08.
- Pernin, Aurélia, Laurent Guillier, and Florence Dubois-Brissonnet. 2019. 'Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*. Deciphering the mechanisms of action using three different models', *Food Microbiology*, 80: 18-24.
- Pierre Fabre. 2009. 'Packaging innovation in dermocosmetics', Accessed 30 janvier 2020. https://www.cosmetique-sterile.com/cosmetique_sterile.html.
- Ricke, S. C. 2003. 'Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials', *Poultry Science*, 82: 632-39.
- Rosenberg, M, D Gutnick, and Ei Rosenberg. 1980. 'Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity', *FEMS microbiology letters*, 9: 29-33.
- Rosenberg, Mel. 1984. 'Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity', *FEMS Microbiology Letters*, 22: 289-95.
- Rumin, Judith, Hubert Bonnefond, Bruno Saint-Jean, Catherine Rouxel, Antoine Sciandra, Olivier Bernard, Jean-Paul Cadoret, and Gaël Bougaran. 2015. 'The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae', *Biotechnology for biofuels*, 8: 42-42.
- Russell, A. D. 2003. 'Challenge testing: principles and practice', *International Journal of Cosmetic Science*, 25: 147-53.
- Ryu, Sunhyo, Peter Song, Chang Seo, Hyeonsook Cheong, and Yoonkyung Park. 2014. 'Colonization and infection of the skin by *S. aureus*. immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides', *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 8753.
- Sadok, Abdelkader Hadj, Nadji Moulai-Mostefa, and Arezki Bouda. 2013. 'Etude de l'influence des facteurs de formulation sur les propriétés viscoélastiques d'un gel à base de Carbopol', *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 26: 96-102.

- Salvador, Amparo, and Alberto Chisvert. 2011. *Analysis of cosmetic products* (Elsevier).
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, and Kevin W. Eliceiri. 2012. 'NIH image to imageJ: 25 years of image analysis', *Nature Methods*, 9: 671.
- Scholtyssek, R. 2005. 'Protection of cosmetics and toiletries.' in Wilfried Paulus (ed.), *Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook* (Springer Netherlands: Dordrecht).
- SGS. 2020. Accessed 30 January 2020. www.sgs.com/en/consumer-goods-retail/product-recalls?p=30&d=4294967287+4294967286&id=16FF624085B0&dc=http&lb=
- Shen, Hao-Yu, Hai-Liang Jiang, Hong-Lei Mao, Gang Pan, Lu Zhou, and Yun-Feng Cao. 2007. 'Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods', *Journal of Separation Science*, 30: 48-54.
- Shimamoto, Tsugio, and Hiroyuki Mima. 1979. 'A model for the evaluation and prediction of preservative activity in oil-in-water emulsions', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 27: 2743-50.
- Siegert, W. 2014. 'Boosting the antimicrobial efficiency of multifunctional additives by chelating agents', *International Journal of Applied Science*, 140: 1-6.
- Stanojevic, D, L Comic, O Stefanovic, and SI Solujic-Sukdolak. 2009. 'Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro', *Bulgarian Journal of Agricultural Science J*, 15: 307-11.
- Stephens, P. J., and B. M. Mackey. 2003. 'Recovery of stressed microorganisms.' in Janet E. L. Corry, G. D. W. Curtis and Rosamund M. Baird (eds.), *Progress in Industrial Microbiology* (Elsevier).
- Stiefel, Philipp, Sabrina Schmidt-Emrich, Katharina Maniura-Weber, and Qun Ren. 2015. 'Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide', *BMC microbiology*, 15: 36.
- Stratford, M., and T. Eklund. 2003. 'Organic acids and esters.' in N. J. Russell and Grahame W. Gould (eds.), *Food Preservatives* (Springer US: Boston, MA).
- Takenaka, Shoji, Harsh M Trivedi, Audrey Corbin, Betsey Pitts, and Philip S Stewart. 2008. 'Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms', *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1869-75.
- Terjung, Nino, Myriam Löffler, Monika Gibis, Jörg Hinrichs, and Jochen Weiss. 2012. 'Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials', *Food & function*, 3: 290-301.

- The Good Scents Company information system. '**Benzyl alcohol**', Accessed 30 January 2020. <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1001652.html>.
- . '**Chlorphenesin**', Accessed 30 January 2020. <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1364911.html>.
- Tkachenko, N, O Chagarovskyi, N Dets, E Sevastyanova, and L Lanzhenko. 2017. '**"Living" and "probiotic" cosmetics: modern view and definitions**', *Food Science and Technology*
- Tong, Steven Y. C., Joshua S. Davis, Emily Eichenberger, Thomas L. Holland, and Vance G. Fowler. 2015. '***Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management**', *Clinical Microbiology Reviews*, 28: 603.
- Tran, T.T., F.J. Hurley, M. Shurbaji, and L.B. Koopman. 1994. '**Adequacy of cosmetic preservation: chemical analysis, microbial challenge and in-use testing**', *International Journal of Cosmetic Science*, 16: 61-76.
- Tran, Tony T., and Anthony D. Hitchins. 1994. '**Microbial survey of shared-use cosmetic test kits available to the public**', *Journal of Industrial Microbiology*, 13: 389-91.
- Ubbink, Job, and Prisca Schär-Zammaretti. 2007. '**Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces**', *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12: 263-70.
- Valdramidis, Vasilis. 2016. '**1 - Predictive microbiology**.' in Jeanne-Marie Membré and Vasilis Valdramidis (eds.), *Modeling in Food Microbiology* (Elsevier: Oxford).
- Valeur, Bernard. 2003. '**Molecular fluorescence**', *Digital Encyclopedia of Applied Physics*. 477-531.
- Varvaresou, A., S. Papageorgiou, E. Tsirivas, E. Protopapa, H. Kintziou, V. Kefala, and C. Demetzos. 2009. '**Self-preserving cosmetics**', *International Journal of Cosmetic Science*, 31: 163-75.
- Wadhawan, Tanush, Zachary B. Maruska, Sumana Siripattanakul, Christopher B. Hill, Anindita Gupta, Birgit M. Prüß, John M. McEvoy, and Eakalak Khan. 2011. '**A new method to determine initial viability of entrapped cells using fluorescent nucleic acid staining**', *Bioresource Technology*, 102: 1622-27.
- Webb, Jeremy S, Lyndal S Thompson, Sally James, Tim Charlton, Tim Tolker-Nielsen, Birgit Koch, Michael Givskov, and Staffan Kjelleberg. 2003. '**Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development**', *Journal of Bacteriology*, 185: 4585-92.
- Weiss, Jochen, Myriam Loeffler, and Nino Terjung. 2015. '**The antimicrobial paradox: why preservatives lose activity in foods**', *Current Opinion in Food Science*, 4: 69-75.

- Wiederschain, G. Ya. 2011. 'The molecular probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies', *Biochemistry (Moscow)*, 76: 1276-76.
- Wimpenny, J. W. T., L. Leistner, Linda V. Thomas, A. J. Mitchell, K. Katsaras, and Petra Peetz. 1995. 'Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions', *International Journal of Food Microbiology*, 28: 299-315.
- Wong, Kim H., and Kenneth L. Campbell. 2011. 'Factors that affect use of intercalating dyes such as PicoGreen, SYBR Green I, Syto-13 and Syto-82 in DNA assays', *Biology of Reproduction*, 85: 725-25.
- Yamashita, Y., and K. Sakamoto. 2017. 'Chapter 38 - Structural analysis of formulations.' in Kazutami Sakamoto, Robert Y. Lochhead, Howard I. Maibach and Yuji Yamashita (eds.), *Cosmetic Science and Technology* (Elsevier: Amsterdam).

Valorisation de la thèse

Publications soumises dans des revues à comité de lecture :

Article 1 : Samia Almoughrabie, Chrissy Ngari, Romain Briandet, Valérie Poulet, and Florence Dubois-Brissonnet, **Mosaic-CLSM assessment of bacterial spatial distribution in cosmetic matrices according to matrix viscosity and bacterial hydrophobicity**. *Publié le : 11 mai 2020.*

Article 2 : Samia Almoughrabie, Chrissy Ngari, Laurent Guillier, Romain Briandet, Valérie Poulet, and Florence Dubois-Brissonnet, **Rapid assessment and prediction of preservative efficiency in cosmetic products using High Content Screening – Confocal Laser Scanning Microscopy**. *Accepté le : 29 juin 2020.*

Communications orales :

Samia Almoughrabie, Chrissy Ngari, Valérie Poulet, and Florence Dubois-Brissonnet. Spatial distribution of *S. aureus* in emulsified complex matrices relies on the thickener concentration. *5th International ISEKI- Food, PhD Workshop, 3-5 July 2018, Stuttgart, Germany.*

Samia Almoughrabie, Chrissy Ngari, Valérie Poulet, and Florence Dubois-Brissonnet. Impact of bacterial surface properties of *Staphylococcus aureus* on bacterial spatial distribution in emulsified cosmetic matrices: consequences on challenge-tests. *9th Doc'MICALIS Seminar - MICALIS doctoral students day, 16 May 2019, INRAE Jouy-en-Josas, France.*

Communications par poster :

Samia Almoughrabie, Chrissy Ngari, Valérie Poulet, and Florence Dubois-Brissonnet. Impact of bacterial surface properties on spatial distribution of *S. aureus* in complex emulsified matrices. *8th Congress of European Microbiologists – FEMS 2019, 7-11 July 2019, Glasgow, Scotland.*

Samia Almoughrabie, Chrissy Ngari, Valérie Poulet, and Florence Dubois-Brissonnet. Impact des propriétés de surfaces des bactéries sur la distribution spatiale de *Staphylococcus aureus* dans des matrices complexes émulsionnées. *15^{ème} congrès national de la Société Française de Microbiologie, 30 septembre - 2 octobre 2019, Paris, France.*

Titre : Évaluation et prévision de l'activité antimicrobienne des conservateurs dans des formulations cosmétiques.

Mots clés : distribution spatiale des bactéries, Challenge-tests, inactivation bactérienne, conservateurs, microscopie confocale à balayage laser.

Résumé : La plupart des produits cosmétiques sont sensibles à la prolifération microbienne, notamment du fait de leur composition riche en eau, de leur conservation à température ambiante et de leur utilisation en plusieurs fois. La gamme de conservateurs utilisables se réduisant, notamment à cause du durcissement de la réglementation, il devient indispensable de déterminer avec précision la capacité de conservation des formules cosmétiques pour prévoir leur durée de vie. Ainsi, l'objectif de cette thèse est de mieux comprendre, de prévoir et d'optimiser le fonctionnement des systèmes conservateurs au sein des matrices cosmétiques. Il s'agira tout d'abord de comprendre le rôle de la matrice (composition et structure) sur la répartition spatiale des microorganismes dans les formules cosmétiques, puis de mettre en place une méthode permettant d'évaluer et de prédire l'action des conservateurs au sein de ces matrices. Le Challenge-test est aujourd'hui encore la méthode de référence pour l'évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique mais il présente cependant un certain nombre de limites, notamment du fait de la lourdeur des expérimentations et du délai d'obtention des résultats. Nous avons tout d'abord cherché à identifier les déterminants de la distribution spatiale de *Staphylococcus aureus*,

artificiellement inoculés dans des formules cosmétiques, grâce à une méthode associant la microscopie confocale à balayage laser (MCBL) et l'analyse d'images. Nous avons pu montrer que plus la viscosité des formules et/ou de l'hydrophobicité des bactéries augmentent, plus la distribution spatiale des bactéries est hétérogène. De plus, nous avons mis en évidence qu'une distribution spatiale hétérogène pouvait induire une variabilité des résultats de dénombrement lors des Challenge-tests. Une méthode rapide a ensuite été développée pour évaluer et prédire l'action des conservateurs dans les formules cosmétiques. Cette méthode est basée sur l'acquisition de données d'inactivation bactérienne obtenues sur des temps courts par MCBL et sur la mise en place de modèles mathématiques d'inactivation. Elle a permis de prédire le nombre de réductions logarithmiques des populations bactériennes sur des temps longs, de même ordre de grandeur que les temps définis dans les challenge-tests. Cet outil devrait ainsi permettre aux industries cosmétiques de gagner du temps dans l'optimisation de la protection antimicrobienne des formules cosmétiques.

Title : Evaluation and prediction of antimicrobial activity of preservatives in cosmetic formulas.

Keywords : bacterial spatial distribution, Challenge-tests, bacterial inactivation, preservatives, confocal laser scanning microscopy.

Abstract: Most cosmetic products are susceptible to microbiological spoilage, which is particularly due to the high-water content in its composition, to the room temperature storage and to the consumer usage. The range of usable preservatives is reduced, in particular because of the tightening of the regulation. The objective of this PhD is thus to better understand, predict and optimize the efficiency of the preservation systems in cosmetic formulas. Moreover, we aimed to understand the role of the matrix (composition and structure) on the spatial distribution of *Staphylococcus aureus* in cosmetic matrices, and to implement a rapid method able to predict the action of the preservatives within these matrices. The Challenge-test is the referenced method for evaluating the antimicrobial protection of a cosmetic product but it has a main limitation which is relative to the time-consuming protocol and to the duration of the whole test. Hence, we first identified the determinants of the spatial distribution of *Staphylococcus aureus* artificially inoculated in cosmetic formulas using a method combining confocal laser scanning microscopy (CLSM) and image analysis.

We demonstrated that the higher the viscosity of the formula and / or the higher the bacterial hydrophobicity, the more heterogeneous the bacterial spatial distribution. The heterogeneity of the spatial bacterial distribution of the formula can induce variability in the enumeration results during Challenge-tests.

A rapid method was then developed to assess and predict the action of preservatives in cosmetic formulas. This method is based on both the acquisition by CLSM of bacterial inactivation datasets over short periods of time and the implementation of mathematical inactivation models.

Thus, it was possible to predict the number of bacterial logarithmic reductions on long times that are relevant to challenge-test duration. This tool should allow the cosmetic industries to save time in optimizing the antimicrobial protection of cosmetic formulas.