

Évaluation des propriétés bactériostatiques d'un extrait de houblon enrichi en acide bêta dans le cadre d'un usage cosmétique

Ir C. SERGENT - L. DURIEUX - Ing. C. SAUSSEZ - Ir V. JERKOVIC
HELHa – Mons

L'étude menée ici tentera d'évaluer les propriétés bactériostatiques des acides bêta du houblon, dans le cadre d'une utilisation comme conservateur naturel dans des crèmes cosmétiques. La méthode du « challenge test » sera appliquée afin de vérifier l'efficacité du conservateur. Deux méthodes seront comparées : le « challenge test » en conditions contrôlées au laboratoire et le « challenge test » en conditions réelles.

Mots-clefs : houblon, acides bêta, challenge test, cosmétique, bactériostatique

The goal of this study is to evaluate the bacteriostatic properties of hop beta acids, when added to cosmetic cream as a preservative. The preservative efficiency will be evaluated via a challenge test. Two methodologies will be compared : a challenge test in the lab (standardized conditions) and a challenge test in field conditions.

Keywords : hop, beta acids, challenge test, cosmetics, bacteriostatic

1. Introduction

La société actuelle consomme de plus en plus de produits plus naturels, et le domaine de la cosmétique n'échappe pas à cette tendance. C'est pourquoi les formulateurs de cosmétiques cherchent fréquemment à remplacer les substances synthétiques dans leurs produits par des substituts naturels [1]. Parmi les agents de formulation les plus difficile à remplacer, se trouvent les conservateurs. Souvent décriés, leur usage et le nombre de molécules autorisées est sans cesse restreint par la législation. Il est impératif de proposer des alternatives naturelles rapidement.

Le houblon est une plante réputée pour ses propriétés amérisantes et aromatiques en brasserie mais elle possède également de nombreuses autres propriétés intéressantes : anti-inflammatoires, sédatives, antioxydantes, oestrogéniques et antimicrobiennes [2]. Les propriétés antimicrobiennes du houblon sont principalement attribuées aux acides amers, et plus particulièrement aux acides alpha et bêta, qui présentent une activité antibactérienne et antifongique. Les acides bêta sont très efficaces, et plus particulièrement contre les bactéries gram positives [2].

Le pôle biotechnologie du CeREF Technique a mis au point une poudre à base de houblon, enrichie en acides bêta, dans le but de profiter des propriétés antibactériennes du houblon, sans concurrencer le domaine brassicole, grand consommateur d'acides alpha. En raison de ses propriétés antimicrobiennes, cet extrait naturel a été intégré dans des crèmes cosmétiques dans le but d'agir en tant que conservateur.

Les contaminations dans un produit cosmétique peuvent survenir lors de la production (air ambiant, manipulateur, matériel utilisé, matières premières) ou lors de l'utilisation du produit par le consommateur. Après la production d'un produit, les contaminations bactériennes sont plus courantes que les contaminations fongiques. Les *Pseudomonas* sont fréquemment isolées dans les cosmétiques non utilisées et ont une origine hydrique. Les autres contaminations sont généralement dues à des *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* et *Clostridium*. Lors de l'utilisation, les contaminations les plus fréquentes proviennent de *Staphylococcus* et de moisissures. Afin d'éviter que ces contaminations n'affectent le produit, un conservateur antimicrobien doit généralement être ajouté à la formulation du produit cosmétique [1], [3].

L'évaluation de l'efficacité d'un conservateur dans un produit cosmétique se fait généralement via un « challenge test ». Pour cela, différents microorganismes sontensemencés en quantité déterminée dans le produit. Le conservateur doit être capable de faire décroître rapidement la concentration en microorganismes dans le produit, jusqu'à la rendre indétectable et éviter la dégradation organoleptique du produit ou un danger pour la santé du consommateur [4], [5]. Les 5 microorganismes préconisés par la norme ISO 11930 :2019 pour cet essai sont *Pseudomonas aeruginosa* CIP 82.118 (ATTC 9027) (bactérie Gram négative), *Escherichia coli* CIP 53.126 (ATTC 8739) (bactérie Gram négative), *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 (ATCC 6538) (bactérie Gram positive), *Candida albicans* IP 48.72 (ATCC 10231) (champignon) et *Aspergillus niger* IP 1431.83 (ATCC 16404) (champignon), ou toute autre souche équivalente issue d'une collection nationale. D'autres espèces peuvent être ajoutées si de tels microorganismes sont susceptibles d'occasionner des contaminations dans le produit [3].

Cet article décrit l'état l'avancement des recherches sur l'évaluation de l'efficacité de la poudre de houblon enrichie en acides bêta dans le cadre de son utilisation comme conservateur cosmétique.

2. Matériel et méthodes

L'efficacité de la poudre d'acides bêta mise au point au CeREF a été évaluée via la méthode du « challenge test ». Deux expériences ont été réalisées en parallèle : la première en laboratoire et la seconde en conditions réelles.

2.1. Préparation des échantillons

Préparation des crèmes Le milieu choisi pour évaluer l'efficacité de la poudre d'acide bêta est une crème cosmétique de composition simple, ne contenant pas de conservateur, préparée au laboratoire à base d'huile d'amande douce, d'huile d'olive, d'eau, de cire d'abeille et d'alcool cétylique.

Contamination des crèmes Dans le cadre du « challenge test » en laboratoire, 5 souches de microorganismes présentes à la surface de la peau (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger*) ont été standardisées au laboratoire. Des échantillons de 20 g de crème cosmétique ont étéensemencés avec environ 80000 CFU (colony forming unit) ou spores de chacune de ces 5 souches de microorganismes.

Lors du « challenge test » en conditions réelles, les crèmes n'ont pas été contaminées par des microorganismes standardisés en laboratoires mais par les microorganismes présents naturellement à la surface de la peau humaine et dans l'environnement ambiant. Les échantillons de 20g de crème cosmétique ont été distribués à 4 testeurs et stockés dans leur salle de bain respective. Chaque jour, les testeurs ont trempé leur doigt dans la crème afin de la contaminer naturellement. Deux d'entre eux avaient pour consigne de se rincer les mains préalablement à l'eau, alors que les deux autres devaient se laver les mains au savon.

Ajout du conservateur Après détermination de la concentration en acides bêta dans la poudre de houblon par HPLC-UV (Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur Ultra-Violet), différentes quantités d'acides bêta ont été incorporées dans les crèmes contaminées : 0 g (contrôle positif), 0.1g, 0.5 g, 1 g, 2 g et 3g. Il est important de noter que, généralement, une combinaison de différentes molécules conservatrices est ajoutée dans la formulation. Dans l'étude présentée, uniquement l'extrait étudié est ajouté à la crème.

Dans le cas du « challenge test » en conditions réelles, les crèmes distribuées aux testeurs en début d'expérience contenaient 0.1 g d'acides bêta.

2.2. Évaluation de la charge microbienne

Les « challenge tests » ont duré un mois. Aux jours 0, 7, 14, 21 et 28, un échantillon de chaque pot de crème a été prélevé et dilué successivement 4 fois dans du bouillon de Sabouraud. Ensuite, chaque dilution a étéensemencée en duplicate sur gélose PCA et incubée pendant 72 h à 30-35 °C. Finalement, les colonies ont été dénombrées et identifiées[6].

3. Résultats

3.1. Examen organoleptique

L'ajout de la poudre enrichie en acides bêta dans la crème impacte ses propriétés organoleptiques. L'odeur, la texture et la couleur de la crème ont été évaluées via une évaluation sensorielle menée par l'opérateur. Les crèmes du « challenge test » en laboratoire, contenant entre 0 et 3 g d'acides bêta, ont été analysées aux jours 0 et 28 de l'expérience, alors que les crèmes du « challenge test » en conditions réelles, contenant chacune 0.1 g d'acides bêta, ont été analysées aux jours 7 et 28. Les résultats de l'analyse sensorielle sont reportés sous forme de photos des pots de crème à la Figure 1.

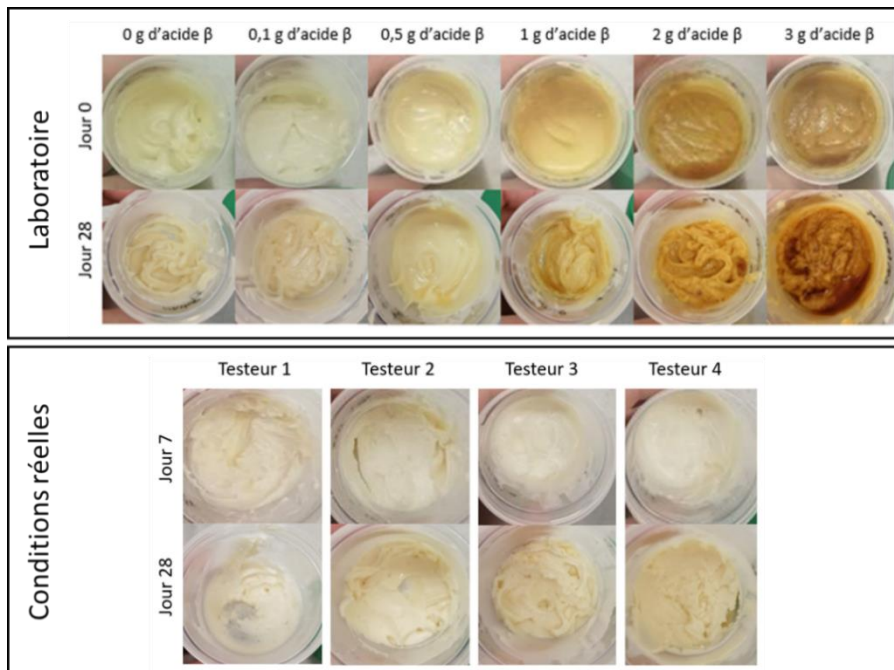


Figure 1: Examen organoleptique des crèmes du « challenge test » en laboratoire et en conditions réelles

La partie supérieure de la Figure 1 représente les résultats du « challenge test » en laboratoire et démontre l'impact de l'ajout d'une quantité croissante de poudre d'acide bêta. La crème est initialement blanche. Lors de l'ajout d'acides bêta, elle tend à se colorer en jaune, puis en orange, au fur et à mesure que la concentration en poudre augmente. Elle finit par atteindre une teinte brunâtre pour la concentration la plus élevée de 3 g. Plus la concentration en poudre d'acides bêta augmente, plus la crème a tendance à se liquéfier, voir à se déphaser. L'odeur de la crème contrôle est neutre mais plus la concentration en acides bêta augmente, plus l'odeur de houblon devient forte et désagréable. Après un mois, la couleur des crèmes n'a pas évolué. Cependant, le déphasage devient critique pour les crèmes les plus concentrées en extrait de houblon.

La partie inférieure de la Figure 1 représente les résultats du « challenge test » en conditions réelles. Dans ce cas, la teneur en poudre d'acides bêta est faible (0.1 g) et n'affecte que peu l'odeur, la texture et la couleur des crèmes.

3.2. Examen microbiologique

Challenge test en laboratoire

Les résultats des cultures présentes sur les boîtes de Pétri pour différentes conditions sont reprises dans la Figure 2. Les résidus de crèmes étant très semblables à des colonies, les boîtes réellement contaminées ont été encadrées en rouge et marquées d'une croix afin de faciliter la lecture du tableau.

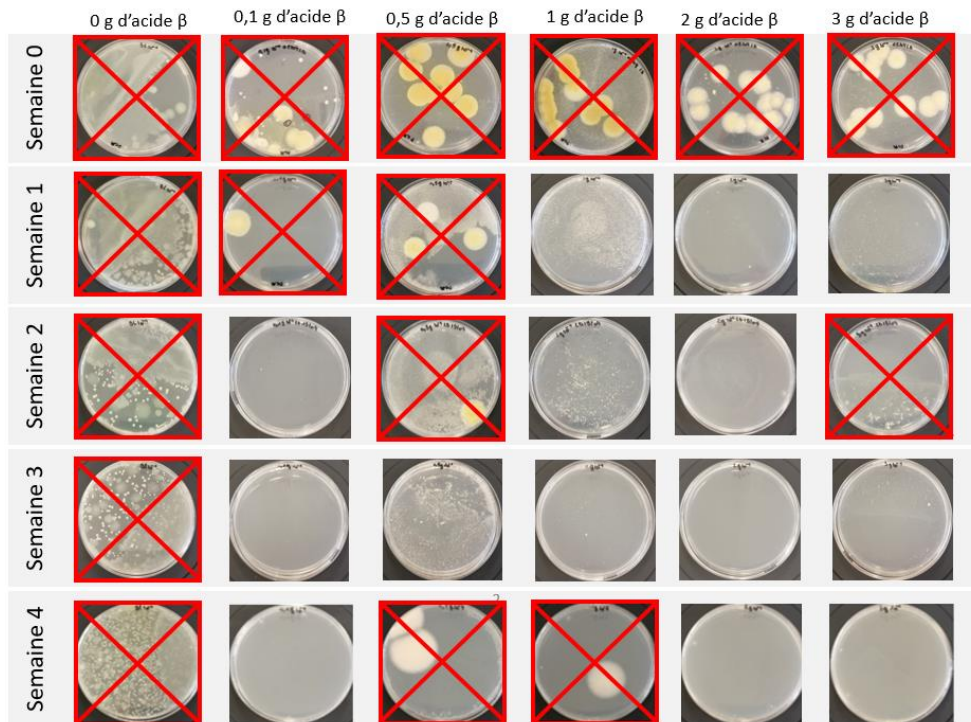


Figure 2: Examen microbiologique du « challenge test » en conditions de laboratoire de crèmes contenant de 0 à 3 g d'acide bêta, contaminées par 5 microorganismes standardisés. Les boîtes contaminées sont marquées d'une croix.

Le contrôle positif démontre qu'en absence d'acides bêta, les microorganismes ont une bonne viabilité et se développent dans la crème. L'identification des microorganismes a mis en évidence *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. L'absence des autres microorganismes peut s'expliquer par un effet de compétition, dû aux différentes vitesses de croissance des différentes espèces.

En semaine 0, un développement de microorganismes est présent à toutes les concentrations en acides bêta. Les microorganismes présents n'ont pas été identifiés. Toutefois, la présence d'*Aspergillus niger* est visible à toutes les concentrations entre 0.1 g et 3 g. A 0.1 g, différents microorganismes sont présents dans l'échantillon. Entre 0.5 g et 3 g d'acides bêta, seul *Aspergillus niger* est capable de se développer. Selon la littérature, les acides bêta sont principalement actifs contre les bactéries gram positives plutôt que contre les champignons [2]. De plus, le temps de contact entre les acides bêta et les microorganismes n'a pas été suffisant pour permettre leur inhibition.

En semaine 1, les concentrations supérieures à 0.5 g d'acide bêta permettent de d'inhiber complètement le développement de tous les microorganismes. Tandis qu'à 0.1 et 0.5 g d'acides bêta, un développement d'*Aspergillus niger* est visible, même si la charge microbienne a diminué par rapport à la semaine 0.

En semaine 2, le développement des microorganismes est inhibé à toutes les concentrations, sauf dans la boîte de 0.5 g, dans laquelle *Aspergillus niger* est présent. Et dans la boîte de 3g, dans laquelle du *Staphylococcus aureus* a été détecté. La poudre d'acides bêta a eu un effet retard aux plus faibles concentrations. Même dans les boîtes ayant permis un développement microbien, la charge microbienne a été considérablement diminuée, ce qui pourrait justifier la présence d'une colonie à 0.5 g mais pas à 0.1 g. Les résultats doivent être reproduits pour être validés.

En semaine 3, le conservateur est efficace à toutes les concentrations, aucun développement n'est observé dans les boîtes.

En semaine 4, des développements sont à nouveau visibles aux concentrations 0.5 g (*Aspergillus niger* et *Staphylococcus aureus*) et 1 g (*Aspergillus niger*). Ces résultats pourraient provenir d'une contamination extérieure pendant la manipulation.

Le « challenge test » a démontré qu'à partir d'une semaine, toutes les quantités de poudre testées sont capables d'inhiber le développement de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa*, d'*Escherichia coli* et de *Candida albicans*. Seul *Aspergillus niger* a été capable de se développer dans les échantillons contenant les plus petites quantités d'acides bêta. L'expérience doit être répétée pour valider les résultats. *Staphylococcus aureus* a été détecté à 3 g en semaine 2 et à 0.5 g en semaine 4. Les acides bêta sont normalement capables d'inhiber la croissance des bactéries Gram +. La présence de ce microorganisme à 3 g en semaine 2 et à 0.5 g en semaine 4 pourrait être expliquée par une contamination humaine lors des manipulations. *Staphylococcus aureus* est une bactérie régulièrement présente dans la flore humaine et dans le laboratoire. La présence de la contamination est occasionnelle et ne se répète pas dans le temps. De plus, la charge microbienne est faible et la contamination survient après une période pendant laquelle aucun microorganisme n'avait été détecté ce qui tend à confirmer l'hypothèse d'une contamination par l'opérateur.

Challenge test en conditions réelles

Lors du « challenge test » en conditions réelles, les crèmes contenant 0.1 g d'acides bêta ont été distribuées à 4 testeurs qui ont utilisé les crèmes dans leur salle de bain pendant un mois. Chaque jour, ils ont trempé leur doigt dans la crème. La moitié des testeurs (testeur 1 et testeur 2) auront préalablement lavé leurs mains au savon, tandis

que l'autre moitié des testeurs (testeur 3 et testeur 4) auront rincé leurs mains à l'eau. Les résultats des cultures présentes sur les boîtes de Pétri pour différentes conditions sont reprises dans la Figure 3.

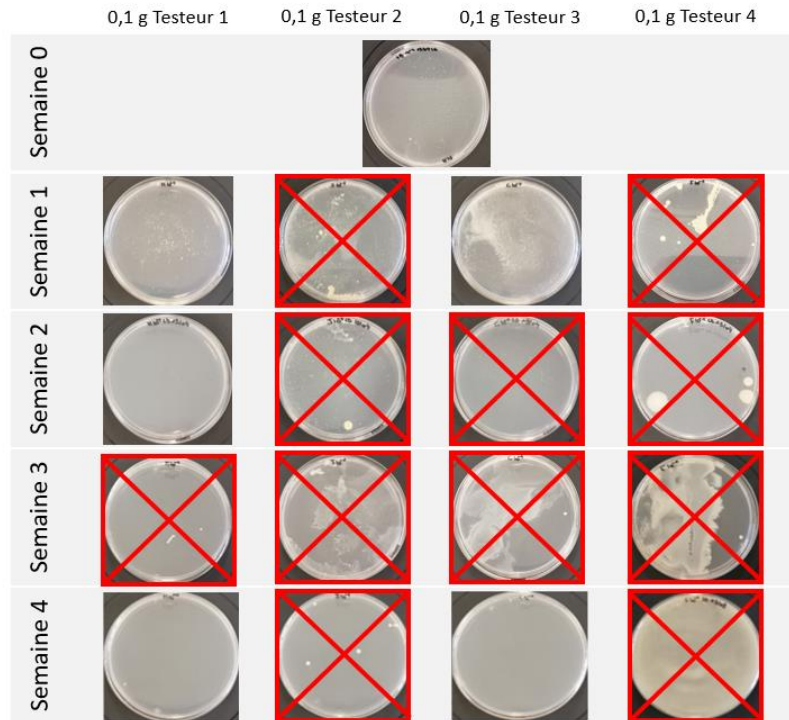


Figure 3: Examen microbiologique du « challenge test » en conditions réelles de crèmes contenant 0.1 g d'acides bêta, contaminées par 4 testeurs. Les boîtes contaminées sont marquées d'une croix.

En semaine 0, aucun développement n'a été observé, comme attendu, puisque les crèmes n'avaient pas encore pu être contaminées par les testeurs.

En semaine 1, des développements microbiens sont observés dans les crèmes des testeurs 2 (*Staphylococcus aureus*) et 4 (*Staphylococcus aureus* et coques Gram négatives non identifiées). Le *Staphylococcus aureus* est un microorganisme régulièrement présent à la surface de la peau. Toutefois, il s'agit d'une bactérie Gram positive, qui devrait être inhibée par la poudre d'acide bêta. Cela signifie que la charge microbienne apportée par les testeurs est trop importante par rapport à la quantité d'acide bêta présente dans la crème (0.1 g). Aucun développement n'est observé

dans les échantillons des testeurs 1 et 3. L'impact du lavage des mains au savon n'est pas mis en évidence. Lors du « challenge test » en conditions contrôlées, seule une faible quantité d'*Aspergillus niger* avait pu se développer dans les boîtes. La dose de 0.1 g d'acides bêta avait permis d'inhiber tous les autres microorganismes (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). La comparaison des résultats des deux « challenge test » peut laisser penser que la contamination apportée par les testeurs contient plus de microorganismes que la contamination réalisée en laboratoire.

En semaine 2, des développements ont été observés dans les échantillons du testeur 2 (*Enterococcus*), du testeur 3 (*Staphylococcus aureus*) et du testeur 4 (*Enterococcus*). Ces bactéries font toutes partie de la flore commensale humaine, ils colonisent l'humain sans provoquer de maladies. A nouveau, il s'agit de bactéries Gram positives, qui auraient dû être inhibées par les acides bêta. La quantité de 0.1 g d'acide bêta est trop faible pour permettre de contrôler les contaminations en milieu réel. Aucun développement n'est observé dans l'échantillon du testeur 1.

En semaine 3, des développements microbiens sont observés dans tous les échantillons. *Enterococcus* est observé dans toutes les crèmes, et *Staphylococcus aureus* est présent dans la crème du testeur 3.

En semaine 4, des contaminations sont observables dans les boîtes des testeurs 2 (*Enterococcus*) et 4 (présence de bactérie Gram négative, suspicion d'*Enterobacter* en raison des colonies blanches sur gélose Cétrimide et roses sur gélose EMB). Les échantillons des testeurs 1 et 3 ne présentent plus de contaminations.

Les similitudes observées entre les résultats des testeurs 2 et 4 peuvent être expliquées par l'environnement identique dans lequel les crèmes ont été utilisées. Contrairement à ce qui était attendu, ce ne sont pas les deux crèmes des testeurs qui se lavaient les mains au savon qui ont été les moins contaminées. La flore cutanée des testeurs et les contaminations dues à l'environnement ont donc un impact significatif. Le microbiome du testeur 1 est peu riche par rapport aux autres, ou les acides bêta ont une bonne efficacité envers les espèces présentes dans la flore de la peau et de l'environnement du testeur 1.

La présence de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus* dans plusieurs échantillons, qui devraient être inhibés par les acides bêta, démontre que la quantité de 0.1 g est trop faible pour inhiber efficacement les microorganismes dans le cadre d'une utilisation réelle. Toutefois, les conservateurs sont généralement utilisés en synergie, chaque actif étant ainsi présent en faible quantité.

4. Conclusion et perspectives

Le « challenge test » en laboratoire a démontré qu'à partir d'une semaine, toutes les quantités de poudre testées sont capables d'inhiber le développement de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa*, d'*Escherichia coli* et de *Candida albicans*. Seul *Aspergillus niger* est capable de se développer. Les concentrations au-delà de 0.5 g d'acide bêta/ 20 g de crème permettent d'inhiber efficacement les microorganismes inoculés dans la crème. Les concentrations à 0.1 g et 0.5 g se montrent partiellement efficaces et ont permis de réduire la charge microbienne dans les échantillons. Ces doses pourraient donc être envisagées en synergie avec d'autres conservateurs. Les concentrations à 2 g et 3g devraient être abandonnées car elles altèrent trop fortement les propriétés organoleptiques de la crème. Il reste à vérifier que l'efficacité de l'extrait n'est pas affectée par la présence d'autres molécules conservatrices.

Le « challenge test » en conditions réelles a donné des résultats plus éparses puisque la contamination dépendait directement de la flore cutanée et de l'environnement du testeur. En conditions réelles, les quantités inoculées semblent plus importantes qu'en conditions contrôlées et sont plus variées également. Les microorganismes ne sont pas toujours inhibés par les acides bêta présents dans la crème. Les bactéries gram positives devraient être efficacement inhibées par les acides bêta or des développements de *Staphylococcus* et d'*Enterococcus* ont été détectés. Ce test devrait être répété avec une concentration en acides bêta supérieure ou en testant la synergie avec d'autres conservateurs à petite dose.

Les résultats obtenus lors de cette étude doivent être reproduits afin d'être confirmés. Ensuite, l'efficacité de la poudre de houblon pourrait être testée dans d'autres formulations cosmétiques (gel douche, gommage, etc), et la plus petite concentration efficace devra être déterminée. Les milieux plus riches en eau étant plus favorables aux contaminations microbiennes, l'évaluation de l'efficacité du conservateur dans ces conditions est nécessaire. L'absence d'effet bactéricide contre la flore cutanée aux concentrations utilisées dans les produits cosmétiques est un point important à étudier. La stabilité du conservateur (température, temps, etc) et son interaction avec d'autres molécules devra être évaluée. Finalement, la synergie avec d'autres conservateurs sera également investiguée afin de pouvoir utiliser les plus petites concentrations possibles.

5. Bibliographie

- [1] A. Kerdudo *et al.*, « Development of a natural ingredient – Natural preservative: A case study », *Comptes Rendus Chimie*, vol. 19, n° 9, p. 1077-1089, sept. 2016, doi: 10.1016/j.crci.2016.06.004.
- [2] L. Bocquet, S. Sahpaz, et C. Rivière, « An Overview of the Antimicrobial Properties of Hop », in *Natural Antimicrobial Agents*, J.-M. Mérillon et C. Riviere, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 31-54. doi: 10.1007/978-3-319-67045-4_2.
- [3] M.-C. Martini et M. Seiller, *Actifs et additifs en cosmétologie*, 3^e éd. Lavoisier TEC & DOC, 2006.
- [4] Copaiba S.R.L., « Copaiba - Challenge Tests », *Copaiba*, 2020. <https://copaiba.be/consultance-formulation/challenge-tests> (consulté le 19 avril 2022).
- [5] N. Kočevr Glavač et M. Lunder, « Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion », *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 40, n° 3, p. 276-284, 2018, doi: 10.1111/ics.12461.
- [6] Solabia, *Catalogue Biokar Diagnostics*. Date inconnue.