

LE POINT SUR...

LES RÉFÉRENTIELS MICROBIOLOGIQUES EN COSMÉTIQUES

Le secteur cosmétique a vécu ces dernières années de profondes mutations tant au niveau réglementaire qu'au niveau des exigences qualité. L'apparition et la révision des référentiels microbiologiques en sont un exemple significatif.

Ce secteur a normalisé depuis quelques années ses propres référentiels microbiologiques pour le contrôle libérateur des produits finis et pour l'évaluation de l'efficacité des conservateurs (challenge test). Ces référentiels, utilisés par nos autorités lors des contrôles, décrivent précisément comment réaliser les analyses sur ces produits. Ces normes internationales, qui concernent à la fois les laboratoires d'analyses et les industriels, sont décrites dans le tableau 1.

En France, le Cofrac, comité français d'accréditation, est le seul organisme habilité à vérifier le strict respect des référentiels. L'accréditation Cofrac, démarche volontaire de la part des laboratoires d'analyses, permet ainsi de confirmer par tierce partie indépendante leur engagement quant au respect des référentiels. La portée d'accréditation, strictement limitée aux analyses qui ont été auditées par un expert technique, permet seule d'informer clairement les industriels sur les compétences techniques du laboratoire.

Parmi les normes citées dans le tableau 1, la norme NF EN ISO 29621, publiée en juin 2011 décrit une méthodologie et des clés permettant d'évaluer les produits à

L'EXPERT



Michel BUTIN
Alhades Provence, président.
Expert toxicologue
et microbiologiste.

faible risque microbiologique. Cette norme est très importante, car elle permet d'évaluer de manière pragmatique l'opportunité et le niveau des contrôles microbiologiques à réaliser sur le produit et éventuellement ses ingrédients et donc de pouvoir donner la possibilité à tout industriel ou formulateur, de justifier l'absence de réalisation d'analyses (de routine ou de challenge test).

Il est important de ne pas confondre la maîtrise de la conservation et la maîtrise de la contamination. Ce n'est pas parce qu'un produit se conserve bien qu'il n'est pas contaminé (exemple des poudres et des huiles).

Plusieurs types de normes existent et toutes ne répondent pas aux mêmes problématiques. Certaines concernent le contrôle libérateur et d'autres concernent l'évaluation de l'efficacité des conserva-

teurs. Chacune de ces problématiques est à considérer séparément puisqu'elles font appel à deux concepts très différents l'un de l'autre. La première est propre à chaque lot d'ingrédient ou de produit. Elle dépend de toute la chaîne de production et détermine le niveau de contamination acceptable lors de la libération industrielle de ce lot. La seconde, par contre, n'est liée qu'à la conception de la formule du produit. Elle dépend essentiellement de la capacité à reproduire en routine cette formule et elle détermine la capacité du produit à maîtriser sa flore de contamination endogène et à résister à d'éventuelles contaminations exogènes.

Néanmoins un point commun subsiste, la validation du bouillon neutralisant est obligatoire pour toutes les normes analytiques.

Maîtrise de la contamination des produits

Critères microbiologiques en cosmétique

Jusqu'en janvier dernier, les critères microbiologiques se basaient sur les recommandations du Colipa de 1997 et de la Commission européenne de 2006. La parution de la norme NF EN ISO 17516, statuant sur les critères microbiologiques applicables aux produits cosmétiques et ayant été élaborée dans le cadre d'un large consensus international fait désormais référence dans les échanges commerciaux. Cette norme basée sur les recommandations du SCCS, apporte des évolutions majeures. Les critères de

CRITÈRES DE LA NORME NF EN ISO 17516 :

Flore totale / Levures moisissures : < 100UFC/g ou < 1000UFC/g en fonction de la catégorie du produit.

Germe spécifiques : absence au seuil de 1UFC/g pour tous les produits.

Cette norme internationale offre aux industriels un excellent moyen de comprendre les normes à appliquer et surtout met en évidence qu'un simple dénombrement ne peut suffire pour répondre aux exigences de ces critères.



dénombrement intègrent explicitement les moisissures. De plus, compte tenu des incertitudes inhérentes à la microbiologie, un produit reste acceptable jusqu'à deux fois les critères. L'absence de germes pathogènes est plus restrictive que dans les recommandations du SCCS qui, pour les produits de catégorie 2, prévoyait une absence dans 0,1 g et non dans 1 g.

Normes microbiologiques

Les normes pour les contrôles qualité sont nombreuses et toutes ne permettent pas de répondre à la même interrogation.

S'il est facile d'identifier les normes parues, il reste néanmoins complexe de faire le bon choix du référentiel à utiliser. Les normes microbiologiques publiées entre 2007 et 2009, pour le secteur cosmétique sont les suivantes NF EN ISO 18415, NF EN ISO 16212, NF EN ISO 21149, NF EN ISO 21148, NF EN ISO 21150, NF EN ISO 22718, NF EN ISO 22717, NF EN ISO 18416.

Ces référentiels décrivent précisément comment réaliser les analyses sur ces produits.

Chacune de ces normes répond à un besoin bien particulier, il est donc important de faire le choix du bon référentiel. Se tromper peut être lourd de conséquences.

Si les normes NF EN ISO 16212 et NF EN ISO 21149 décrivent des méthodes de dénombrement, elles ne permettent pas de vérifier l'absence des germes pathogènes au seuil recommandé.

Seules les normes suivantes sont adaptées à la recherche des germes pathogènes : NF EN ISO 18415, NF EN ISO 21150, NF EN ISO 22718, NF EN ISO 22717, NF EN ISO 18416.

Maîtrise de la conservation des produits

La norme NF EN ISO 11930 parue fin mai 2012 et remplaçant la norme NF T75-611, décrit la méthodologie de réalisation des challenge tests ainsi que les critères de conformité (cf. tableau 2).

Si la norme NF EN ISO 11930 est aujourd'hui la plus adaptée aux produits cosmétiques pour le contrôle de l'efficacité des conservateurs, elle doit être appliquée selon des conditions très précises et il est souvent difficile pour un "non microbiologiste" de pouvoir juger de la conformité de son application. Il en va de même pour les autres référentiels de challenge tests : pharmacopée européenne ou pharmacopée américaine. Un challenge test réalisé dans de mauvaises conditions peut être lourd de conséquences en cas de contrôle par les autorités, en cas de litige avec un client ou, surtout, au regard des risques de contamination de votre produit chez le consommateur. Quel que soit son prix, un challenge test réalisé dans de mauvaises conditions ne sert à rien !

Quelques points sensibles à vérifier pour le respect des référentiels

- La validation du bouillon neutralisant (nature du diluant et dilution de travail) est-elle systématiquement effectuée ?
- Ces conditions de validation et les résultats obtenus sont-ils décrits dans votre rapport ?
- Les dénombrements à chaque échéance sont-ils réalisés en double ?
- La préparation des inoculi est-elle toujours réalisée extemporanément ?
- L'ensemencement des souches est-il fait de manière individuelle ? (Une souche à la fois par unité challengée)
- Plus particulièrement pour la norme NF EN ISO 11930 :
 - les dénombrements sont-ils bien réalisés en masse ?
 - la préparation des spores d'*Aspergillus brasiliensis* est-elle filtrée ?

À ces questions, si au moins une réponse est non, cela signifie que les référentiels ne sont pas respectés et qu'il y a un



risque sérieux de mal évaluer la qualité de la conservation du produit.

Mieux comprendre les points sensibles

Validation du bouillon neutralisant ?

La validation du bouillon neutralisant selon les normes est une étape de l'analyse qui valide la fiabilité du résultat obtenu lors de l'essai proprement dit. Cette validation est obligatoire pour tous les référentiels. Elle consiste à vérifier que, dans les conditions de dilution (choix du diluant et du niveau de dilution), les germes potentiellement présents sont cultivables. Autrement dit, s'ils sont présents lors du dénombrement ou de la présence-absence, ils ne doivent pas être stressés ou inhibés et doivent pouvoir se développer normalement. Si cette étape n'est pas réalisée, il y a un risque important de ne pas visualiser les germes présents dans le produit et donc de le déclarer conforme alors qu'il ne l'est pas. Une étude que nous avons réalisée dans notre laboratoire sur plusieurs centaines de produits a démontré que les conditions de dilution standard de neutralisation (Eugon LT100 dilution 1/10ième) ne sont pas validées pour environ 25 % des produits cosmétiques. Dans ce cas le laboratoire doit alors mettre en place un changement du bouillon neutralisant et/ou utiliser une dilution supérieure.

Ces conditions de validation sont-elles décrites dans votre rapport ?

La norme NF EN ISO 11930 l'impose. Il ne faut pas oublier que si cette notion de validation est obligatoire pour les challenge tests, elle l'est également pour les contrôles de routine. Les résultats de validation obtenus pour le challenge test

pourront donc être ré-utilisés pour la réalisation des dénombrements en contrôle de routine, à condition, bien entendu, d'utiliser le même neutralisant et la même dilution.

Les dénombrements à chaque échéance sont-ils réalisés en double ?

Cette exigence est obligatoire dans la norme NF EN ISO 11930 et les méthodes des pharmacopées européenne et américaine. Le fait de réaliser ces dénombrements en double permet d'apporter une fiabilité supplémentaire au résultat rendu.

La préparation des inocula est-elle réalisée extemporanément ?

La norme NF EN ISO 11930, impose un délai maximum de 2 h entre le temps de préparation des inocula et leur utilisation. Dans le cadre du groupe de travail microbiologie de la commission de normalisa-

tion Afnor, lorsqu'il travaillait sur la norme NFT 75-611, il a été démontré que l'utilisation d'un *inoculum* au-delà de quelques heures après sa préparation pouvait modifier sa résistance aux conservateurs d'un facteur 10 avec le risque de classer alors indûment un produit comme non conforme et de devoir le reformuler avec toutes les contraintes liées aux conservateurs et à leur tolérance.

L'ensemencement des souches est-il fait de manière individuelle ?

Aucun référentiel international, américain ou européen, n'autorise le mélange des souches. Chaque souche doit être individuellement ensemencée dans une quantité d'échantillons définie. Mélanger les souches, c'est certes cinq fois moins de travail, mais c'est malheureusement donner la possibilité aux souches d'interagir entre elles et donc de surestimer l'efficacité des conservateurs. De plus, il

est difficile de différencier macroscopiquement certaines souches les unes des autres, surtout par la technique d'ensemencement en masse telle qu'exigée par la norme NF EN ISO 11930.

Si vous suivez le référentiel NF EN ISO 11930, la préparation des spores d'*Aspergillus brasiliensis* est-elle filtrée ?

Cette exigence permet de s'assurer que l'*inoculum* est constitué exclusivement de spores d'*Aspergillus brasiliensis* et non pas de fragments mycéliens pouvant interférer de manière significative dans le résultat des dénombrements. La filtration doit être réalisée sur un filtre fritté en verre de porosité de 40 à 100 micromètres. Les évolutions des normes microbiologiques et leurs diversités impliquent d'une part une maîtrise de la compréhension de ces référentiels et donc un accompagnement permanent par le partenaire analytique afin que l'industriel,

TABLEAU 1 : RÉCAPITULATIF DES NORMES ISO EN MICROBIOLOGIE

Référence de la norme et date de parution	Intitulé de la norme	Intérêt de la norme
NF EN ISO 29621 juin 2011	Lignes directrices pour l'appréciation du risque et l'identification des produits à faible risque.	Norme donnant des outils afin d'évaluer le risque microbiologique d'un produit cosmétique. Cette norme permet ainsi de pouvoir déterminer si les contrôles de routine ou le challenge test sont réellement nécessaires.
NF EN ISO 17516 janvier 2015	Cosmétiques – Microbiologie – Limites microbiologiques	Définir les limites quantitatives et qualitatives acceptables pour les produits cosmétiques finis.
NF EN ISO 18415 août 2011	Détection des micro-organismes spécifiés (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>) et des micro-organismes non spécifiés.	Norme « 2 en 1 » permettant la vérification de l'absence des germes pathogènes et un niveau de contamination acceptable pour les non pathogènes.
NF EN ISO 21149 septembre 2009	Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles.	Norme permettant d'évaluer le niveau de contamination en bactéries (mais pas la présence de pathogènes).
NF EN ISO 16212 août 2011	Dénombrement des levures et des moisissures.	Norme permettant d'évaluer le niveau de contamination en levures et moisissures (mais pas la présence de pathogènes).
NF EN ISO 22718 septembre 2009	Détection de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Norme spécifique permettant la vérification de l'absence dans une prise d'essai définie de <i>Staphylococcus aureus</i> .
NF EN ISO 21150 septembre 2009.	Détection d' <i>Escherichia coli</i>	Norme spécifique permettant la vérification de l'absence dans une prise d'essai définie d' <i>Escherichia coli</i> .
NF EN ISO 18416 septembre 2009	Détection de <i>Candida albicans</i>	Norme spécifique permettant la vérification de l'absence dans une prise d'essai définie de <i>Candida albicans</i>
NF EN ISO 22717 septembre 2009	Détection de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Norme spécifique permettant la vérification de l'absence dans une prise d'essai définie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NF EN ISO 11930 juin 2012	Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique	Norme décrivant le protocole de réalisation des challenge tests.

responsable de la maîtrise de la qualité microbiologique de ses produits finis assure en toute sérénité la sécurité du consommateur. D'autre part les industriels, dans le cadre des BPF, doivent

considérer leurs prestataires d'analyses comme des fournisseurs critiques et, à ce titre, s'assurer de leur strict respect des référentiels. N'oublions pas que, sur la base de ces résultats analytiques, des

décisions importantes sont prises sur la formulation du produit, son packaging, sa PAO... Ici comme ailleurs, le trop bon marché finit toujours par coûter cher... ●

TABLEAU 2 – RÉFÉRENTIELS POUR L'ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE LA CONSERVATION

Référéntiel Pharmacopée européenne - application locale :								
					Souches testées : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> T 2 - T 7 - (T 14) - T 28 <i>Staphylococcus aureus</i> T 2 - T 7 - (T 14) - T 28 <i>Candida albicans</i> T 14 - T 28 <i>Aspergillus brasiliensis</i> T 14 - T 28			
	Bactéries				Levures		Moisissures	
	T2	T7	T14	T28	T14	T28	T14	T28
Critère A (réduction logarithmique attendue)	≥ -2 log ₁₀	≥ -3 log ₁₀		PA	≥ -2 log ₁₀	PA	≥ -2 log ₁₀	PA
Critère B (réduction logarithmique attendue)			≥ -3 log ₁₀	PA	≥ -1 log ₁₀	PA	≥ -1 log ₁₀	PA
PA : Pas d'augmentation par rapport au temps précédent.								
Ce référentiel s'adresse à des médicaments, produits destinés à des individus potentiellement fragilisés et pour un usage limité dans le temps. Pour cette raison, il est particulièrement exigeant en terme de rapidité et d'efficacité. Le revers de cette exigence est que, pour présenter un profil A, le produit doit contenir des conservateurs puissants (parabens, phénoxyéthanol...) et à des concentrations fortes qui peuvent présenter un risque d'irritation locale. L'avantage de ce référentiel est qu'il est le plus exigeant en matière de sécurité et qu'il est reconnu dans le monde entier.								
Référéntiel Pharmacopée américaine USP - application locale :								
					Souches testées : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> T 14 - T 28 <i>Staphylococcus aureus</i> T 14 - T 28 <i>Candida albicans</i> T 14 - T 28 <i>Aspergillus brasiliensis</i> T 14 - T 28 <i>Escherichia coli</i> T 14 - T 28			
	Bactéries			Levures		Moisissures		
Temps	T14	T28		T14	T28	T14	T28	
Critère (réduction logarithmique attendue)	≥ -2 log ₁₀		PA	PA	PA	PA	PA	
PA : Pas d'augmentation par rapport au temps précédent.								
Ce référentiel est bien moins exigeant que la pharmacopée européenne en terme d'efficacité de la conservation microbiologique et il a aussi le mérite d'être reconnu internationalement. Il est cependant peu utilisé en Europe excepté par les sociétés d'origine nord-américaine ou par les industriels ayant un cahier des charges spécifique pour exporter aux USA.								
Référéntiel NF EN ISO 11930 - application locale :								
					Souches testées : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> T 7 - T 14 - T 28 <i>Staphylococcus aureus</i> T 7 - T 14 - T 28 <i>Escherichia coli</i> T 7 - T 14 - T 28 <i>Candida albicans</i> T 7 - T 14 - T 28 <i>Aspergillus brasiliensis</i> T 14 - T 28			
	Bactéries			Levures			Moisissures	
Temps	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
Critère A (réduction logarithmique attendue)	≥ -3 log ₁₀	PA	PA	≥ -1 log ₁₀	PA	PA	PA	≥ -1 log ₁₀
Critère B (réduction logarithmique attendue)		≥ -3 log ₁₀	PA	≥ -1 log ₁₀	PA	PA	PA	PA
PA : Pas d'augmentation par rapport au temps précédent.								
Concernant le protocole technique, seules quelques petites différences apparaissent : - le milieu de culture pour <i>Aspergillus brasiliensis</i> passe d'un milieu MEA (Malt Extract Agar) à un milieu pommes de terre, PMA (Potato Dextrose Agar). Cette différence est peu significative, mais doit être intégrée lors de la réalisation des analyses ; - le critère C défini dans la norme NF T75-611 est abandonné dans la norme NF EN ISO 11930 ; - l'incertitude prise en considération dans les comparaisons de profils passe à 0,5 log (0,3log appliqué pour USP, Ph. Eur. et NF T75-611) ; - la différence la plus significative réside sur le critère A avec une réduction d'un logarithme décimal sur <i>Aspergillus brasiliensis</i> à T28. La norme NF EN ISO11930 est, en cela, plus stricte que la norme NF T75-611.								