

Impact de l'ajout d'un conservateur antimicrobien naturel sur la stabilité d'un bain de bouche

Z. Mansouri¹⁻², M. Lazaz³, L. Belmahdi³, N. Moussaoui¹⁻²



1 : Laboratoire de pharmacie galénique – Faculté de médecine – Université Oran 1

2 : Laboratoire de recherche et développement pharmaceutique - LRDP

3 : Laboratoire de microbiologie – hôpital militaire régional universitaire d'Oran



Introduction

Une préparation hospitalière sous forme de solution aqueuse pour bain de bouche est utilisée dans le traitement des mucites chimio et ou radio-induites, elle est constituée de deux solutions à mélanger au moment de l'administration : solution A et solution B.

Les résultats du contrôle microbiologique montrent une contamination précoce de la préparation d'où la nécessité d'optimiser la formulation par ajout de conservateur antimicrobien naturel hydrosoluble.

La réalisation d'une étude de stabilité permet de connaître l'impact de l'ajout du conservateur en matière de stérilité.

TAB I. COMPOSITION DU BAIN DE BOUCHE NON OPTIMISEE

COMPOSITION	
Solution A	Hydrogénéphosphate de sodium
	Dihydrogénéphosphate de sodium
	Chlorure de sodium
	Eau distillée
Solution B	Chlorure de calcium
	Chlorure de sodium
	Eau distillée

Fig. I : Les étapes de préparation du BAIN DE BOUCHE

Méthodes : Optimisation de la formule

1.1. Méthode de choix de la concentration du conservateur :

Le protocole consiste à évaluer l'activité antimicrobienne d'un agent de conservation naturel : L'extrait de pépin de pamplemousse (EPP) par rapport à un témoin chimique (Sepicide®), et à déterminer la concentration minimale inhibitrice de l'EPP par la technique de dilution en milieu gélosé, en utilisant les souches de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Candida albicans*.

■ Technique de dilution en milieu gélosé

Elle consiste à incorporer le conservateur à une concentration donnée dans la gélose, maintenue liquide à la température de surfusion 45°.

Des suspensions des différentes bactéries et champignon à examiner sont préparées et déposées par la suite à la surface du milieu gélosé à l'aide d'un écouvillon (dépôt par des spots).

Après incubation à 35 °C (souches bactériennes) et à 25 °C (*Candida albicans*) pendant une période définie (16-20 h), la croissance est comparée à celle du témoin (sans conservateur).

La CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans extrait.

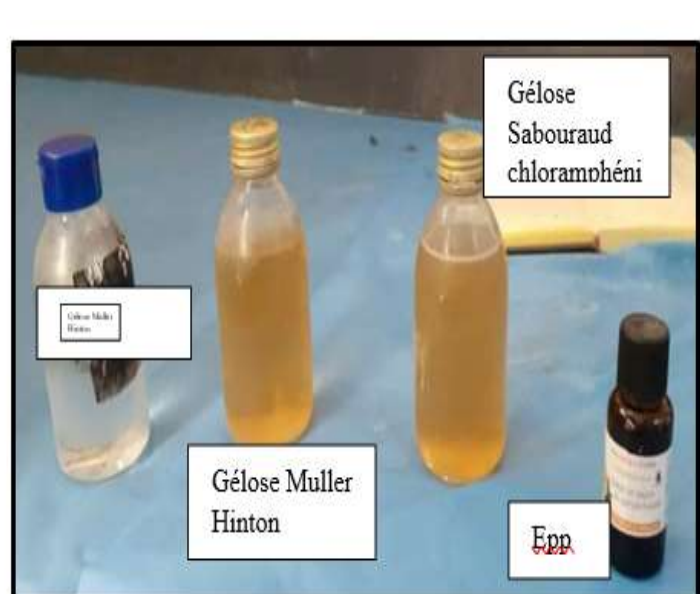


Fig. II : Réactifs utilisés



Fig. III : Equipement utilisés



Fig. IV : Souche de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Une gamme de concentrations correspond à 5%, 2.5%, 1.25%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.0625% pour l'Epp et 1%, pour le Sepicide est testée.

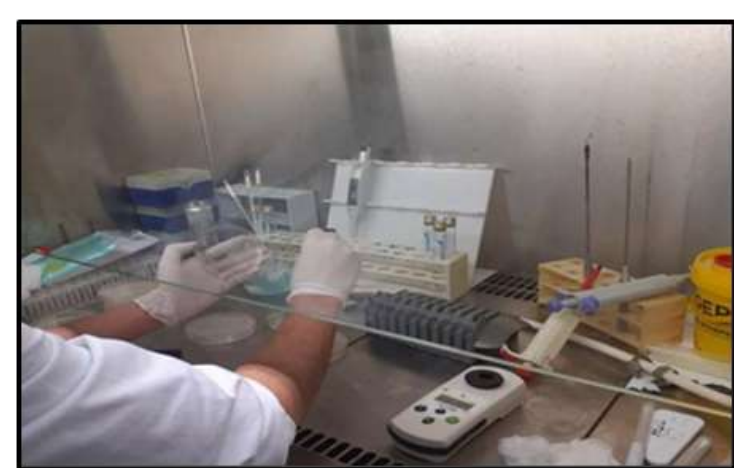


Fig. V : Préparation et ensemencement des souches



Resultas

■ Activité antifongique

TAB. II : Résultats de l'activité antifongique d'Epp sur *Candida albicans*.

Souche de référence	Milieu de culture	Durée et T d'incubation	Conc Epp	Résultats
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud + Chloramphénicol	25 °C	Témoin 0%	+
			5%	-
			2.5%	-
			1.25%	-
			1%	-
			0.5%	-
			0.25%	-
0.125%	+			

(-) Absence de croissance.
(+) Présence de croissance.



Fig. VI : Résultats de l'activité antifongique d'Epp sur *Candida albicans*.

La concentration correspond à 1% de Sepicide comparé avec le témoin présente une prolifération de *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

■ Activité antibactérienne

TAB. III : Résultats de l'activité antibactérienne de l'Epp.

SOUCHES BACTERIENNES	MILIEUX DE CULTURE	DURÉE ET T D'INCUBATION	CONC EPP	RÉSULTATS
<i>ESCHERICHIA COLI</i> ATCC 25922	MULLER HINTON	35 °C	TEMOIN	+
			5%	-
			2.5%	-
			1.25%	-
			1%	-
<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ATCC 25923	MULLER HINTON	35 °C	0.5%	-
			0.25%	-
			0.125%	-
			0.0625	-
			TEMOIN	+
<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ATCC 27853	MULLER HINTON	16-20 HEURES	5%	-
			2.5%	-
			1.25%	-
			1%	-
			0.5%	-
			0.25%	-
0.125%	+			
0.0625%	+			

(-) Absence de croissance.
(+) Présence de croissance.



Fig. VII : Résultats de l'activité antibactérienne de l'Epp.

TAB. IV : Résultats de l'activité antibactérienne de Sepicide.

Concentration	1% de sepicide	Témoin
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+

Méthodes : Test de stérilité

OBJECTIF : Vérifier la stérilité de la solution pour bain de bouche en absence et en présence de conservateur.

Produits à testés :

- Solution pour bain de bouche sans conservateur.
- Solution pour bain de bouche avec 0.25% et 1% Epp
- Solution pour bain de bouche avec 1% Sepicide.

Incubation : 14 jours à 37 °C. Lectures à J1, J2, J5 et J14.

Resultas

TAB. V : Résultats d'essais de stérilité.

Tube d'essai	J ₀	J ₁	J ₂	J ₅	J ₁₄
Tube témoin	-	-	-	-	-
Tube 1 : Solution A	-	+	+	+	+
Tube 2 : Solution B	-	-	-	+	+
Tube 3 : Solution A avec Epp à 0.25%	-	-	-	-	-
Tube 4 : Solution B avec Epp à 0.25%	-	-	-	-	-
Tube 5 : Solution A avec Epp à 1%	-	-	-	-	-
Tube 6 : Solution B avec Epp à 1%	-	-	-	-	-
Tube 7 : Solution A avec Sepicide à 1%	-	-	-	-	-
Tube 8 : Solution B avec Sepicide à 1%	-	-	-	-	-

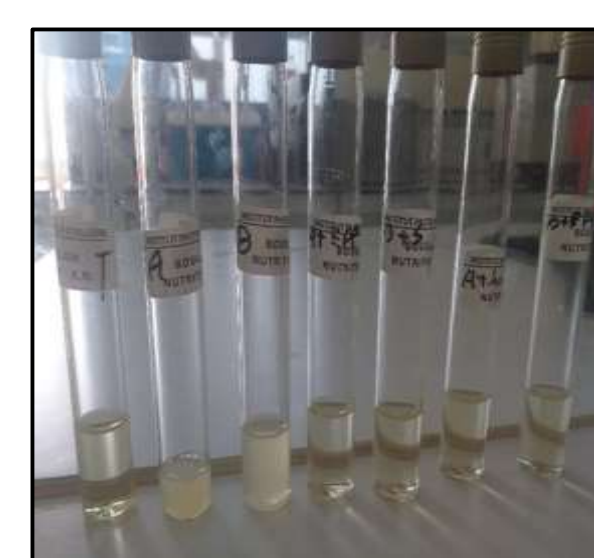


Fig VIII : Essai de stérilité après incubation pendant 14 jours.

(-) Absence de trouble.

(+) Présence de trouble.

■ Apparition de trouble dans les tubes 1 et 2 (solution A et B sans conservateur), cependant les autres tubes restent limpides.

■ Réalisation d'ensemencement de 0.1ml de la solution mère de la solution A et B sans conservateur (sans addition de bouillon nutritif) par la méthode de râteau :



Fig. IX : La méthode de râteau.

■ Après l'incubation à 37° pendant 16-20 heures une culture bactérienne pure > 100 colonies pour la solution A et B sans conservateur.

■ Le résultat de la coloration de Gram sont des bactéries GRAM (-).

■ La bactérie responsable de la contamination des solutions A et B sans conservateur c'est *Pseudomonas aeruginosa*.

Discussion

Les extraits de pépin s'avèrent actifs sur toutes les souches bactériennes et sur *Candida albicans*, cet extrait exerce une activité antibactérienne dose dépendante avec une activité plus intéressante sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* que *Pseudomonas aeruginosa*. Ionescu G et al, Vladimir-Knezevic, 2004 ; Oyelami et al, 2005 ; Bernatoniene et al, 2013) ont montré les mêmes résultats.

En ce qui concerne *Candida albicans* l'EPP est efficace sur cette souche de *Candida* à des faibles concentrations, ce qui rejoint les résultats de (Bernatoniene J. et al. Et Krajewska-Kulak E. et al.).

La comparaison entre l'extrait de pépin de pamplemousse et Sepicide montre qu'EPP possède une activité sur les trois souches bactériennes à la concentration 1% tandis que Sepicide possède une activité seulement sur *Staphylococcus aureus* une bactérie GRAM (+) ce qui implique que l'EPP est plus active que Sepicide pour les bactéries GRAM(-).

EPP possède une activité antibactérienne, antifongique Il en découle donc un nombre important d'indications auxquelles ils pourraient convenir parmi eux un agent conservateur pour éviter la prolifération bactérienne et fongique sans avoir besoin d'utiliser des produits synthétiques. [1], [2], [3], [4], [4], [6], [7] .

Selon le chapitre 5.1.4 de la Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition, les préparations aqueuses non stériles pour usage buccale doivent présenter une proportion inférieure à 100 UFC/ml des germes aérobies totaux (DGAT) et inférieur à 10 UFC/ml pour les moisissures et levures totales (DMLT), absence de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Au regard des résultats, il a été observé une turbidité dans la solution A et B sans conservateur justifiée par la présence de *Pseudomonas aeruginosa* : produit non stérile. La solution A et B avec le conservateur naturel est aux normes indiquées dans la Pharmacopée Européenne : produit stérile.

Conclusion

Au vu de tous ces résultats, il apparaît évident que l'extrait de pépins de pamplemousse est un bon agent antibactérien et antifongique à partir de la concentration 0.25%.

L'ajout de l'EPP à des concentrations de 0.25% génère un produit conforme aux normes physicochimique et microbiologique par comparaison aux résultats obtenus avec Epp à 1% et septicide à 1%

References

- [1] Ionescu G., Kiehl R., Wichmann-Kunz F., Williams C., Ba L., Levine S. - 1990 - Oral Citrus Seed Extract in Atopic Eczema : In Vitro and In Vivo Studies on Intestinal Microflora - Journal of Orthomolecular Medicine - Volume 5 - Numéro 3 - p. 155-157.
- [2] Cvetic Z. & Vladimir-Knezevic S. - 2004 - Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract - Acta pharmaceutica - Volume 54 - p. 243-250.
- [3] Oyelami O.A., Agbakwuru E.A., Adeyemi L.A., Adedeji G.B. - 2005 - The Effectiveness of Grapefruit (*Citrus paradisi*) Seeds in Treating Urinary Tract Infections - The Journal of Alternative and Complementary Medicine - Volume 11 - Numéro 2 - p. 369-371.
- [4] Bernatoniene J., Keraitė R., Masteiková R., Pavilonis A., Savickas A. - 2013 - A combination of grapefruit seed extract and concentrated cranberry juice as a potential antimicrobial preservative for the improvement of microbiological stability of hyppromellose gel - Ceska a Slovenska Farmacie - Volume 62 - Numéro 5 - p. 212-219.
- [5] Xu C.-J., Fraser P. D., Wang W.-J., Bramley P. M. - 2006 - Differences in the Carotenoid Content of Ordinary Citrus and Lycopene-Accumulating Mutants - Journal of Agricultural and Food Chemistry - Volume 54 - Numéro 15 - p. 5474-5481.
- [6] Heggors J.P., Cottingham J., Gusman J., Reagor L., McCoy L., Carino E., Cox R., Zhao J.-G. - 2002 - The Effectiveness of Processed Grapefruit-Seed Extract as an Antibacterial Agent : II. Mechanism of Action and In Vitro Toxicity - The Journal of Alternative and Complementary Medicine - Volume 8 - Numéro 3 - p. 333-340.