

10/04/2021

Création d'un produit cosmétique à base de criste marine



Rédigé par GARANCHER Yannis, GRACIET Arthur, CHEMIN Marion, MARRA Cassandre,
BORIC Léa, NAVARRO-CANO Sarah, projet tutoré réalisé en 2^{ème} année de DUT

Tuteur : Valérie SCHOEN

Table des matières

I-	INTRODUCTION	2
I-1-	Notre projet	2
I-2-	Gestion du projet	2
I-3-	La Criste marine	3
I-4-	L'Aloé Vera	3
II-	MATERIEL ET METHODES	4
II-1-	Réalisation du produit cosmétique :	4
II-2-	Réalisation des macérats	4
II-3-	Formulation.....	4
II-4-	Test à réaliser pour la validation du produit : Challenge test.....	5
II-4-1-	Matériel	5
II-4-2-	Méthode	5
II-5-	Test à réaliser pour la validation du produit : test de stabilité.....	6
II-5-1-	Matériel	6
II-5-2-	Méthode	7
III-	RÉSULTATS.....	7
III-1-	Challenge test	7
Après 48h d'incubation nous avons pris des photos des résultats pour chaque jour. Toutes les photos ne sont pas présentes au vu de la quantité de gélose (60 géloses.).....		7
III-1-1-	Résultats de J7	7
Sur ces boîtes du J7, nous pouvons voir des colonies de <i>S. aureus</i> . Sur la droite la gélose a étéensemencer avec la formulation à l'éthanol. Sur la gélose de gauche a étéensemencer avec la formulation à l'huile essentielle.....		7
III-1-2-	Résultats de J14	9
III-1-3-	Résultats de J28	10
III-1-4-	Résultats de J7 avec le cosgard.....	12
III-2-	Test de stabilité.....	13
IV-	Discussion	16
IV-1-	Challenge test	16
IV-2-	Test de stabilité.....	17
V-	Bibliographie.....	19

I- INTRODUCTION

I-1- Notre projet

Étant utilisée dans de nombreux produits cosmétiques, nous avons choisi d'utiliser de la criste marine pour réaliser un gel, tout en y ajoutant les effets bénéfiques de l'aloë Vera. Dans ce document, nous allons présenter les propriétés de la criste marine et de l'aloë Vera, le mode opératoire pour réaliser notre gel, ainsi que les tests que nous avons réalisés pour avoir un produit cosmétique : le challenge test et le test de stabilité.

En réalisant ce projet nous souhaitons répondre à la problématique suivante :

Comment peut-on utiliser les propriétés de la criste marine pour réaliser un produit cosmétique ?

I-2- Gestion du projet

Pour mener à bien notre projet et pouvoir répondre à la problématique posée, nous avons créé un document indiquant les tâches à réaliser. Premièrement, nous sommes allés chercher la criste marine au bord de l'océan afin de pouvoir faire des macérats. Par la suite, nous avons fait des recherches bibliographiques afin de pouvoir commencer la rédaction de la synthèse à rendre en S3. Nous nous sommes répartis en petits groupes pour rédiger la synthèse. Des recherches ont été faites sur la réalisation du produit cosmétique à base de criste marine et d'aloë Vera ainsi que des tests à réaliser : challenge tests et tests de stabilité. Après de nouvelles recherches pour les deux tests à réaliser, nous avons rédigé le protocole expérimental. Ensuite, nous avons divisé le groupe en deux, une partie a réalisé le challenge test et l'autre partie le test de stabilité. Pour cela, nous avons obtenus quelques indications de la part de Mme Martinel ainsi que de la technicienne ce qui nous a permis d'avoir le matériel nécessaire et de réaliser nos tests en autonomie.

I-3- La Criste marine

La criste marine, de son nom latin *Crithmum maritimum*, fait partie de la famille botanique des apiaciées. (1) C'est une plante vivace charnue, glabre (se dit d'un organe végétal dépourvu de poils), de 15 à 50 cm de haut et à base ligneuse. Elle est de couleur vert-gris à vert foncé mais les jeunes feuilles peuvent être rougeâtres. Elle est halophile, c'est-à-dire qu'elle se développe dans les milieux contenant de fortes concentrations en sel.

La criste marine possède certaines vertus médicinales. En effet, l'infusion de criste marine est un diurétique utilisé notamment contre les œdèmes, et anthelminthique, c'est-à-dire vermifuge, bien que les graines soient davantage renommées pour tuer les vers. La plante a des propriétés toniques, stimulantes (au niveau thyroïdien), reconstituantes et antiscorbutiques (2).

La criste marine est également riche en iode et en potassium, elle renferme une essence aromatique, du chlorure de sodium, d'autres minéraux et des vitamines, en particulier de la vitamine C (3).

I-4- L'Aloé Vera

L'Aloe Vera est une plante utilisée depuis plus de 2000 ans pour ses bienfaits thérapeutiques. La feuille et en particulier le gel et le latex (ou sève) sont les plus utilisés. La méthode d'extraction est extrêmement importante car elle définit la qualité de l'extrait. La feuille doit être conservée au frais et utilisée le plus rapidement possible puis s'ensuit une série de découpes, filtrations et traitements chimiques afin d'obtenir le gel puis l'extrait sec d'Aloe Vera (4).

Plus de 200 substances sont présentes dans le gel d'Aloe Vera. Les polysaccharides sont majoritaires mais il est aussi possible de retrouver des protéines, des glycoprotéines, des vitamines, des minéraux, des enzymes ainsi que des substances à bas poids. La composition peut énormément varier d'une plante à l'autre suivant sa situation géographique, son âge ou la saison. Il est donc impossible de caractériser chaque élément.

L'Aloe Vera est très utilisé dans le domaine cosmétique puisqu'elle a une activité hydratante mais aussi cicatrisante et anti-inflammatoire sans pour autant être toxique. Il faut cependant faire attention à la qualité de l'extrait car dans le commerce il est souvent altéré ou modifié.

II- MATERIEL ET METHODES

II-1- Réalisation du produit cosmétique :

-réalisation d'un gel (5)

II-2- Réalisation des macérats

Tout d'abord, nous avons ramassé de la criste marine au bord de l'océan pour la faire sécher et l'utiliser pour les macérats. Nous l'avons mise à macérer durant trois semaines dans différentes solutions :

-éthanol à 90°, 70° et 50°C

-glycérol à 90°, 70° et 50°C

-huile de Colza

II-3- Formulations

Afin de préparer nos formulations, nous nous sommes référencé par rapport au réglementations concernant les produits cosmétiques (6).

Nous avons réalisé 4 formulations différentes :

- o 60 ml gel d'Aloé Vera et 1 goutte d'huile essentielle de criste marine
- o 60 ml gel d'Aloe Vera et 2 ml du macérat comportant du glycérol à 50%
- o 60 ml gel d'Aloe Vera et 2 ml du macérat comportant de l'éthanol à 50%
- o 60 ml gel d'Aloé Vera et 1 goutte d'huile essentielle de criste marine et 3 gouttes de Cosgard

Le Cosgard est un conservateur antibactérien et antifongique qui assure la conservation de toutes les préparations contenant une phase aqueuse.

Pour un produit cosmétique pour le visage, 1% d'huile essentielle suffit, la dose est ici adaptée pour l'utilisateur. En effet, à trop forte dose une huile essentielle peut entrainer une irritation de

la peau et des muqueuses. L'utilisation d'une faible dose est avantageuse car le coût de l'huile essentielle est assez élevé.

II-4- Test à réaliser pour la validation du produit : Challenge test

Le challenge test est essentiel pour la création d'un produit cosmétique.

Le challenge test est une technique permettant de déterminer l'efficacité antimicrobienne d'un produit en utilisant différents germes microbiens en quantité connue (bactéries, levures, moisissures, etc.) sur ce produit, puis de les dénombrer après un certain temps (7).

II-4-1- Matériel

-60 boîtes de pétri (dénombrement à réaliser en double pour chaque formulation, puis pour 3 souches différentes à J7, J14 et J28)

-18 ml de la formulation avec l'éthanol

-18 ml de la formulation avec le glycérol

-24 ml de la formulation avec l'huile essentielle

-12 ml de la formulation avec l'huile essentielle et le Cosgard

-Gélose TCS en surfusion

-Souches : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*

-Bouillon eugon pour introduire les souches dans les formulations.

II-4-2- Méthode

Nous avons récupéré grâce à nos professeurs un protocole suivant les normes AFNOR NF T75-611 (8) que nous avons suivi le plus précisément possible en étant aidé par une préparatrice et un professeur. Nous avons déposé à l'aide d'une pipette 1 ml des différentes formulations. Dans chacune des formulations nous avons introduit $3 \cdot 10^5$ UFC/ml de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, $1 \cdot 10^5$ UFC/ml de la souche *Staphylococcus aureus*, et $2 \cdot 10^5$ UFC/ml de la

souche *Candida Albicans*. Nous avons donc 3 boîtes pour chaque formulation contenant chacune une souche.

Ensuite, nous avons coulé des géloses TCS en surfusion. Les géloses en surfusion ont étéensemencées dans la masse avec du bouillon eugon contenant les 1 ml de bactéries (*P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. albicans*)

Nous avons incubé les boîtes à 37°C pendant 48H.

Cette manipulation a été répétée pendant 28 jours, tous les 7 jours afin d'observer l'évolution des bactéries (J7, J14 et J28).

En parallèle nous avons fait une autre formulation avec du cosgard et de l'huile essentielle en prévision des mauvais effets bactéricides et conservateurs de la criste marine.

II-5- Test à réaliser pour la validation du produit : test de stabilité

L'étude de stabilité est une technique permettant de déterminer la durée de conservation d'un produit et d'évaluer si un produit est stable lorsqu'il est soumis aux conditions de commercialisation. Les « conditions de commercialisation » comprennent la distribution (le transport), le stockage en entrepôt et les conditions d'utilisation. Pour cela, il suffit de laisser le produit à des températures différentes afin d'étudier sur le long terme les changements de concentrations, de pH, viscosités, etc... (8).

II-5-1- Matériel

10 boîtes de pétri dont :

-2 pour tester à température ambiante à l'abri du soleil

-2 pour tester à température ambiante devant une fenêtre pour la lumière

-2 dans un incubateur à 37°C

-2 pour tester au réfrigérateur

-32 ml de chaque formule à tester

-bandelettes pH

II-5-2- Méthode

Pour ce test de stabilité, nous avons introduit 8 ml de chaque formule à tester dans des boîtes de pétri. Pour chaque formulation, nous avons mis une boîte au réfrigérateur, une boîte à 37°C, une boîte à température ambiante à la lumière et une autre à température ambiante à l'abri de la lumière. L'évolution des boîtes a été observée pendant 28 jours afin de déterminer si les formulations se sont détériorées.

Lors de la création d'un produit cosmétique, il est nécessaire d'assurer la sécurité du consommateur, pour cela, la réalisation de ces deux tests est indispensable. Ce sont des tests qui appartiennent à la catégorie de conservation du produit, nous trouvons ces tests très pertinents puisqu'ils se déroulent dans le temps et permettent d'observer une évolution. La méthode est assez simple et permet d'observer des résultats clairs et faciles à interpréter.

III- RÉSULTATS

III-1- Challenge test

Après 48h d'incubation nous avons pris des photos des résultats pour chaque jour. Toutes les photos ne sont pas présentes étant donné la quantité de gélose (60 géloses.)

III-1-1- Résultats de J7

Sur ces boîtes du J7, nous pouvons voir des colonies de *S. aureus*. Sur la droite la gélose a étéensemencée avec la formulation à l'éthanol. La gélose de gauche a étéensemencée avec la formulation à l'huile essentielle.



Figure 1 : Colonies de *S. aureus* dans une géloseensemencée avec la formulation à l'éthanol.



Figure 2 : Colonies de *S. aureus* dans une géloseensemencée avec la formulation à l'huileessentielle

Sur ces boîtes du J7 avec *S. aureus* le nombre de colonies est beaucoup trop élevé car il devrait être inférieur à 300 colonies pour que le challenge test soit validé. Tout comme les boîtes contenant *P. aeruginosa* et *C. albicans* le nombre de colonies est bien trop élevé pour que le challenge test soit validé au jour 7. C'est pour cette raison que nous avons continué le challenge test au jour 14.

Sur ces boîtes de J7 nous pouvons observer *P. aeruginosa*. Sur la droite il s'agit des boîtesensemencées avec la formulation à l'éthanol et sur la gauche une boîteensemencée avec la formulation à l'huile essentielle.



Figure 3 : Colonies de *P. aeruginosa* dans une gélloseensemencée avec la formulation à l'éthanol.

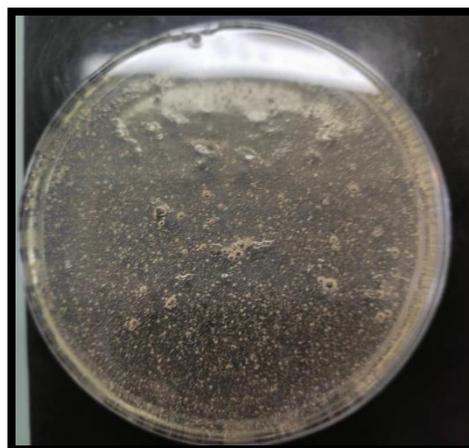


Figure 4 : Colonies de *P. aeruginosa* dans une gélloseensemencée avec la formulation à l'huile essentielle.

Pour finir le J7, les dernières boîtes sontensemencées avec *C. albicans*. Sur la droite il y a une gélloseensemencée avec la formulation à l'éthanol et sur la gauche il y a une gélloseensemencée avec la formulation de l'huile essentielle.



Figure 5 : Colonies de *C. albicans* dans une gélloseensemencée avec la formulation à l'éthanol.

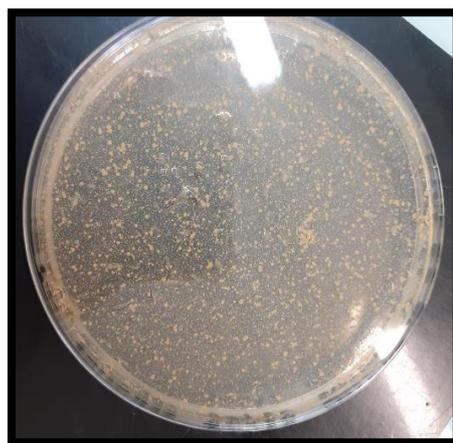


Figure 6 : Colonies de *C. albicans* dans une gélloseensemencée avec la formulation à l'huile essentielle.

III-1-2- Résultats de J14

Pour le J14 nous présentons toutes les photos pour se rendre compte du nombre de colonies présentes sur les géloses.

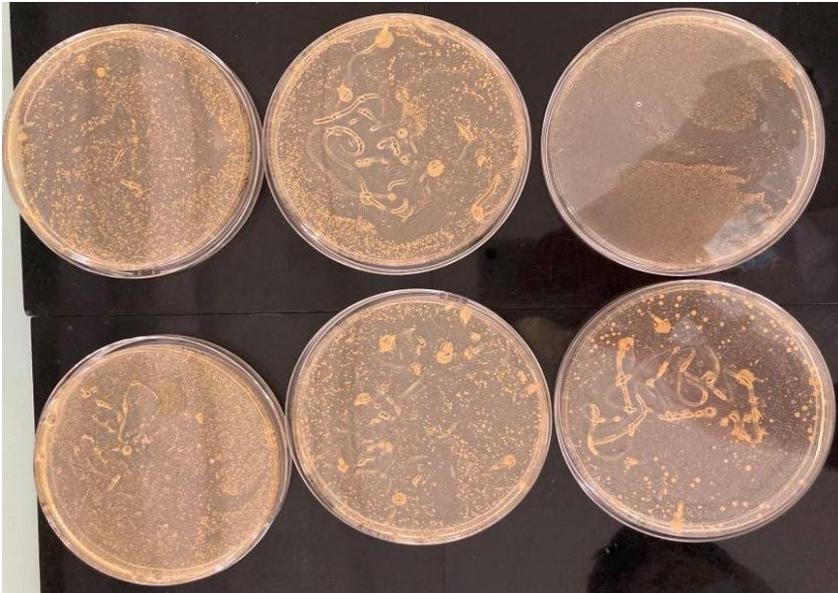


Figure 7 : Six boîtes représentant les colonies de *S. aureus*ensemencées avec différentes formulations.

Colonne 1 : Géloses ensemencées avec la formulation à l'éthanol.

Colonne 2 : Géloses ensemencées avec la formulation à l'huile essentielle.

Colonne 3 : Géloses ensemencées avec la formulation au glycérol.

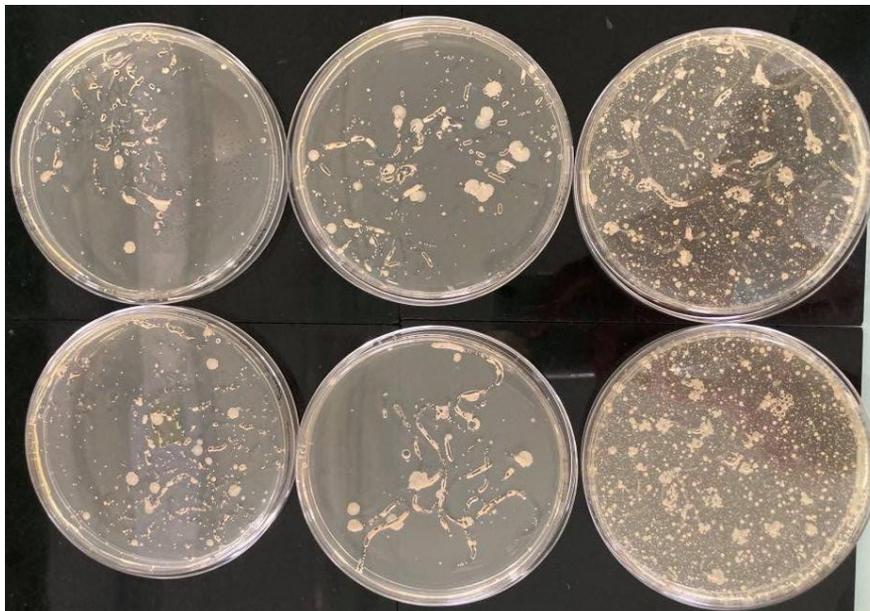
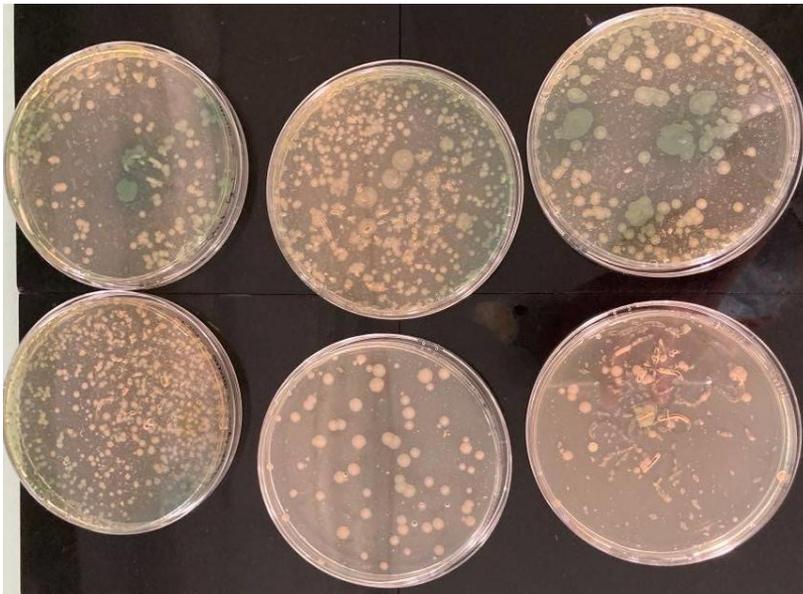


Figure 8 : Six boîtes représentant les colonies de *C. albicans*ensemencées avec différentes formulations.

Colonne 1 : Géloses ensemencées avec la formulation à l'éthanol.

Colonne 2 : Géloses ensemencées avec la formulation à l'huile essentielle.

Colonne 3 : Géloses ensemencées avec la formulation au glycérol.



Colonne 1 : Gélosesensemencées avec la formulation à l'éthanol.

Colonne 2 : Gélosesensemencées avec la formulation à l'huile essentielle.

Colonne 3 : Gélosesensemencées avec la formulation au glycérol.

Figure 9 : Six boîtes représentant les colonies de *P. aeruginosa*ensemencées avec différentes formulations.

Ces photos prouvent bien que la criste marine à un mauvais effet bactéricide et qu'il faut ajouter un conservateur et un bactéricide/fongicide. Nous avons quand même continué le challenge test sans conservateur et avec bactéricide/ fongicide.

III-1-3- Résultats de J28

Pour finir notre challenge test nous avons fait un J28. Nous ne sommes pas allés plus loin que J28 car il nous aurait fallu plus de temps (3 mois pour l'étape suivante du challenge test).

Sur ces figures nous pouvons voir les gélosesensemencées avec *S. aureus* avec la formulation à l'éthanol à droite et à l'huile essentielle à gauche. On peut voir que les colonies sont beaucoup moins présentes que les jours précédents. Les effets bactéricides commencent à faire effet.

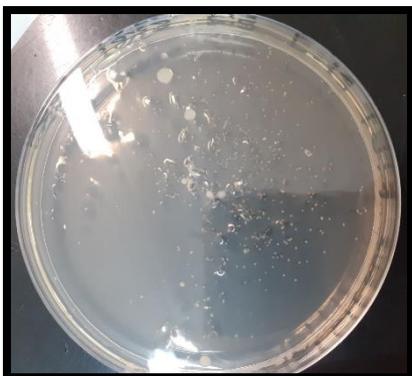


Figure 10 : Boîtesensemencées avec la formulation à l'éthanol avec *S. aureus*



Figure 11 : Boîtesensemencées avec la formulation à l'huile essentielle avec *S. aureus*.

Sur ces figures nous pouvons voir les géloses ensemencées avec *P. aeruginosa*. A droite la gélose a été ensemencée avec la formulation à l'éthanol. La figure de gauche a été ensemencée avec la formulation l'huile essentielle.

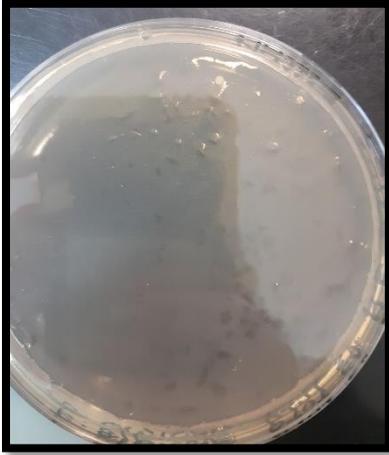


Figure 12 : Boîtes ensemencées avec la formulation à l'éthanol avec *P. aeruginosa*.



Figure 13 : Boîtes ensemencées avec la formulation à l'huile essentielle avec *P. aeruginosa*.

Sur ces figures nous pouvons voir les géloses ensemencées avec *C. albicans*. La figure de droite représente la gélose ensemencée avec la formulation à l'éthanol. La gélose de gauche a été ensemencée avec la formulation à l'huile essentielle de criste marine. Nous pouvons voir ici que la criste marine n'a pas un assez bon effet bactéricide.



Figure 14 : Boîtes ensemencées avec la formulation à l'éthanol avec *C. albicans*



Figure 15 : Boîtes ensemencées avec la formulation à l'éthanol avec *C. albicans*

III-1-4- Résultats de J7 avec le cosgard

Nous avons ensemencé des géloses avec du cosgard car les effets bactéricides/fongicides de la criste marine sont très peu efficaces. Nous avons ensemencé les géloses avec de l'huile essentielle de criste marine car elle a le meilleur effet bactéricide et fongicide, nous voulions utiliser le moins possible le cosgard. La gélose de droite a été ensemencée avec la formulation à l'huile essentielle et *S. aureus*. La gélose de gauche a été ensemencée avec la formulation à l'huile essentielle et *P. aeruginosa*. La dernière gélose a été ensemencée avec la formulation à l'huile essentielle et *C. albicans*.

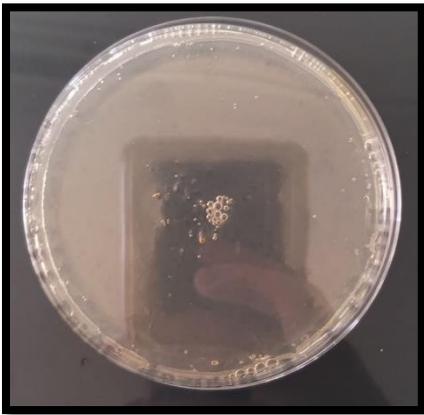


Figure 16 : Boîtes ensemencées avec la formulation à l'huile essentielle avec *S. aureus*

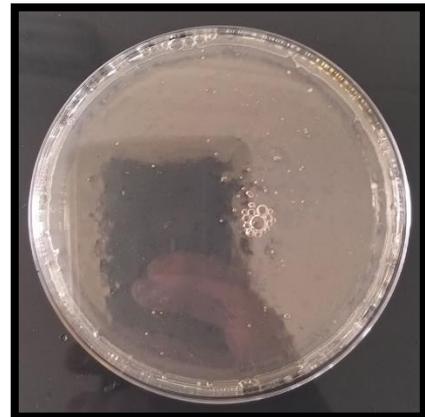


Figure 17 : Boîtes ensemencées avec la formulation à l'huile essentielle avec *P. aeruginosa*



Figure 18 : Boîtes ensemencées avec la formulation à l'huile essentielle avec *C. albicans*

Avec le cosgard les bactéries et les levures ne se multiplient pas. Elles sont même tuées par celui-ci. Sans Cosgard, il faut attendre 28 jours pour que l'effet bactéricide de la criste marine fasse effet. Avec le cosgard en seulement 7 jours toutes les bactéries ont disparues.

Tableau 1 : Synthèse des résultats du nombre de colonies présentes sur les boîtes après 28 jours d'incubation

Microorganisme utilisé	S. aureus		P. aeruginosa		C.albicans	
	Boîte 1	Boîte 2	Boîte 1	Boîte 2	Boîte 1	Boîte 2
Formulation à l'éthanol	273	265	28	36	31	43
Formulation au glycérol	168	184	Incomptable	Incomptable	Incomptable	Incomptable
Formulation à l'huile essentielle	101	98	Incomptable	Incomptable	Incomptable	Incomptable

III-2- Test de stabilité

Nous avons noté les aspects de chacune de nos formulations puis nous les avons incubées pendant 28 jours, nous avons noté les changements lors du 7^{ème} et 28^{ème} jour :

Tableau 2 : Synthèse des résultats d'observation des caractéristiques des formulations avant incubation

	Ethanol	Huile essentielle	Glycérol
pH	6	7	6
Apparence	Légèrement brun, translucide	Légèrement blanchâtre, translucide	Légèrement brun et translucide
Odeur	Criste marine	Criste marine	Criste marine
Viscosité	Liquide	Liquide	Liquide

Tableau 3 : Synthèse des résultats d'observation des changements des formulations après 7 jours.

	Ethanol	Huiles essentielles	Glycérol
Température ambiante à la lumière ambiante	Pas de changement	Gélification de la formulation, buée sur la boîte de pétri, aspect crémeux	Coloration devenu marron
Température ambiante dans le noir	Pas de changement	Gélification de la formulation, buée sur la boîte de pétri, aspect crémeux	Coloration devenu marron
Dans le frigo (4°C)	Pas de changement	Gélification de la formulation, buée sur la boîte de pétri, aspect crémeux	Coloration devenu marron claire
En Incubateur (37°C)	Coloration devenu marron, traces de plis en racines	Plis blancs	Coloration devenu marron

Tableau 4 : Synthèse des résultats d'observation des changements des formulations après 28 jours

	Ethanol	Huile essentielle	Glycérol
Température ambiante à la lumière	Trace de plis coloration devenue marron	Pas de changement	Coloration devenue marron foncé
Température ambiante dans le noir	Trace de plis coloration devenue marron	Pas de changement	Coloration devenue marron foncé
Dans le réfrigérateur (4°C)	Trace de plis, coloration devenue marron	Pas de changement	Coloration devenue marron foncé
En incubateur (37°C)	Allongement des plis	Gélification de la formulation	Coloration devenue marron foncé



- Boîte de droite : Huile essentielle
- Boîte au centre : éthanol
- Boîte de gauche : glycérol

Figure 19 : Photographie des formulations après 7 jours d'incubation dans un incubateur à 37°C.

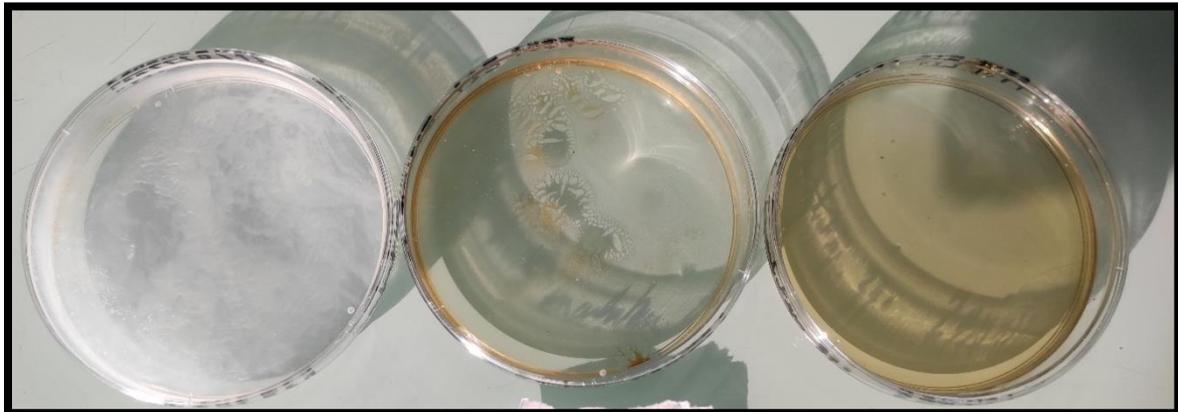


Figure 20 : Photographie de la formulation à l'éthanol après 28 jours d'incubation dans l'incubateur à 37°C. De gauche à droite : huiles essentiels, éthanol, glycérol.

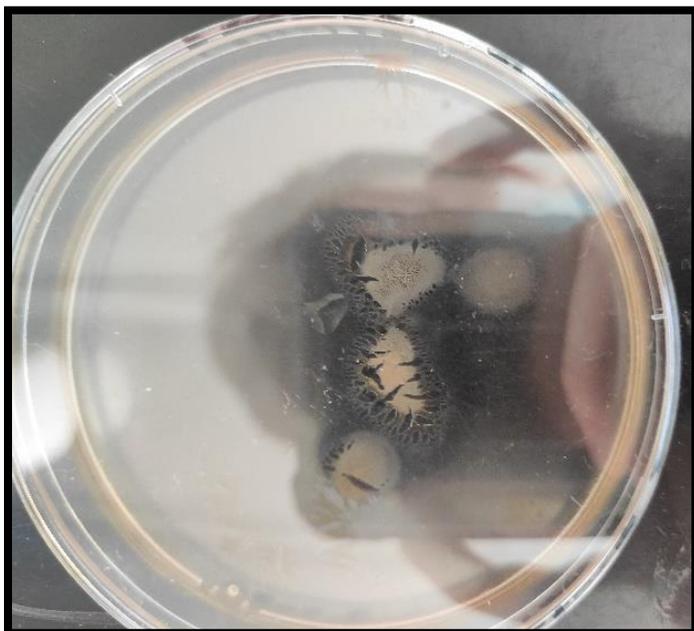


Figure 21 : photographie de la formulation avec éthanol après 28 jours d'incubation dans l'incubateur à 37°C, on peut apercevoir la forme de plis formé plus précisément.

IV- Discussion

IV-1- Challenge test

Pour commencer, le protocole utilisé et les normes en vigueur avec ce dernier ne sont plus d'actualité, par manque de moyen et aussi d'information, nous n'avons pas pu prendre le dernier protocole sorti et nous avons continué avec celui utilisé lors des travaux pratiques des étudiant en I.A.B.

Nous devons, pour le challenge test, calculer les réductions logarithmiques de nos souches. Ensuite, nous devons les comparer à un référentiel (9) pour donner une note de qualité (soit le critère A pour excellent ou B pour convenable) à nos formulations afin de vérifier la conformité de nos formulations suivant les normes de qualité de produits cosmétiques.

Les boîtes ont pu être comptées seulement après le 28^{ème} jour. Elles n'entrent dans aucun critère de norme, nos formulations ne peuvent donc pas passer le contrôle qualité et sont par conséquent rejetées.

Pour la formulation d'huile essentielle avec l'ajout de cosgard, nous n'avons plus de colonies présentes dans les boîtes dès les premiers jours, ce qui fait qu'il n'est pas possible de fournir de données statistiques, mais nous pouvons tout de même confirmer que ce type de formulation entre dans les normes du challenge test. Ce résultat semble logique étant donné que ce produit a été confectionné afin d'avoir un bon effet conservateur, fongicide et bactéricide. De plus le cosgard est utilisé dans la plupart des cosmétiques (11) et le plus souvent dans les produits bio. Par manque de temps, nous n'avons pas pu tester l'effet du cosgard en réalisant les formulations avec les macérats de glycérol et éthanol, des manipulations supplémentaires sont donc envisageables.

Pour comparer nos résultats, une étude a notamment démontré les effets de différentes substances sur les bactéries et champignons en faisant un challenge test (10). Pour l'éthanol, ils ont noté un critère A, nous n'avons pas trouvé cela dans notre formulation qui en contient. Des recherches supplémentaires pourraient donc être faites pour confirmer nos données et expliquer pourquoi la criste marine n'a eu aucun effet fongicide et bactéricide même combiné avec l'éthanol, avec le glycérol et les huiles essentielles.

Nous pouvons comparer les effets antimicrobiens de la criste marine, avec ceux du calendula (*C. officinalis*) qui est notamment connu en médecine, agroalimentaire et aussi cosmétique (12) pour ces nombreux effets dermatologiques, anti-inflammatoires et surtout antimicrobiens. Etant donné la difficulté de trouver des résultats de challenge test de formulations commercialisées, nous pouvons cependant affirmer que le *C. officinalis*, selon son utilisation se rapproche du critère A.

IV-2- Test de stabilité

Avant d'évaluer les résultats obtenus lors du test de stabilité, nous devons nous référer à la norme ISO/TR 18811:2018 (13). Il est écrit que l'évaluation ne nécessite pas de résultats statistiques (étant donné que l'observation est seulement visuelle) et que la prise de décision sur la conclusion de la stabilité du produit est propre à l'observateur. Nous avons donc comparé les résultats avec les informations publiques données par le conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (14).

En comparant les dégradations de nos différentes formulations, il semble apparent que celle contenant du glycérol soit la plus stable (seulement un changement de couleur). Cependant, par manque de temps, nous n'avons pu faire qu'un seul mois de test de stabilité alors qu'il aurait fallu faire 6 à 12 mois consécutifs (selon les conditions de stockage) afin de pouvoir prendre une décision sur la conformité de la stabilité. Il aurait fallu arriver au terme du test de stabilité pour pouvoir déterminer la date de péremption.

Nous n'avons pour ce test aucun document à comparer étant donné la grande difficulté de trouver des résultats de produits actuellement commercialisés. Il faudrait retrouver exactement le même test avec les mêmes formulations et conditions de stockage.

En plus de ces deux tests, il aurait été préférable de faire un test de vieillissement microbiologique (15) en suivant les normes NF V01-003. Ceci aurait pu permettre de trouver la date de péremption de nos formulations en cherchant le développement de germes mais par souci de temps et d'organisation cela n'a pu être possible. Des études dans cette direction seraient donc à prévoir afin de mieux conclure sur la qualité de nos formulations.

Nos tests ont démontré que les effets bactéricides et fongicides de la criste marine sont insuffisants pour nos formulations cosmétiques. Il faudrait acquérir des données supplémentaires de l'interaction entre notre plante et les autres solutions utilisées (éthanol, huiles essentielles et glycérol) afin de comprendre et corriger ce problème. Cependant, l'ajout de Cosgard semble intéressant pour acquérir les propriétés souhaitées tout en gardant l'intégrité et les autres effets bénéfiques de la criste marine. Le glycérol, quant à lui, semble être la meilleure des trois solutions en termes de conservation.

V- Bibliographie

- (1)- Binette et Jardin édité par My Beautiful Company ; Criste marine (Crithmum maritimum) fenouil marin ou céleri de mer (2020) : <https://jardinage.lemonde.fr/dossier-2030-criste-marine.html> consulté le 5 décembre 2020
- (2)- Laboratoire Altho ; Criste marine bio (2018) : <https://www.laboratoirealtho.fr/fr/criste-marinebio> consulté le 5 décembre 2020
- (3)- Collectif thérapeute doctornat ; Criste marine (Crithmum maritimum): propriétés et vertus (2020) : <https://doctonat.com/criste-marine-proprietes-vertus/> consulté le 5 décembre 2020
- (4)- Laura Soriano ; Aloe vera (2016) <https://sccquebec.org/wpcontent/uploads/2017/08/Aloe-Vera-Laura-Soriano-2016.pdf> consulté le 5 décembre 2020
- (5)- Recettes et tutos, aroma-zone (2021) : <https://www.aroma-zone.com/> consulté le 8 décembre 2020
- (6)-article CE n°1223/2009 (2009): [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Surveillance-dumarche-des-produits-cosmetiques/Reglementation-des-produitscosmetiques/\(offset\)/3](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Surveillance-dumarche-des-produits-cosmetiques/Reglementation-des-produitscosmetiques/(offset)/3) consulté le 15 décembre 2020
- (7)-Pauwels, M., Rogiers, V.; Safety evaluation of cosmetics in the EU: Reality and challenges for the toxicologist (2004): <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-2942576117&doi=10.1016%2fj.toxlet.2004.01.026&partnerID=40&md5=32d92e2e8e7792cbb6ca7b01c02328a2> ; DOI: [10.1016/j.toxlet.2004.01.026](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.026). consulté le 5 décembre 2020
- (8)- Norme AFNOR NF T75-611 de Juillet 2007 ; Cosmétiques Microbiologie Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique, ICS : 07.100.99 ; 71.100.70 ; <https://www.boutique.afnor.org/xml/869062/false> Cf annexe 1 ; consulté le 2 février 2021
- (9)- Michel Botin (Albhades Provence) Normes, Un référentiel essentiel au contrôle qualité cosmétique (2014) ; <http://www.albhades.com/wp-content/uploads/2014/12/Analyses-microbiologiques-cosm%C3%A9tiques.pdf> consulté le 25 mars 2021
- (10)-Kočevar Glavač, N., Lunder, M.; Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion (2018):

https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2s2.085050024281&doi=10.1111%2fics.12461&partnerID=40&md5=9fc8af356c9131c8b1_43f9babec4ad1f ; DOI: 10.1111/ics.12461
consulté le 5 décembre 2020

(11)- Dnil, E., Moldovan, Z., Albu Kaya, M.G., Ghica, M.V.

Formulation and characterization of some oil in water cosmetic emulsions based on collagen hydrolysate and vegetable oils mixtures (2019).

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85069643491&doi=10.1515%2fpac-2018-0911&partnerID=40&md5=2971b70ae526b495ad64ce86d8700b2b>; DOI: 10.1515/pac-2018-0911 consulté le 5 décembre 2020

(12)- Szopa, A., Klimek-Szczykutowicz, M., Jafernik, K., Koc, K., Ekiert, H. ; Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) – A position in classical phytotherapy and newly documented activities (2020).

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2s2.085090722416&doi=10.24326%2fasphc.2020.3.5&partnerID=40&md5=197d0a38abc4a8e68a5ffba906e18adf> DOI:10.24326/asphc.2020.3.5 consulté le 5 décembre 2020

(13)-Norme ISO/TR 18811:2018 sur les cosmétiques , Lignes directrices relatives aux essais de stabilité des produits cosmétiques (2018) ;

<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:18811:ed-1:v1:fr> consulté le 2 février 2021

(14)- Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain, Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2) (2003) ;

<https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf> consulté le 25 mars 2021

(15)- Norme AFFNOR NF V01-003 de Décembre 2018 ; Lignes directrices pour la réalisation de tests de vieillissement microbiologique, ICS : 07.100.30 ; 67.020 ;

<https://www.boutique.afnor.org/xml/1969845/false> consulté le 2 février 2021

VI- Index des tableaux.

Tableau 1 : Synthèse des résultats du nombre de colonies présentes sur les boîtes après 28 jours d'incubation.....	13
Tableau 2 : Synthèse des résultats d'observation des caractéristiques des formulation après 7 jours.....	13
Tableau 3 : Synthèse des résultats d'observation des changements des formulations après 7 jours.....	14
Tableau 4 : Synthèse des résultats d'observation des changements des formulations après 28 jours.....	14

Annexe 1- protocole du challenge test.

Protocole d'essai

1 Déconditionnement et répartition du produit à tester

Chaque souche, aliquoter la formulation à tester (au minimum 20 ml ou 20 g) en récipients de verre stérile.

Inoculation des microorganismes tests

Chaque souche, ajouter dans chaque récipient un volume défini d'inoculum calibré (voir 5.3.1) afin d'obtenir la concentration finale dans la formulation d'environ 10^6 ufc par ml ou g pour les bactéries, 10^5 ufc par ml ou g pour la levure et 10^4 ufc par ml ou g pour la moisissure. Le volume de la suspension calibrée est au maximum 1 % du poids de la formulation. Mélanger soigneusement pour assurer une répartition homogène.

Un prélèvement (T_0) peut être effectué immédiatement (témoin d'inoculation) et dénombré (N_0) comme indiqué à 3.1. Dans ce cas, la valeur du dénombrement (N_0) peut être utilisée pour calculer la réduction (voir 5.4.3).

Incubation

Placer les récipients contenant la formulationensemencée à $22,5 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$ et à l'abri de la lumière pendant 28 jours.

5.3.2.4 Prélèvements et dénombrements

a) À différents intervalles de temps (temps de prélèvement), 7 jours (T 7), 14 jours (T 14) et/ou 28 jours (T 28)) en fonction de la nature des souches test et des objectifs de l'essai, prélever 1 g ou 1 ml de la formulation inoculée.

Transférer chaque prélèvement dans 9 ml de neutralisant. Mélanger jusqu'à homogénéisation. Éventuellement, réaliser une 2^e dilution au 1/10 dans le neutralisant, si la validation de l'essai a été obtenue avec la formulation diluée au 1/100.

NOTE 1 Tout autre facteur de dilution est admis dès lors qu'il est au moins au 1/10, que la neutralisation est validée (voir Annexe A) et qu'il est pris en compte dans les calculs de dénombrement (voir 5.4.2).

Laisser en contact 30 min \pm 15 min à température ambiante puis effectuer des dilutions décimales successives dans le diluant :

- pour les bactéries, jusqu'à 10^{-3} et 10^{-4} (ou 10^{-2} et 10^{-3} si la validation est obtenue au 1/100) ;
- pour les levures, jusqu'à 10^{-2} et 10^{-3} (ou 10^{-1} et 10^{-2} si la validation est obtenue au 1/100) ;
- pour les moisissures, jusqu'à 10^{-1} et 10^{-2} (ou pas de dilution et 10^{-1} si la validation est obtenue au 1/100).

b) Réaliser les dénombrements microbiens par inclusion, en double, de 1 ml de chaque dilution en milieu gélosé approprié (TSA pour les bactéries, SD pour la levure ou MEA pour la moisissure).

NOTE 2 Pour faciliter le comptage, il est possible de répartir chaque prélèvement de 1 ml sur 2 boîtes de Pétri, soit 4 boîtes pour un dénombrement en double.

NOTE 3 Un dénombrement unique est justifié pour les essais de conception ou en fonction de résultats antérieurs ou encore si plusieurs dilutions successives sont ensemencées.

Incuber à $32,5 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$ pendant 48 h pour les bactéries et la levure et à $30 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$ pendant 3 j à 5 j pour la moisissure.

NOTE 4 D'autres méthodes (étalement, filtration sur membrane) sont utilisables et nécessitent une adaptation appropriée pour respecter les paramètres indiqués ci-dessus.

5.4 Résultats de l'essai

Après incubation, dénombrer les colonies sur les différentes boîtes ensemencées. Pour tous les dénombrements retenir les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies pour les bactéries et les levures et entre 15 et 150 colonies pour les moisissures.

Vérifier que les conditions de l'essai ont été validées conformément aux prescriptions indiquées en Annexe A. Au cas où la validation n'aurait pas pu être obtenue pour certaines souches, voir 5.5.2.

Déterminer le nombre de microorganismes présents dans l'échantillon au temps 0 ($N/100$ ou N_0 (voir 5.3.2.2 Note)) et (N_x) le nombre de survivants à chaque temps de prélèvement. Évaluer l'évolution du nombre de microorganismes à chaque temps.

5.4.1 Détermination du nombre de microorganismes inoculés (N_i)

a) Calculer N le nombre de microorganismes présents dans la suspension inoculée en ufc/ml à l'aide de l'équation suivante :

$$N = C / V \times d$$

où :

C est la moyenne du nombre de colonies comptées sur les 2 boîtes ;

V est le volume d'inoculum ensemencé par boîte ;

d est le taux de la dilution retenue pour effectuer les comptages ;

d doit être environ 10^8 ufc/ml pour les bactéries, environ 10^7 ufc/ml pour les levures et environ 10^6 ufc/ml pour les moisissures.

Déterminer N_i soit par calcul ($N_i = N/100$), soit à partir du dénombrement réalisé à T_0 ($N_i = N_0$). N_i doit être environ de 10^6 ufc/ml ou g pour les bactéries, de 10^5 ufc/ml ou g pour les levures et de 10^4 ufc/ml ou g pour les moisissures.