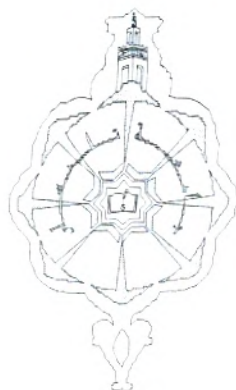


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, DES SCIENCES DE LA TERRE ET DE  
L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
Laboratoire :

**Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique**



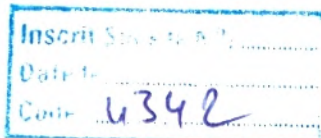
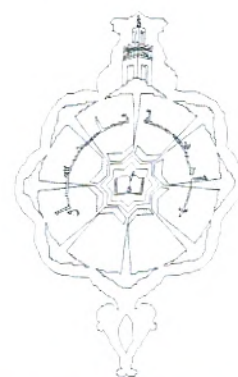
**Mémoire**  
Pour l'obtention du diplôme de

**Magister**

En biologie, Option : Biochimie appliquée

Présenté par

**Mr. HALLA Nouredine**



**Evaluation de l'activité antifongique et antibactérienne et de la  
cytotoxicité de quatre conservateurs : Imidazolidinyl urée,  
Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et Bromure de N-cétyl-N,N,N-  
triméthylammonium**

Devant le jury :

Président : Mr. DRISSI Mourad

Maître de Conférences, Université Tlemcen

Promoteur : Mr. BOUCHERIT Kebir

Maître de Conférences, Université Tlemcen

Examineurs : Mme. BOUCHERIT-ATMANI Zahia

Maître de Conférences, Université Tlemcen

Mr. ZIANI Cherif Chewki

Maître de Conférences, Université Tlemcen

**Année Universitaire : 2009-2010**

## DEDICACE

**« ..Rends grâce à Moi et à tes géniteurs (tes deux parents) ! C'est à Moi qu'aboutit toute destinée.... » Sourate 31 (Luqmân) verset:14.**

Je dédie ce mémoire :

A mon père

A ma mère

qui m'ont éclairé mon chemin et qui m'ont  
encouragé et soutenue

## REMERCIEMENTS

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ ﴿١﴾

الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ ﴿٢﴾

الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ ﴿٣﴾

Je tiens à remercier aussi l'ensemble du personnel de laboratoire, en particulier: Mr. LAHFA Farid, Mr. DJAZIRI Rabah, Mr. AZZI Rachid, Mme SARI Lamia, Melle BENARIBA Nabila, Melle BABA AHMED Zahira Zakia et Melle BELKACEM Nacéra pour leur aide.

J'adresse également mes remerciements, à tous mes enseignants, qui m'ont donnée les bases de la science.

Je voudrais bien remercier Mr SEDDIKI Mohammed et Melle MERGHACHE Djamila pour tout leur aide et pour la bonne ambiance dans le laboratoire et en dehors... ainsi qu'à l'ensemble du personnel de notre promotion du magister : Tarik, Hanane, Esma, Amel et Soumia, pour la bonne humeur générale.

Je n'oublierais pas tous les autres avec qui j'ai pu travailler ou échanger de bons moments dans le laboratoire: Imad, Mohammed, Mahi, Habib, Zineddine, Samir, Salima, Dounia, Rabha, Fatima, Ilham, Sara, Wassila, Meriem, Houria, Wafaa et Ismahane.

Je remercie, du fond du cœur mon compagnon de vie, BOUDIAF Mohammed, qui m'a toujours encouragée à m'investir à fond dans ce travail.

Je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire, Brahim, Zian, Adda, Miloud, Mohammed, Cheikh ...

Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience. J'exprime aussi ma sincère reconnaissance à toute ma famille pour leur encouragement tout au long de mes études et ainsi que dans la vie.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à toute personne qui a participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail.



# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	01
<b>PARTIE I : synthèse bibliographique</b> .....	04
<b>CHAPITRE 1 : Généralités sur la cosmétique</b> .....	05
1. Définition du produit cosmétique.....	05
2. Aspects réglementaires .....	05
3. Classifications des produits cosmétiques .....	06
4. Principaux ingrédients dans la cosmétique.....	06
5.1. Ingrédients simples .....	06
5.2. Ingrédients technologiques (additifs) .....	06
5.3. Ingrédients actifs .....	07
5. Place des conservateurs antimicrobiens dans la cosmétique .....	07
<b>CHAPITRE 2 : Les conservateurs antimicrobiens dans la cosmétique</b> .....	07
1. Définition d'un conservateur.....	08
2. Rôles des conservateurs .....	08
3. Contamination des produits cosmétiques .....	09
4. Principales classes des conservateurs dans la cosmétique .....	11
5. Mécanismes d'action des conservateurs .....	16
6. Résistance aux conservateurs .....	18
6.1. Bactéries .....	18
6.1.1. Résistance intrinsèque.....	18
6.1.2. Résistance acquise .....	18
6.1.2.1. Altération de la cible.....	18
6.1.2.2. Imperméabilité .....	18
6.1.2.3. Pompes d'efflux.....	19
6.1.2.4. Inactivation du conservateur .....	19
6.2. Mycètes .....	19
7. Qualités requises d'un conservateur.....	19
7.1. Stabilité.....	20
7.2. Compatibilité .....	20
7.3. Efficacité .....	21
7.4. Innocuité .....	21
7.5. Conformité avec la législation du cosmétique.....	21
7.6. Coût .....	21
8. Toxicité des conservateurs .....	22
<b>CHAPITRE 3 : Les conservateurs étudiés</b> .....	22
1. Imidazolidinyl urée (IU) et le Diazolidinyl urée (DU) .....	22
1.1. Présentation chimique .....	23
1.1.1. Identification et propriétés physico-chimiques .....	23
1.1.2. Composition chimique .....	25
1.2. Données biologiques .....	27
1.2.1. Spectre d'activité .....	27
1.2.2. Mécanismes d'action .....	27
1.2.3. Résistance.....	30
1.3. Utilisation .....	30
1.4. Toxicité .....	30
2. Germaben II® .....	33

2.1. Présentation chimique .....	33
2.1.1. Description générale.....	33
2.1.2. Propriétés physico-chimiques .....	33
2.2. Données biologique .....	33
2.3. Utilisation .....	33
2.4. Toxicité .....	34
2.5. Association .....	37
2.5.1. Parabens .....	37
2.5.1.1. Présentation chimique .....	37
2.5.1.2. Données biologique .....	39
2.5.1.3. Utilisation .....	40
2.5.1.4. Toxicité.....	40
2.5.2. Propylène glycol (PG) .....	41
2.5.2.1. Utilisation .....	41
2.5.2.2. Toxicité .....	41
3. Le bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA) .....	41
3.1. Présentation chimique .....	41
3.1.1. Identification chimique .....	41
3.1.2. Aspects chimique .....	42
3.1.3. Propriété physico-chimique .....	42
3.2. Données biologiques .....	45
3.2.1. Spectre d'activité.....	45
3.2.2. Mécanismes d'action .....	45
3.2.3. Résistance .....	46
3.3. Utilisation .....	46
3.4. Toxicité .....	47
<b>PARTIE II : Matériel et méthodes</b> .....	49
1. Matériel .....	50
1.1. Conservateurs .....	50
1.2. Matériel biologique .....	50
2. Méthodes .....	50
2.1. Préparation des solutions des conservateurs .....	50
2.2. Evaluation du pouvoir antimicrobien.....	51
2.2.1. Activité antifongique .....	51
a. a. Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton supplémentée.....	51
b. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) .....	53
c. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) .....	55
d. Méthode des courbes pour déterminer la CMF (time-kill curve) .....	55
2.2.2. Activité antibactérienne .....	56
a. Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton .....	56
b. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	57
c. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	58
2.3. Etude de la toxicité des conservateurs vis-à-vis des érythrocytes .....	58
2.3.1. Préparation de la suspension érythrocytaire .....	58
2.3.2. Evaluation de la toxicité des conservateurs vis à vis des globules rouges ...	58
<b>PARTIE III : Résultats et discussion</b> .....	60
1. Evaluation du pouvoir antimicrobien .....	61
1.1. Activité antifongique .....	61
1.1.1. Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton supplémentée (méthode des disques) .....	62



1.1.1.1. Milieu de culture SDA .....	62
1.1.1.2. Milieu de culture MHA .....	64
Conclusion .....	64
1.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF) par la méthode des microdilutions sur milieu liquide.....	66
1.1.2.1. Milieu de culture RPMI .....	66
1.1.2.2. Milieu de culture TSB .....	67
1.1.2.3. Milieu de culture BS .....	67
Conclusion .....	68
1.1.3. Détermination de la CMF par la méthode des courbes (Time-kill curve) .....	70
Conclusion .....	71
1.2. Activité antibactérienne .....	75
1.2.1. Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques).....	75
Conclusion .....	79
1.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide .....	81
1.2.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	81
1.2.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	84
1.2.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	87
Conclusion .....	88
1.2.3. Etude de l'effet synergique de l'acide gallique avec l'IU et le DU .....	91
3. Evaluation de la cytotoxicité des conservateurs vis à vis des globules rouges .....	98
3.1. Effet de l'Imidazolidinyl urée (IU) sur les globules rouges.....	98
3.2. Effet de Diazolidinyl urée (DU) sur les globules rouges.....	101
3.3. Effet de Germaben II® (GB) sur les globules rouges .....	103
3.4. Effet de BCTA sur les globules rouges .....	105
Conclusion .....	106
<b>Conclusion générale</b> .....	108
<b>Références bibliographiques</b> .....	111
<b>Annexe</b> .....	125

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AmB</b>	Amphotéricine B
<b>AQ</b>	Ammonium Quaternaire
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BCTA</b>	Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium
<b>BHIB</b>	Beef Heart Infusion Broth
<b>BHU</b>	1-(3,4-bis-hydroxymethyl-2,5-dioxo-imidazolidin-4-yl)-1,3-bis-hydroxymethyl-urea
<b>BN</b>	Bouillon Nutritif
<b>BPF</b>	Bonnes Pratiques de Fabrication
<b>BS</b>	Bouillon Sabouraud
<b>CMF</b>	Concentration Minimale Fongicide
<b><i>C.albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i>
<b>CAS</b>	Chemical Abstracts Service
<b>CFR</b>	Code of Federal Regulations
<b>CFTA</b>	Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association
<b>CIR</b>	Cosmetic Ingredient Review
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMB</b>	Concentration Minimale Bactéricide
<b>CMi</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CTFA</b>	Cosmetic, Toiletry and Frangrance Association
<b>DC</b>	Dermatite de contact
<b>DCA</b>	Dermatite de contact Allergique
<b>DCI</b>	Dermatite de contact Irritative
<b>DL</b>	Dose létale
<b>DMDM</b>	Diméthylol Diméthyl
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DU</b>	Diazolidinyl urée
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>E/H</b>	Eau/Huile
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediaminetétracétique
<b>EINECS</b>	European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances
<b>EUCAST</b>	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>FC&amp;C Act</b>	Federal Food, Drug, and Cosmetic Act
<b>FDA</b>	U.S. Food & Drug Administration
<b>GB</b>	Germaben II®
<b>GN</b>	Gélosé Nutritive
<b>H/E</b>	Huile/Eau
<b>HR-MS</b>	Spectroscopie de Masse à Haute Résolution
<b>HSI</b>	Hypersensibilité Immédiate
<b>HSR</b>	Hypersensibilité Retardée
<b>HU</b>	(4-hydroxymethyl-2,5-dioxo-imidazolidin-4-yl)-urea
<b>INCI</b>	International Nomenclature of Cosmetics Ingredients
<b>INT</b>	p-iodonitrotétrazolium
<b>IU</b>	Imidazolidinyl urée
<b>JP</b>	Japanese Pharmacopoeia
<b>MCI</b>	Méthylchloroisothiazolinone
<b>MH</b>	Bouillon Mueller Hinton

<b>MHA</b>	Muëller Hinton Agar
<b>MP</b>	Méthylparabens
<b><i>MRSA</i></b>	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
<b>MTT</b>	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltétrazolium bromide
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>OTC</b>	Over The Counter
<b><i>P.aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline "Tampon Phosphate Salé"
<b>PE</b>	Pharmacopée Européenne
<b>PG</b>	Propylène glycol
<b>PP</b>	Propylparabens
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RFMI</b>	Roswell Park Memorial Institut
<b><i>S.aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SCCNFP</b>	Scientific Comittee on Cosmetics Products and Non Food Products intended for consumers
<b>SDA</b>	Sabouraud Dextrose Agar
<b>TSB</b>	Bouillon Trypticase Soja
<b>UE</b>	Union Européenne
<b>UFC</b>	Unités Formant Colonies
<b>USP</b>	U.S. Pharmacopeia



## Résumé

Les produits cosmétiques sont exposés facilement aux contaminations microbiennes. Dans le but de palier à ce phénomène qui pose un réel problème, ces produits sont supplémentés de conservateurs chimiques qui ont pour rôle principal, l'inhibition de la croissance des microorganismes. Malheureusement, ces conservateurs sont à l'origine de phénomènes toxiques très sévères, c'est pourquoi, nous avons entrepris cette étude qui consiste à évaluer l'activité antimicrobienne (antifongique et antibactérienne) de quatre conservateurs Imidazolidinyl urée (IU), Diazolidinyl urée (DU), Germaben II® et bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA); et à étudier la cytotoxicité de ces conservateurs vis-à-vis du globule rouge humain.

Pour ce faire, nous avons testé une souche de levure type *Candida albicans* ATCC10231. Des souches de bactéries ont été également testées, il s'agit de *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas auruginosa* ATCC27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Ces souches représentent les principaux contaminants des produits cosmétiques.

Pour l'évaluation de l'activité de ces conservateurs vis-à-vis des souches sélectionnées, nous avons utilisé la méthode de diffusion de disques en milieu solide et la croissance en milieu liquide pour la détermination de la CMI et la CMB (CMF) (Clinical and Laboratory Standards Institute « CLSI »).

Les résultats obtenus ont montré que la concentration minimale microbicide (bactéricide et fongicide) la plus élevée de IU, DU, GB et de BCTA est de l'ordre de **25; 3,125; 25 et 12,5** mg/ml, respectivement. Ces concentrations induisent une libération de l'hémoglobine des globules rouges par des taux de : **36%, 75%, 66% et 15,5%**, respectivement.

En comparant nos résultats avec les concentrations autorisées des conservateurs dans les produits cosmétiques par les réglementations : Européenne, Américaine et Japonaise; nous pouvons dire que ces produits qui contiennent une concentration en IU de **6** mg/ml (UE) et en GB de **10** mg/ml sont en risque de contamination fongique. Cependant, le DU présent dans ces produits à une dose de **5** mg/ml (UE) exerce une meilleure inhibition microbienne avec une cytotoxicité massive vis-à-vis des globules rouges. Le BCTA est utilisé à des concentrations (**1** mg/ml) capables de prévenir les produits cosmétiques contre la contamination microbienne.

**Mots clés :** conservateur, cosmétique, activité antimicrobienne, cytotoxicité.

## Abstract

The cosmetic products are easily exposed with the microbial contaminations. With an aim of stage to this phenomenon which poses a real problem, these products are supplemented chemical preservatives that have as a main role, the inhibition of the growth of the micro-organisms. Unfortunately, these preservatives are at the origin of very severe toxic phenomena, this is why, we undertook this study which consists in evaluating the antimicrobial activity (antifungal and antibacterial) of four preservatives: Imidazolidinyl urea (IU) and Diazolidinyl urea (DU), Germaben II® and of N-cetyl-N, N, N-trimethylammonium bromide (BCTA); and to study the cytotoxicity of these preservatives with against to the human erythrocyte.

With this intention, we tested a standard yeast stock *Candida albicans* ATCC10231. Strains of bacterium were also tested; it acts of *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas auruginosa* ATCC27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC25923. These strains represent the principal contaminants of the cosmetic products.

For the evaluation of the activity of these preservatives against the selected strains, we used the method of Disk Diffusion in solid medium and the growth in liquid medium for the determination of the MIC and MBC (MFC) (Clinical and Standard Laboratory Institute "CLSI").

The results obtained showed that the highest minimum microbicidal concentration (bactericidal and fungicidal) of IU, DU, GB and BCTA is about: **25; 3,125; 25 and 12,5** mg/ml, respectively. These concentrations induce a release of the hemoglobin of the erythrocytes by rates of: **36%, 75%, 66% and 15,5%**, respectively.

By comparing our results with the authorized concentrations of the preservatives in the cosmetic products by the European, American and Japanese regulations; we can say that these products which contain a concentration in IU of **6** mg/ml (EU) and in GB of **10** mg/ml are in risk of fungi contamination. However, the DU present in these products with an amount of **5** mg/ml (EU) exerts a better microbial inhibition with a massive cytotoxicity against the erythrocytes. The BCTA is used with concentrations (**1** mg/ml) able to prevent the cosmetic products against the microbial contamination.

**Key words:** preservative, cosmetic, antimicrobial activity, cytotoxicity

# Introduction

Notre travail s'insère dans ce cadre et consiste à étudier dans un premier temps, l'évaluation et la détermination de l'activité antimicrobienne de quatre conservateurs utilisés dans l'industrie des produits cosmétiques. Il s'agit de : l'Imidazolidinyl urée (IU), le Diazolidinyl urée (DU), le Germaben® (GB) et le Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA); vis-à-vis de trois souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et une levure *Candida albicans* ATCC 10231.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à étudier la cytotoxicité de ces conservateurs vis-à-vis du globule rouge humain.

**Première partie:**  
**Synthèse bibliographique**



indésirables. Les ingrédients technologiques les plus utilisés dans la cosmétique sont : les colorants, les conservateurs antimicrobiens, les conservateurs antioxydants, les abrasifs, les tampons, les opacifiants... (MARTINI 2006c).

### **4.3. Ingrédients actifs :**

Sont des substances considérées comme des molécules actives qui peuvent réaliser le rôle des produits cosmétiques. Selon les produits, les ingrédients actifs sont variés, on cite: les parfums, les adoucissants, les hydratants, les agents de sensation de peau, les ramollissants de peau, les épaississants, les agents de blanchissement.... (EDSER 2006).

### **5. Place des conservateurs antimicrobiens dans la cosmétique :**

Depuis les années 60, la contamination microbienne des produits cosmétiques est un thème principal dans la cosmétologie, ce qui a poussé les fabricants à améliorer leurs produits par l'élaboration de nouvelles méthodes de fabrication.

Une étude antérieure a rapporté qu'un adulte utilise quotidiennement neuf produits cosmétiques et plus de 25% de femmes emploient 15 produits ou plus, dont 88% contenant des conservateurs antimicrobiens [(SEDLIEWICZ 2005), (RAVITA et coll. 2009)].

Les conservateurs antimicrobiens sont parmi les ingrédients les plus mineurs dans les formulations cosmétiques. Ils représentent une concentration de 0,01 à 1% (EDSER 2006). Ils sont, après les parfums, les constituants les plus souvent en cause des réactions d'intolérance. Le contrôle et la surveillance de ces ingrédients sont renforcés, les concentrations ont été délimitées et leur utilisation a été réduite (DUCOMBS 2000).

Enfin, la conservation des produits cosmétiques reste toujours une nécessité primordiale, soit par des molécules synthétiques ou naturelles. On peut améliorer les éléments de conservation, les méthodes de fabrication, les procédés de préservation et les techniques d'utilisation pour diminuer ou éliminer la toxicité des conservateurs synthétiques.

## **Chapitre 2 : Les conservateurs antimicrobiens dans la cosmétique :**

Les produits cosmétiques et tout produit contenant l'eau et des composés organiques et/ou inorganiques sont exposés à la contamination microbienne, et fait d'eux, des produits nécessitant une conservation efficace et adéquate pour préserver et prévenir l'aspect microbiologique, sanitaire et économique du produit (KABARA et ORTH 1997) (HUANG et coll. 2003).

En cosmétique, on différencie deux groupes de substances conservatrices : les conservateurs antimicrobiens agissant sur les microorganismes, bactéries, levures et champignons, et les



antioxydants capables de s'opposer à tous les phénomènes d'oxydation et à l'apparition de radicaux libres (MARTINI 2006c).

Lors de leur processus de fabrication, les produits cosmétiques ne subissent pas de stérilisation par des processus qui risquent d'altérer leurs structures, ils doivent être conservés ou protégés par des substances chimiques naturelles ou synthétiques, biologiquement actifs dites: « conservateurs antimicrobiens » [(GRUVBERGER et BRUZE 1997), (RAVITA et coll. 2009)].

### **1. Définition du conservateur:**

Les agents conservateurs sont des substances qui sont ajoutées comme ingrédients à des produits, principalement pour inhiber le développement ou empêcher la croissance de microorganismes dans ces produits (76/768 /CEE 2008). Ces ingrédients peuvent être bactériostatiques ou bactéricides (EASLEY et coll. 2003).

De manière générale, un bon conservateur est une substance chimique naturelle ou synthétique, à poids moléculaire faible, stable et compatible avec les ingrédients utilisés dans la cosmétique ; elle n'est pas toxique mais efficace contre un large spectre de microorganismes pendant une longue durée, réactive avec plusieurs cibles cellulaires, utilisée en faibles concentrations et n'a aucun effet indésirable sur l'aspect du produit (insipide, inodore, sans couleur). Elle est stable à la température des phases chaudes et froides et efficace dans un intervalle de pH de 2,5 à 10,5 avec un effet neutre sur le produit. En plus, son approvisionnement doit être facilement disponible, à un prix bas pour l'employer et acceptable par les organismes de normalisation mondiaux [(MITSUI 1993), (SASSEVILLE 2004)].

### **2. Rôles des conservateurs :**

Les conservateurs antimicrobiens sont ajoutés dans les produits cosmétiques pour deux raisons principales :

- Au niveau du produit lui-même :

Ceci a pour but de protéger le produit contre les altérations microbiennes et prolonger sa date d'expiration. En effet, les matières premières des produits cosmétiques fournissent une gamme étendue de composés minéraux et organiques, qui en présence de l'eau, représentent une source de carbone (glycérine, sorbitol...) et une source d'azote (les dérivés des protéines et les acides aminés...) pour la croissance microbienne [(KABARA et ORTH 1997) (VARVARESOU et coll. 2009)].

- Au niveau du consommateur :

Afin de protéger le consommateur contre les différentes infections pathogènes. Plusieurs cas de contaminations par *Pseudomonas aeruginosa* se sont produites, et particulièrement au niveau de la cornée [(SONDOSSI et coll. 1989), (CAMPANA et coll. 2006)].

### 3. Contamination des produits cosmétiques :

L'omniprésence des microorganismes, la nature des ingrédients utilisés (eau, composés organiques...), la température et le pH sont des facteurs qui favorisent la contamination microbienne des produits cosmétiques. Cette contamination peut mener à l'infection des consommateurs ou la détérioration des produits finis (KABARA et ORTH 1997). Les caractéristiques générales des contaminants typiques des produits cosmétiques sont citées dans le tableau (01).

La contamination microbienne peut compromettre l'aspect des produits cosmétiques par des effets de décoloration, la formation d'odeur et la production de gaz, par exemple, des pigments caractéristiques des contaminants tels que la prodigiosine rouge de *Serratia marcescens* et des pigments verdâtres par *Pseudomonas aeruginosa* [(SUTTON 2006), (KUNICKA-STYCZYŃSKA et coll. 2009)].

De plus, l'arome de parfum est aisément compromis par des composés organiques comme le skatole, l'indol et le sulfure d'hydrogène, qui sont synthétisés par divers microorganismes (GEIS 2006a).

Plusieurs infections microbiennes causant le décès de certains patients immunodéprimés ont été attribuées à l'usage de certains types de shampoings contaminés par le germe *Pseudomonas aeruginosa*. L'utilisation des bains de bouche contaminés dans une unité de soins aux USA a causé 74 cas d'infections nosocomiales. Ceci représente un problème pour la santé publique surtout avec l'émergence des conditions d'immunodéprimés (GEIS 2006a).

La contamination microbienne peut se produire au cours de la fabrication, on parle de contamination primaire et/ou au moment de l'utilisation des produits cosmétiques par le consommateur, il s'agit de contamination secondaire (Tableau 01) [(MITSUI 1993), (SMITH et ALEXANDER 2005)].





### 4. Principales classes de conservateurs dans la cosmétique :

Les conservateurs antimicrobiens les plus employés sont les suivants : (Tableau 02)

Les acides organiques sont actifs si le nombre de carbone des chaînes alkyles est élevé. En revanche, leur solubilité dans l'eau diminue. Le pKa acide de ces conservateurs doit être contrôlé et une variation de pH de 1,5 unité ou plus au dessus de la neutralité peut causer la perte progressive de l'activité antimicrobienne.

Les alcools et les phénols sont des substances qui possèdent des propriétés antimicrobiennes très efficaces. Leur action est bactéricide, surtout vis-à-vis des bacilles acido-résistants.

A partir de la structure chimique des phénols, il a été remarqué que :

- Les para-substitutions de la chaîne alkyle à six atomes de carbone augmentent l'activité antibactérienne des phénols. De plus, les para-substituants linéaires confèrent une plus grande activité que les substituants à chaînes ramifiées contenant un même nombre d'atomes de carbone.
- L'halogénéation augmente l'activité antibactérienne des phénols. Quand le groupe alkyl est en position ortho et l'halogène en position para, le phénol aura une plus grande activité antibactérienne.
- La nitration, présente l'avantage d'augmenter l'activité vis-à-vis des bactéries par l'altération de la phosphorylation oxydative.
- Dans la série des bisphénols, l'activité est liée avec les deux cycles  $C_6H_5$  qui sont séparés par des groupes  $-CH_2-$ ,  $-S-$  ou  $-O-$ . Si les groupes sont  $-CO-$ ,  $-SO-$  ou  $-CH(OH)-$ , l'activité antimicrobienne chute. En outre, il a été retrouvé que l'halogénéation des bisphénols et la présence des groupes hydroxyles en position 2,2' contribuent à l'augmentation de l'activité antimicrobienne des bisphénols.

Le formaldéhyde connu sous le nom d'oxyméthylène ou formaline, est un conservateur utilisé dans les shampoings, les gels douches et les savons liquides. Il est libre ou lié avec les donneurs de formaldéhyde. Au Japon et en Suède, le formaldéhyde est interdit dans les produits cosmétiques et les articles de toilettes car c'est un produit capable de produire le cancer chez les consommateurs (MOORE et PAYNE 2004).

Les isothiazolinones sont très actifs par les groupements thiols et les amines de leurs structures. Ces conservateurs sont souvent masqués sous les noms chimiques du mélange qui les constitue. Ils sont de moins en moins employés suite au grand nombre de réactions allergiques dénoncées par les dermatologues.

Formaldéhyde et donneurs de formaldéhydes	$H_2C = O$	Formaldéhyde
		Imidazolidinyl urée (Germall 115®)
		Diazolidinyl urée (Germall II®)
		2-bromo-2-nitro propane-1,3-diol ou le Bronopol®
		DMDM hydantoin (1,3-diméthylol-5,5-diméthyl hydantoin « Glydant® »)
		Quaternium 15 (ou 1-(3-chloroallyl)-3,5,7-triaza-1-azonia-adamantane-chlorure)
		5- Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (Bronidox®)
		Hexaméthylenetetramine
		Monométhyloldiméthyl hydantoin
Isothiazolinones		Méthylisothiazolinone
		Chlorométhylisothiazolinone, Kathon CG (5-Chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (CMIT) et 2-méthyl-4-isotbiazolin-3-one (MIT))
Biguanides		Digluconate de chlorhexidine
		Alexidine
		Biguanide polyaminopropyl



éthylènediaminetétracétique) est connu pour sa synergie avec plusieurs conservateurs chimiques, il perturbe la couche lipidique externe des bactéries et augmente la pénétration des autres composés antimicrobiens dans la cellule (SIQUET et DEVLEESCHOUWER 2006).

La compatibilité physique est également importante. Le type de récipient utilisé pour emballer un produit cosmétique influencera la concentration et l'activité des conservateurs. Généralement, les conservateurs lipophiles sont associés à un plus grand risque d'absorption par des récipients. Certains récipients ne sont pas compatibles avec certains conservateurs, tels que le Nylon avec les Parabens ou le Polyéthylène avec certains composés phénoliques, mercuriels et benzoates (SUTTON 2006).

### **7.3. Efficacité :**

Un bon conservateur doit empêcher le développement des microorganismes sur un large spectre d'activité et par une durée d'activité supérieure à celle du produit cosmétique (équivalente à la durée de conservation prévue plus le temps d'utilisation) (TOLER 1985). En outre, l'activité antimicrobienne devra être suffisamment efficace pour empêcher l'adaptation ou la résistance au système conservateur (SIQUET et DEVLEESCHOUWER 2006). La richesse des produits cosmétiques par les éléments nutritifs, favorise la croissance des microorganismes et influence l'efficacité des conservateurs (MARTINI 2006c).

### **7.4. Innocuité :**

La plupart des conservateurs ont un faible poids moléculaire, et peuvent causer des réactions d'intolérance pendant l'utilisation des cosmétiques. En général, le fabricant des produits cosmétiques tente toujours à chercher des substances efficaces et non toxiques (BELSITO 2008).

### **7.5. Conformité avec la législation du cosmétique :**

Selon l'Article 4 de la directive du conseil d'UE 76/768/EEC : « Les états membres interdisent la mise sur le marché des produits cosmétiques contenant: (...) des agents conservateurs autres que ceux énumérés dans la première partie de l'annexe VI (...) » (76/768 /CEE 2008). Aussi la FDA et les réglementations au Japon réduisent et limitent la mise en marché des agents conservateurs par des annexes publiés et bien élucidés dans l'industrie des produits cosmétiques (HALPER et coll. 2006).

### **7.6. Coût :**

Le coût des ingrédients des produits cosmétiques représente un facteur très important pour leur commercialisation. En conséquence, l'industrie offre toujours d'ajouter des ingrédients moins chers que coûteux (WHITE 2003).

## 8. Toxicité des conservateurs :

L'usage des produits cosmétiques est à l'origine dans certaines situations des dermatites de contact rencontrées beaucoup plus chez les femmes que chez les hommes. Il existe un lien direct entre l'effet antimicrobien et la capacité à induire une sensibilité de contact. Ceci peut expliquer le fait que les conservateurs les plus efficaces sont souvent ceux qui possèdent le potentiel de sensibilité le plus important. Les conservateurs représentent, après les parfums, le deuxième grand groupe d'allergènes les plus fréquemment incriminés dans l'allergie aux cosmétiques (CRÉPY 2006).

Typiquement, la dermite de contact est une réaction eczémateuse, habituellement à une substance appliquée à la surface de la peau. La dermatite de contact (DC) affecte approximativement 20% de la population aux États-Unis (BELSITO 2008). Pathophysiologiquement, la DC peut être divisée en réactions dermatites de contact allergiques (DCA) (affecte 6% de la population générale) et réactions dermatites de contact irritatives (DCI) (GUIN 2007).

## Chapitre 3 : Les conservateurs étudiés

Plusieurs conservateurs peuvent être employés dans les produits cosmétiques, mais seulement quelques substances ont été fréquemment utilisées dans l'industrie. Nous allons présenter dans ce chapitre quatre conservateurs largement utilisés dans les produits cosmétiques et qui ont fait l'objet de notre étude, il s'agit de : l'Imidazolidinyl urée (Germall 115<sup>®</sup>) et le Diazolidinyl urée (Germall II<sup>®</sup>), qui sont deux libérateurs de formaldéhyde; le Germaben II<sup>®</sup> qui est une association de plusieurs agents conservateurs antibactériens et antifongiques; et le bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA) qui représente la grande famille des ammoniums quaternaires.

### 1. Imidazolidinyl urée (IU) et le Diazolidinyl urée (DU) :

Ce sont des conservateurs qui, en présence d'eau ou de solvants polaires, dégagent le formaldéhyde et ne restent pas sous leur forme simple (WHITE et GROOT 2006).

L'Imidazolidinyl urée (IU) et le Diazolidinyl urée (DU) sont deux conservateurs donneurs de formaldéhyde bien connus dans le domaine de la cosmétique. Ils se composent de mélanges complexes de nombreux produits (Allantoïne-formaldéhyde) condensés et rapidement dégradables (LEHMANN et coll. 2004).



- L'Imidazolidinyl urée est le deuxième conservateur employé couramment dans l'industrie des produits cosmétique après les parabens (AGNER et coll. 2004). Son nom commercial « Germall 115 » a été adopté par la *Cosmetic, Toiletry and Frangrance Association* (CTFA) en 1973 [(KANTOR et coll. 1985), (LEHMANN et coll. 2006)].

L'Imidazolidinyl urée est soluble dans l'eau et les solvants polaires. Le dégagement de formaldéhyde de l'Imidazolidinyl urée dans une solution aqueuse augmente avec l'augmentation du pH et la température de la solution aussi bien qu'avec l'augmentation de la période de stockage (SCCNFP 2002b). Une molécule d'Imidazolidinyl urée peut libérer deux molécules de formaldéhydes dans des conditions appropriées (KARLBERG et coll. 1998). Tout le contenu libre de formaldéhyde dans un produit contenant 0.6% d'Imidazolidinyl urée correspondra ainsi à 0.186% (SCCNFP 2002a).

- Le Diazolidinyl urée est un hétérocycle substitué d'urée, produit par la réaction de l'allantoïne et du formaldéhyde que celui de l'Imidazolidinyl urée (MOORE et PAYNE 2004). Il a été commercialisé en 1982 par sous le nom de Germall II (KANTOR et coll. 1985).

Dans la solution aqueuse, le Diazolidinyl urée est décomposé pour libérer le formaldéhyde. Une molécule de Diazolidinyl urée peut libérer 4 molécules de formaldéhyde dans des conditions appropriées (KARLBERG et coll. 1998). Tout le contenu libre de formaldéhyde dans un produit contenant 0.5% de Diazolidinyl urée correspondra ainsi à 0.215% (SCCNFP 2002a).

### **1.1. Présentation chimique :**

#### **1.1.1. Identification et propriétés physico-chimiques :**

Le tableau (03) donne les principales informations physico-chimiques de l' Imidazolidinyl urée et du Diazolidinyl urée.

**Tableau (03) :** Les données chimiques de l'Imidazolidinyl urée et du Diazolidinyl urée [(JEEN et coll. 1998), (HECTORNE et FRANSWAY 1994), (AGNER et coll. 2004), (GEIS 2006b), (N.Z.D.S.I. 2007),

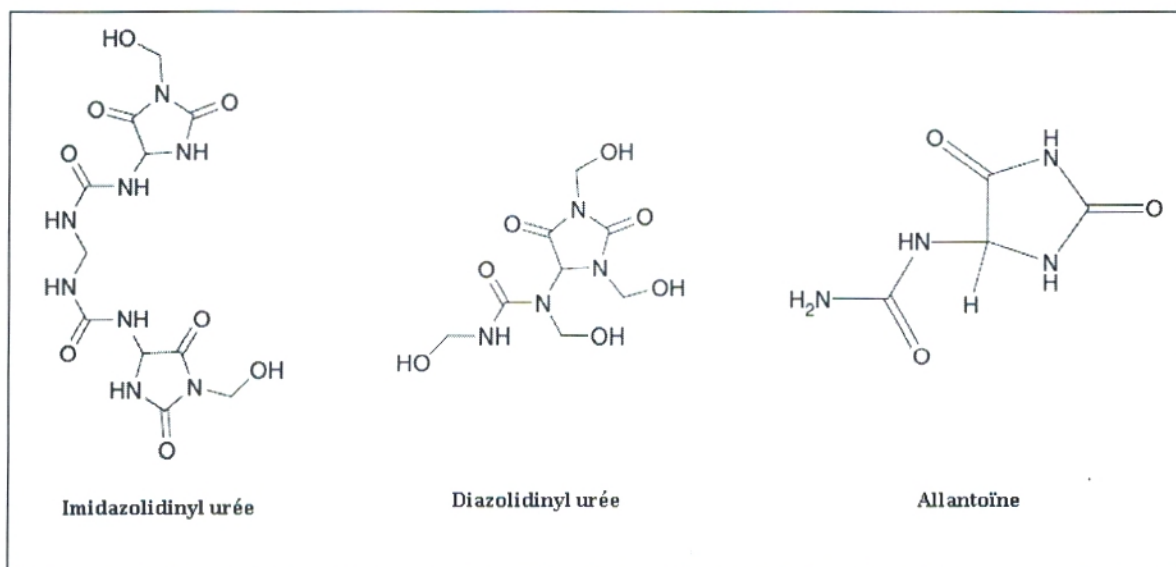
	Imidazolidinyl urea	Diazolidinyl urea	
<b>Nombre d'enregistrement</b>	CAS : 39236-46-9 EINECS : 254-372-6	CAS : 78491-02-8 EINECS : 278-928-2	
<b>Nom chimique</b>	N, N'-methylene-bis-N'-[1-(hydroxyméthyl)-2,5-dioxo-4-imidazolidinyl] urea ou 3,3-Bis(1-hydroxyméthyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)-1-1'-methyl-diurea	N-[1,3-bis(hydroxyméthyl)-2,5-dioxo-4-imidazolidinyl]-N,N'-bis(hydroxyméthyl)urea ou N-(hydroxyméthyl)-N-(1,3-dihydroxyméthyl-2,5-dioxo-4-imidazolidinyl)-N-(hydroxyméthyl) urea	
<b>Synonymes</b>	Germall 115; Euxyl K 200; Abiol; Chemynol I; Gram 1; Imidurea; Imidurea NF; Intersept Plus; Jeeicide U-13; Nipa Biopure 100; Protacide U-13; Sepicide CI; Sept 115; Tristat 1U; Unicide U-13	Germaben II; Germaben II-E; Germall II; Microcidelvtm; DiszolidinylUrea; JEECIDU U-14	
<b>Classe chimique</b>	Composé hétérocyclique substitué d'urée, donneur de formaldéhyde.		
<b>Formule</b>	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	
<b>Poids moléculaire [g/mol]</b>	388.29354	278.23	
<b>Propriétés physico-chimiques</b>	<b>Apparence</b>	Poudre blanchâtre fine hygroscopique.	
	<b>Odeur</b>	Inodore	Inodore ou légèrement caractéristique.
	<b>Point de fusion</b>	150 °C	
	<b>Solubilité</b>	Soluble dans l'eau, l'éthylène glycol, le propylène glycol, le glycérine ; légèrement soluble en méthanol ; insoluble en éthanol et l'huile de sésame	Soluble dans l'eau
	<b>pH optimale</b>	6.0 - 7.5 (1% Sol).	
	<b>Réactivité</b>	Stable à la température ambiante dans des récipients fermés ; incompatible avec les oxydants forts ; se décompose en oxydes d'azote, monoxyde de carbone, et bioxyde de carbon, entre d'autres produits	Stable
	<b>Produits et impuretés techniques</b>	(~95%) est fournie par le Sigma-Aldrich (I5133_SIGMA)	
	<b>Compatibilité</b>	Compatible avec les composés ioniques, non-ioniques, et les protéines. Réaction croisées avec formaldéhyde et les autres donneurs de formaldéhydes.	
	<b>Stabilité</b>	donneurs de formaldéhyde après décomposition; se décompose >160 °C	
	<b>Densité</b>	1.85g/cm <sup>3</sup>	1.83 g/cm <sup>3</sup>

### 1.1.2. Composition chimique :

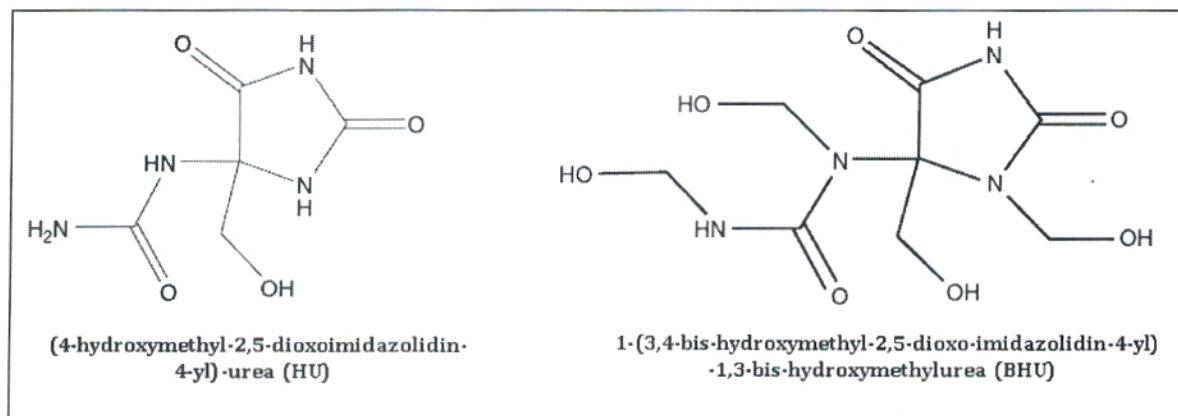
L'Imidazolidinyl urée contient au moins quatre composés : Allantoïne (Figure 02), (4-hydroxyméthyl-2,5-dioxy-imidazolidin-4-yl)-urée (HU) (Figure 03) et deux autres composés non identifiés, vraisemblablement les formaldéhydes. La quantité de l'HU et de l'Allantoïne dans l'Imidazolidinyl urée est de l'ordre de 10% et 20%, respectivement. Les deux autres composés non-identifiés sont estimés approximativement à 5% chacun. Les 60% qui restent sont très probablement des polymères d'Allantoïne-formaldéhyde condensés.

La structure et les caractéristiques chimiques du Diazolidinyl urée sont connues. Le Diazolidinyl urée est formé de plusieurs composés où le [1-(3,4-bis-hydroxyméthyl-2,5-dioxy-imidazolidin-4-yl)-1,3-bis-hydroxyméthyl-urée] BHU (Figure 03) est le composé dominant en se basant sur les résultats des analyses de la RMN et la HR-MS (Spectroscopie de Masse à Haute Résolution). La quantité de BHU est de l'ordre de 30–40%, le reste est composé de polymères d'Allantoïne-formaldéhyde condensés (LEHMANN et coll. 2006).





**Figure (02) :** Structures chimiques de l'Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée et l'Allantoïne (LEHMANN et coll. 2006)



**Figure (03) :** Structures chimiques du HU et du BHU (LEHMANN et coll. 2006)

### 1.2. Données biologiques :

#### 1.2.1. Spectre d'activité :

Le formaldéhyde libéré par l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée est un agent microbicide, qui a une activité létale contre les bactéries, les spores bactériennes, les mycètes et les virus [(NEELY 1963a), (NEELY 1963b), (TRUJILLO et DAVID 1972), (MANCHEE et coll. 1994)].

L'Imidazolidinyl urée est plus actif contre les bactéries que les mycètes. Cependant, le Diazolidinyl urée a un spectre antimicrobien plus large que l'Imidazolidinyl urée, il a une bonne activité vis-à-vis des bacilles à gram négatif (y compris *Pseudomonas*), des bactéries à gram positif, des levures et des moisissures [(KANTOR et coll. 1985), (STEPHENS et coll. 1987), (WILLIAMS et coll. 1997)]. Le Diazolidinyl urée utilisé à une concentration de 0,1 à 0,3%, montre un large spectre d'activité dans une gamme de pH de 2 à 9. Il est employé souvent en synergie avec le Méthylparaben et le Propylparaben pour augmenter l'activité contre les moisissures (LLABRES et coll. 1985).

#### 1.2.2. Mécanismes d'action :

L'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée sont des conservateurs qui doivent leur action antimicrobienne à leurs structures mères, capable de libérer des molécules de formaldéhyde (LEHMANN et coll. 2006).

#### Accès à la cible:

Le taux et l'ampleur de la libération de formaldéhyde à partir de l'Imidazolidinyl urée ou du Diazolidinyl urée sont influencés par leur structure chimique, la température, le pH, les sels et les autres ingrédients employés dans l'industrie. On ignore jusqu'à présent si le dégagement significatif du formaldéhyde se produit dans la cellule ou dans la matrice du produit cosmétique (CHAPMAN 2006).

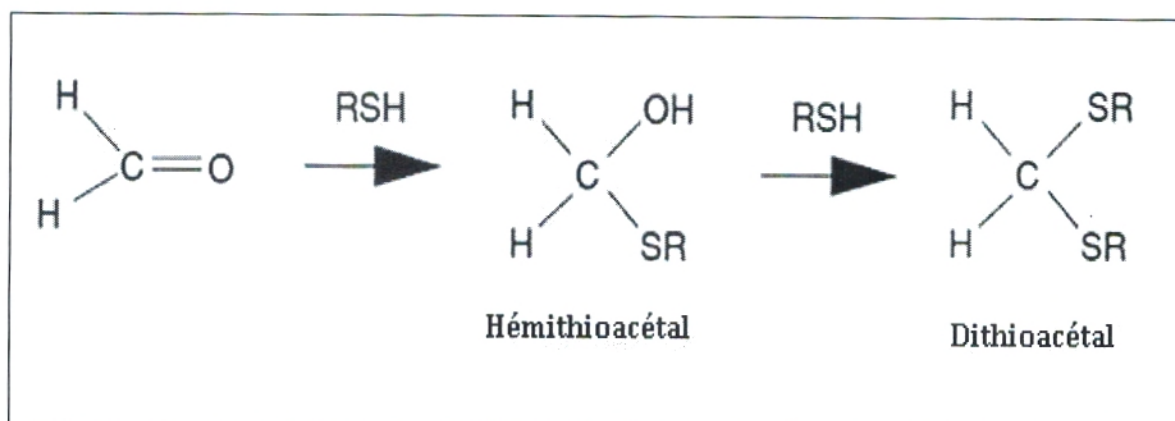
Les moyens par lesquels l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée arrivent à leurs cibles sont très mal compris. Il est admis que, grâce à leur petite taille, leur charge et leur équilibre hydrophobe-hydrophile raisonnable, ces molécules peuvent traverser la membrane externe des bactéries à gram négatif par la diffusion à travers les porines. Ces molécules vont par la suite diffuser à travers les membranes cellulaires pour accéder à l'intérieur de la cellule. Une fois dans le périplasme, ces molécules vont franchir la membrane cytoplasmique, soit par la diffusion passive où la différence de concentration (gradient), ou par le transport facilité (CHAPMAN 2006).

### Réactions du formaldéhyde dans la cellule :

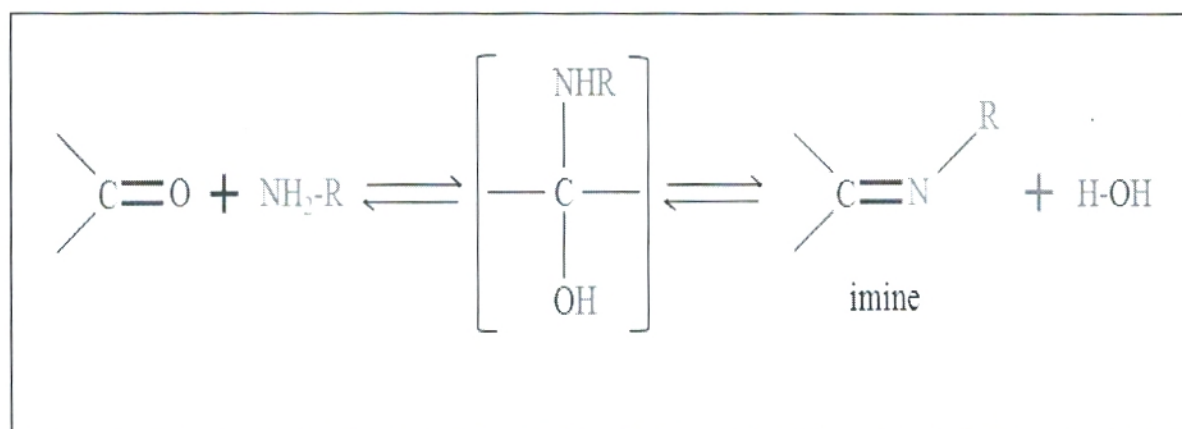
Le formaldéhyde est un produit qui réagit facilement avec les groupements aminés, amides, imino, thiols, carboxyles et hydroxyles [(GOUGH et coll. 1984), (CHAPMAN 2003a)]. Il se lie par des liaisons covalentes avec les protéines pour donner une réticulation intermoléculaire de ces protéines. En plus, le formaldéhyde peut réagir avec les groupements azotés des purines et des pyrimidines des acides nucléiques par alkylation (LAMBERT 2004a).

Dans les conditions physiologiques, les principaux centres nucléophiles qui peuvent être attaqués par le formaldéhyde sont les thiols et les amines. Les thiols (R-SH) réagissent plus facilement avec les aldéhydes, il se forme un hémimercaptal (ou hémithioacétal) puis un dithioacétal qui sont stables en milieu basique (MILCENT 2007). La double liaison du carbonyle s'ouvre, le thiol est additionné, et l'oxygène est réduit (Figure 04). Si ce thiol se trouve dans le site actif d'un enzyme, ce dernier est inactivé (CHAPMAN 2006).

Les amines primaires (R-NH<sub>2</sub>) réagissent avec les aldéhydes en s'y additionnant pour former un adduit, dérivé  $\alpha$ -hydroxyaminé instable qui élimine une molécule d'eau. L'ensemble de ces réactions, addition plus élimination, est une condensation (Figure 05). Il se forme alors un composé dans lequel l'oxygène du composé carbonyle de départ est remplacé par un azote lié à différents groupements selon le réactif azoté utilisé. L'addition est d'autant plus facile que le caractère nucléophile des réactifs azotés est élevé (MILCENT 2007).



**Figure (04):** Réaction de formaldéhyde avec les thiols [(CHAPMAN 2006), (MILCENT 2007)]



**Figure (05):** Réaction de formaldéhyde avec les amines primaires (MILCENT 2007)



### 1.2.3. Résistance:

Seulement deux mécanismes de résistance ont été révélés pour le formaldéhyde, l'imperméabilité des cellules, et l'inactivation enzymatique des conservateurs (POOLE 2004).

La résistance non-enzymatique représentée par l'imperméabilité, semble dépendre des changements dans la membrane externe des bactéries à gram négatif qui limitent leur perméabilité (POOLE 2004). Une étude réalisée sur des bacilles à gram négatif isolés à partir de produits de consommation, a montré que la réduction de la sensibilité du libérateur de formaldéhyde est due à une défaillance des porines. Cette étude indique que la réduction de la perméabilité aux formaldéhydes par l'intermédiaire de la perte de porines peut être une stratégie réussie pour les bactéries (CHAPMAN 2006).

Les bactéries peuvent résister au formaldéhyde par la synthèse d'une enzyme : la déshydrogénase de formaldéhyde, qui utilise le formaldéhyde comme substrat pour donner le formiate et le NAD réduit [(KÜMMERLE et coll. 1996) (CHAPMAN 2003a)]. L'enzyme a été détectée chez *E.coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*, et *Enterobacter sp.* [(CHAPMAN 2003a), (POOLE 2004)].

### 1.3. Utilisation :

L'Imidazolidinyl urée est principalement employé comme conservateur antimicrobien dans les produits cosmétiques et d'autres produits de soin personnel. En raison de sa haute solubilité dans les solutions polaires, l'Imidazolidinyl urée peut être incorporé à la quasi-totalité des produits cosmétiques à base d'eau (AGNER et coll. 2004). Il est présent dans une large gamme de produits liquides ou poudres, principalement dans les lotions de bébés, les crèmes de peau, les produits solaires, les shampoings, les produits de maquillage et démaquillage du visage et des yeux, les rouges à lèvres, les parfums, les déodorants, les teintures capillaires, les crèmes à raser, les masques protecteurs, les crèmes de bronzage, les antirides, les remèdes de brûlure, les savons liquides, les crèmes et les lotions d'hydratation, et d'autres produits de soins de la peau et exceptionnellement dans les médicaments topiques prescrites [(O'BRIEN 1987), (TRAN et COLLIER 1992), (FLYVHOLM et ANDERSEN 1993), (AGNER et coll. 2004), (COZ et LEPOITTEVIN 2006), (N.Z.D.S.I. 2007)].

Le Diazolidinyl urée a été employé aussi comme un conservateur antimicrobien dans plusieurs formulations pharmaceutiques topiques et cosmétiques tels que les crèmes, les lotions, les produits de soins capillaires, les produits *Over The Counter* (OTC) topiques [(ROSEN et McFARLAND 1984), (COZ et LEPOITTEVIN 2006)].

### 1.4. Toxicité :

L'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée sont des allergènes bien connus. STEPHENS et coll. ont constaté que le Diazolidinyl urée se comporte comme un allergène primaire et l'Imidazolidinyl urée peut devenir un allergène secondaire (STEPHENS et coll. 1987). Des cas fréquents de réactions allergiques de dermite de contact aux deux conservateurs ont été rapportés [(MENNE' et SOMMER 2001), (BOYVAT et coll. 2005)].

Cependant, la question qui se pose, si la réaction allergique est provoquée par le composé lui-même en tant qu'haptènes ou par le formaldéhyde qu'il libère progressivement (CRÉPY 2006). La littérature n'apporte pas une réponse précise à cette question, mais la plupart des données indiquent que l'allergie par contact vers les composés eux-mêmes existe réellement (MENNE' et SOMMER 2001). Plusieurs études ont considéré que l'allergie aux l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée était en liaison avec l'allergie au formaldéhyde (AALTO-KORTE et coll. 2008).

Imidazolidinyl urée : Dans une étude in vitro, l'Imidazolidinyl urée s'est avérée légèrement cytotoxique aux œufs d'oursin en inhibant l'activité de H<sup>+</sup>-ATPase ainsi que la synthèse d'ADN. Cependant, ce composé n'affecte pas le flux d'ions, la perméabilité de la membrane et la phosphorylation de protéines (AGNER et coll. 2004).

Diazolidinyl urée : En 1985, KANTOR et coll. ont rapporté le premier cas d'une dermatite allergique de contact aiguë de Diazolidinyl urée dans un gel de cheveux (KANTOR et coll. 1985).

Dans une autre étude, en 1989, PERRET et HAPPLE ont confirmé que l'utilisation croissante de Diazolidinyl urée augmente le potentiel d'allergie de ce conservateur (PERRET et coll. 1989). Des observations semblables ont été rapportées par ZAUGG et HUNZIKER et par GROOT et coll. qui ont décrits quatre patients sensibles à Diazolidinyl urée, deux d'entre eux, étant aussi, réactifs au formaldéhyde (TOSTI et coll. 1990).

PFUHLER et WOLF en 2002 ont conclu dans leur étude que ce conservateur est un agent qui montre une faible activité mutagène (PFUHLER et WOLF 2002).

Le tableau (04) illustre quelques informations des risques d'exposition aux l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée chez les rats et les lapins.



## **2. Germaben II<sup>®</sup> (GB):**

La plupart des fabricants des conservateurs ont développé leurs propres mélanges synergiques des produits chimiques; ceci permet l'utilisation des concentrations basses de chaque produit chimique et diminuer ainsi le potentiel de toxicité avec une efficacité accrue. Cette combinaison peut être réalisée par trois à six systèmes conservateurs, l'exemple récent de cette combinaison est le Germaben II<sup>®</sup> [(SIQUET et DEVLEESCHOUWER 2006), (LUNDOV et coll. 2009)].

### **2.1. Présentation chimique :**

#### **2.1.1. Description générale:**

Germaben II<sup>®</sup> est un liquide visqueux clair sans couleur avec une odeur douce caractéristique. Il doit être stocké hermétiquement, dans un endroit frais ou sec à l'abri de la lumière solaire (I.S.P. 2008). Germaben II<sup>®</sup> contient : le Propylène Glycol, le Méthylparaben, le Propylparaben et le Diazolidinyl Urée [(Figure 06) et (Tableau 05)].

#### **2.1.2. Propriétés physico-chimiques :**

Le Tableau (06) montre les propriétés physico-chimiques de Germaben II<sup>®</sup>.

Le Germaben II<sup>®</sup> est sensible à la chaleur et doit être ajouté à l'eau ou à la partie émulsionnée de la formulation à une température ne dépassant pas 60°C (C.I.C. 2009). Il est stable dans des conditions normales de manutention, utilisation et de transport (I.S.P. 2008).

### **2.2. Données biologiques :**

#### Spectre d'activité :

Ce produit est un système conservateur antimicrobien efficace contre les bactéries à gram positif et à gram négatif, les levures et les moisissures (I.S.P. 2008). Il montre son activité antibactérienne par le Diazolidinyl Urée et son activité antifongique par le Méthylparaben et le Propylparaben. Cette association des trois conservateurs a été solubilisée dans le Propylène glycol (C.I.C. 2009).

#### **2.3. Utilisations :**

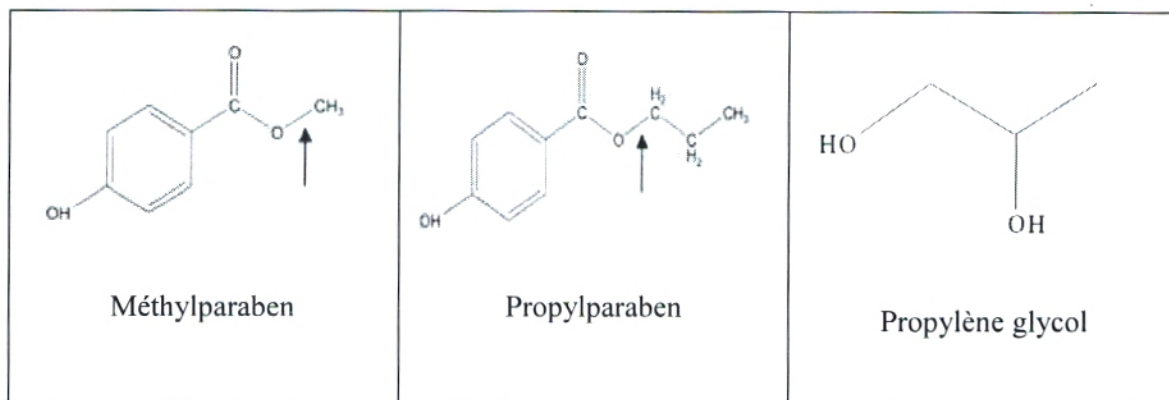
Germaben II<sup>®</sup> est facilement incorporé aux solutions, aux émulsions Huile/Eau (H/E) ou Eau/Huile (E/H). Il est compatible avec la plupart des ingrédients cosmétiques, y compris les agents tensio-actifs, les protéines, le collagène soluble, sur un grand choix de pH. Il est aussi employé dans les lotions, les crèmes, les onguents, les épierreuses, les toners, les shampoings et les conditionneurs de cheveux. Le Germaben II<sup>®</sup> est recommandé aux niveaux d'utilisation



de 0,3% à 1,0% dans les formulations finales. Il a montré son efficacité dans les émulsions à des concentrations allant de 0,5% à 1,0%. Dans les savons liquides et les shampoings, les niveaux de 0,3% à 0,5% se sont montrés efficaces [(C.I.C. 2009), (C.S. 2009)].

### **2.4. Toxicité :**

La toxicité de Germaben II<sup>®</sup> est acceptable à la moyenne prévue de ses éléments. Le propylène glycol est bas pour être toxique, mais il est connu pour être à l'origine d'irritation mineure de l'œil et de la peau. Le Méthylparaben et le Propylparaben, seuls ou en association, aux concentrations supérieures à 5% en propylène glycol sont connus pour leur réaction irritante grave sur l'œil et la peau (Tableau 07) [(I.S.P. 2008), (C.I.C. 2009)].



**Figure (06) :** Structures chimiques du Méthylparaben, Propylparaben et du Propylène glycol  
(DARBRE et HARVEY 2008) (SANTOS et coll. 2009)

**Tableau (05) :** Composition de Germaben II<sup>®</sup> [(I.S.P. 2008), (C.I.C. 2009)]

	Nom chimique	Nombre d'enregistrement	Pourcentage (%)
<b>Propylène glycol</b>	1,2-Propanediol	CAS:57-55-6	56%
<b>Diazolidinyl urée</b>	Urea, N-(1,3-bis (hydroxyméthyl)-2,5-dioxo-4-imidazolidinyl)-N,N'-bis (hydroxyméthyl)	CAS:78491-02-8	30%
<b>Méthylparaben</b>	<i>p</i> -hydroxybenzoate de méthyle	CAS:94-13-3	11%
<b>Propylparaben</b>	<i>p</i> -hydroxybenzoate de propyle	CAS:94-13-3	3%

Tableau (06): Propriétés physico-chimiques de Germaben II® [(I.S.P. 2008), (C.I.C. 2009)]

<b>État physique</b>	Liquide
<b>Couleur</b>	Claire à jaune pâle
<b>Odeur</b>	Caractéristiquement Douce
<b>Apparence</b>	liquide visqueux clair
<b>Point d'ébullition (°F)</b>	369
<b>Pression Vapeur</b>	0.22 mm Hg à 20°C
<b>Solubilité</b>	1.5g/100g à 25°C
<b>Solide total</b>	42,5-45,5%

Tableau (07) : Profil de toxicité de Germaben II® (C.I.C. 2009)

<b>Toxicité orale aiguë DL50 (rats)</b>	>2000 mg/kg
<b>Toxicité cutanée aiguë DL50 (lapins)</b>	>2000 mg/kg
<b>Irritation cutanée primaire (lapins)</b>	Irritant modéré de peau. (Cependant, une solution aqueuse de 1.0% de Germaben II® n'est pas un irritant de peau)
<b>Irritation de l'œil (lapins)</b>	Irritant aux yeux graves à la pleine force. (Cependant, une solution aqueuse de 1.0% de Germaben II® n'est pas une irritante aux yeux)



Tableau (08) : Propriétés physico-chimiques des parabens [(SONI et coll. 2005), (GEIS 2006b)]

		Méthylparaben	Propylparaben
Nombre d'enregistrement		CAS : 99-76-3	CAS : 94-13-3
Nom chimique		Méthyl de l'acide para-hydroxybenzoïque	Propyl de l'acide para-hydroxybenzoïque
Synonymes		Solbrol; Nipagin; Nipasol	
Classe chimique		ester de l'acide benzoïque	
Formule		C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
Poids moléculaire [g/mol]		152,16	180,21
Propriétés physico-chimiques	Aspect	Poudre cristalline blanche	
	Odeur	Inodore	
	Point de fusion	131°C	96-98°C
	Solubilité	Dans l'eau à 25 °C (g/100 ml): 0.25, méthyl et 0.04, propyl	
	pH optimale	3 à 9.5	
	compatibilité	Compatible avec les émulsions anioniques et cationiques; protéines; Incompatible avec le polyoxy-40-stearate, polyvinylpyrrolidone, methylcellulose	
	Point d'ébullition	270-280°C	-
	Stabilité	Stable	
	pKa	8,17	8,35

### 2.5.1.2. Données biologiques :

#### **a. Activité antimicrobienne :**

L'amélioration de l'activité antimicrobienne des Parabens est liée à la longueur de la chaîne alkyle portée par les groupements ester. Cette propriété a l'inconvénient de diminuer la solubilité de ces produits dans l'eau [(PATEL et ROMANOWSKI 1970), (LEE et coll. 2007)].

L'activité antimicrobienne des Parabens est plus élevée vis-à-vis des mycètes (moisissures ou levures) comparée aux bactéries. Aussi, les Parabens sont plus actifs contre les bactéries à gram positif qu'à gram négatif (les *Pseudomonas* peuvent utiliser les parabens comme source de carbone) [(MIZUBA et SHEIKH 1987), (MOORE et PAYNE 2004)]. La germination des spores est beaucoup plus sensible aux parabens que la croissance végétative des mycètes ou des bactéries [(RUSSELL 1983), (SONI et coll. 2005)].

#### **b. Mécanismes d'action :**

D'une façon générale, les auteurs rapportent que l'effet antimicrobien se traduit au niveau de transport membranaire et sur les processus métaboliques vitaux de la mitochondrie (SONI et coll. 2005).

Les parabens peuvent, irréversiblement, empêcher la glycolyse chez la bactérie cariogénique de la plaque dentaire : *Streptococcus mutans* GS-5. Ils peuvent également diminuer la capacité de cette bactérie d'abaisser le pH dans les suspensions cellulaires contenant le glucose excessif. Les auteurs ont rapporté que l'activité antimicrobienne du paraben pourrait être interprétée par des dommages irréversibles au niveau des principales enzymes du système phosphotransférase.

Dans une autre étude réalisée par FURR et RUSSELL, 1972, les auteurs ont rapporté que le Propylparaben induit la fuite des constituants intracellulaires à travers la paroi cellulaire de la bactérie *Serratia marcescens*. Les parabens ont un effet inhibiteur significatif sur le métabolisme respiratoire et la plupart des enzymes oxydantes.

#### **c. Résistance :**

Dans plusieurs études différentes, les auteurs attribuent la résistance à l'hydrolyse de l'ester des parabens en acide 4-hydroxybenzoïque par une estérase chez les souches : *Burkholderia cepacia* et *Enterobacter cloacae* (CHAPMAN 2003a). Récemment en 2006, DAVIN-REGLI et coll. ont rapporté qu'*Enterobacter gergoviae* montre une résistance intrinsèque aux parabens par un mécanisme d'efflux (DAVIN-REGLI et coll. 2006).



### 2.5.1.3. Utilisation :

Les parabens ont été employés avec succès comme des conservateurs dans les produits cosmétiques pour plus d'un demi-siècle, soit individuellement ou en association (le Méthylparaben et le Propylparaben qui sont les plus utilisés) (GORMAN et SCOTT 2004). Aux Etats-Unis, plus de 35% des produits cosmétiques enregistrés contiennent un ou plusieurs formes de parabens (LUNDOV et coll. 2009). Ces parabens sont employés dans presque tous les types de produits cosmétiques (plus de 13200 formulations en 1984) (SONI et coll. 2001) avec une concentration maximale de 0,4% ou une concentration maximale totale de 0,8% selon la CEE (WU et coll. 2008).

L'utilisation populaire des Parabens dans la conservation des produits cosmétiques résulte de leur basse toxicité, large spectre d'activité, inertie, acceptation de normalisation mondiale, biodégradabilité et coût bas. Un avantage additionnel est leur excellente stabilité chimique au pH (efficace entre pH de 4,5 à 7,5) et à la température. Ils sont fréquemment employés dans les émulsions, les crèmes et les lotions où il existe deux phases [(GIORDANO et coll. 1999), (GORMAN et SCOTT 2004)].

### 2.5.1.4. Toxicité:

L'usage des Parabens au cours des années a montré une sécurité de leur utilisation en tant que conservateurs stables, efficaces, et non irritants (ROSS 2006). Mais comme tous produits, les Parabens ne sont pas à l'abri de la toxicité. BONNEVIE, 1940, a décrit le premier cas de la dermatite de contact allergique aux Parabens (BORREMANS et coll. 2004).

En général, ils sont responsables d'eczémas de contact allergiques, principalement dans les médicaments topiques appliqués sur la peau lésée, et notamment autour d'un ulcère de jambe et moins souvent incriminés dans les cosmétiques. Il existe des réactions croisées entre les différents Parabens mais non entre les Parabens et les substances ayant un groupe «para-amino» (SASSEVILLE 2004).

Les rapports récents ont indiqué que l'exposition aux Parabens peut moduler ou perturber le système endocrinien (activité œstrogénique) et peut avoir ainsi des conséquences nocives sur la santé [(DARBRE et coll. 2004), (SONI et coll. 2005), (DARBRE et HARVEY 2008), (CHARLES et DARBRE 2009)]. À la concentration habituelle de 0,1 à 0,3% dans les produits cosmétiques, HANNUKSELLA et coll. ont détecté 0,3% de sujets positifs aux Parabens parmi 4097 patients testés, cependant, 3,6% des sujets porteurs d'ulcères de jambes ou de dermatites de stase réagissent au test aux parabens. MEYNADIER et coll., 1982, ont testé les Parabens à 15% et ont détecté 1,9 % de réactions positives chez 475 sujets eczémateux (DUCOMBS 2000).



### **2.5.2. Propylène glycol (PG):**

#### **2.5.2.1. Utilisation :**

Le propylène glycol est un solvant polaire non aqueux destiné à l'utilisation dans les applications de soin personnel (STEPHANIE et coll. 2005). Possédant la particularité d'attracteur d'eau, le propylène glycol est employé couramment dans les formulations cosmétiques (dans les lavages de corps, les gels douche, ou les savons pour empêcher la dessiccation du produit elle-même et la formation d'une couche sèche sur la surface) et pharmaceutiques comme solvant et vecteur, en particulier, pour des substances instables ou insolubles dans l'eau. Le propylène glycol est également employé comme inhibiteur de la fermentation et de la croissance des moisissures [(SAINI et coll. 1993), (LODÉN 2005), (LODÉN 2006), (ZOCCHI 2006)].

#### Effet sur la peau :

Le propylène glycol peut réversiblement augmenter la perméabilité de la peau (BOZENA et coll. 2005). Il est employé couramment comme amplificateur de pénétration dans les formulations dermatologiques topiques. Le propylène glycol imprègne aisément la peau et peut porter le principe actif avec lui (SANTOS et coll. 2009).

#### **2.5.2.2. Toxicité :**

Une étude réalisée entre 2000 et 2004, BOYVAT et coll. n'ont montré aucune sensibilité au propylène glycol pour 308 patients (BOYVAT et coll. 2005). Cependant, les données cliniques ont montré des réactions d'irritations cutanées et d'allergie au propylène glycol dans les sujets normaux à concentrations de 10% [(TRANCIK et MAIBACH 1982), (LODÉN 2006)].

### **3. Le bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA) :**

Le bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA) est un composé d'ammonium quaternaire (AQ) (NICOLETTI et coll. 1993). Ce dernier est un agent tensio-actif cationique amphotère employé couramment dans le contrôle de la croissance bactérienne des environnements cliniques et industriels [(McBAIN et coll. 2004), (BABU et coll. 2009)].

#### **3.1. Présentation chimique :**

##### **3.1.1. Identification chimique :**

Le tableau (09) montre l'identification chimique et les propriétés physico-chimiques du BCTA.

### 3.1.2. Aspects chimique :

Le BCTA est une molécule bipolaire qui possède deux pôles, un pôle contient une chaîne hydrocarbonique hydrophobe de 16 carbones et un autre pôle constitué par un groupe polaire chargé positivement (TENNSTEDT 2008). Le BCTA peut être aussi considéré comme un ammonium substitué organiquement, dans lequel l'atome d'azote a la valence de cinq: quatre sont des radicaux substitués ( $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  :  $\text{CH}_3$ ,  $R_4$  :  $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ ) et la cinquième est un petit anion :  $\text{Br}^-$  (Figure (07)) (MOORE et PAYNE 2004).

### 3.1.3. Propriétés physico-chimiques :

Le BCTA à des concentrations de 0,9 mM à 0,3 M forme de petites micelles sphériques de l'ordre de 2 à 6 nm. Au-delà de cette concentration, les micelles se développent et acquièrent la forme des fils. Au-dessus de 0,7 M, une phase cristalline liquide hexagonale se forme. Cette phase est composée de tiges très longues du BCTA (POKHRIYAL et coll. 2003).

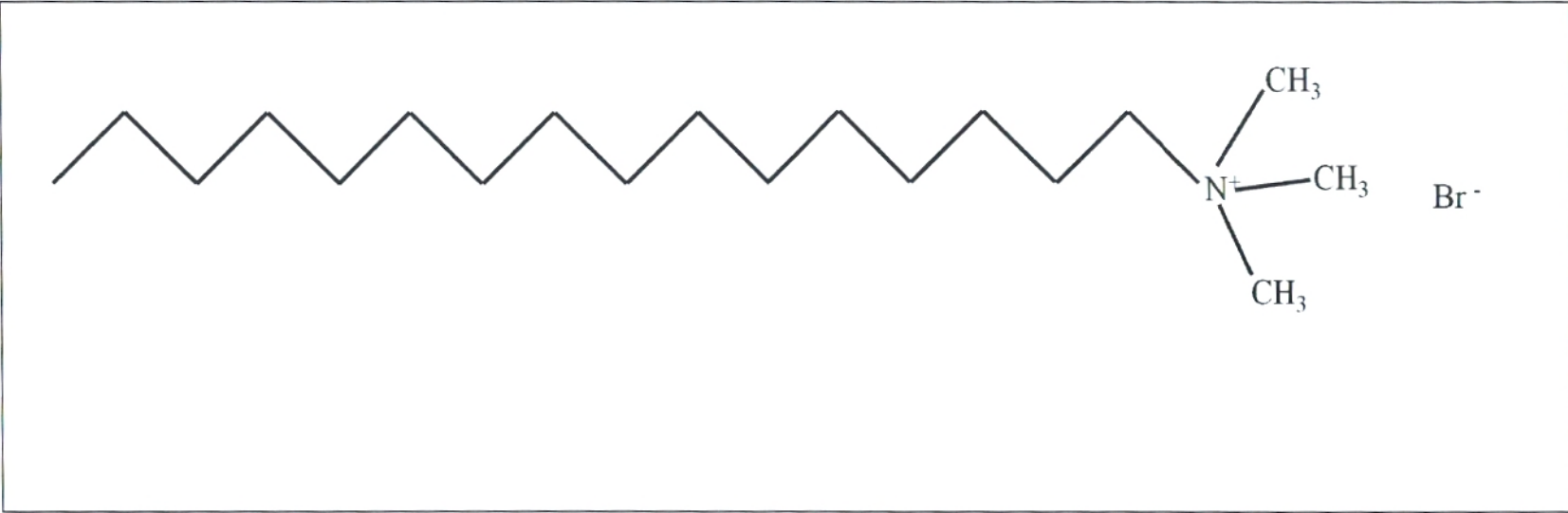


Figure (07) : La structure chimique de bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA) (MOORE et PAYNE 2004)



**Tableau (09) : l'identification chimique de BCTA [(APPLICHEM 2004), (D.H.I. 2008), (KEGLEY et coll. 2009)]**

<b>Nombre d'enregistrement</b>		CAS : 57-09-0 CE : 200-311-3
<b>Nom chimique</b>		Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
<b>Synonymes</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1-Hexadecanaminium, N,N,N-trimethyl-, bromide ,</li> <li>• C16-alkyltrimethylammonium bromide ,</li> <li>• CEE-DEE ,</li> <li>• Cetab ,</li> <li>• Cetrimide ,</li> <li>• Cetyl trimethyl ammonium bromide ,</li> <li>• Cetyltrimethylammoniumbromide ,</li> <li>• Hexadecyl trimethyl ammonium bromide</li> </ul>
<b>Classe chimique</b>		ammonium quaternaire
<b>Formule</b>		C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> BrN
<b>Poids moléculaire [g/mol]</b>		364.46
<b>Propriétés physico-chimiques</b>	<b>Aspect</b>	Une poudre cristalline blanche ou presque blanche
	<b>Odeur</b>	non disponible
	<b>Point de fusion</b>	230°C
	<b>Solubilité</b>	15 g/l dans l'eau (25 °C), et aisément soluble dans l'alcool.
	<b>pH optimale</b>	4-6 (100 g/l)
	<b>Point de décomposition</b>	>200°C
	<b>Point d'ébullition</b>	non disponible
	<b>Densité relative</b>	env. 0,5
	<b>Stabilité</b>	Stable aux températures normales
<b>Conditions/ matières à éviter</b>		Échauffement. Oxydants forts.

### 3.2. Données biologiques :

#### 3.2.1. Spectre d'activité:

Les ammoniums quaternaires (AQs) ont principalement une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à gram positif, alors que cette activité est nettement moins importante vis-à-vis des bactéries à gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* en particulier) [(NICOLETTI et coll. 1993), (TENNSTEDT 2008)]. Les AQs sont sporostatiques, ils empêchent le développement des cellules végétatives aux spores (RUSSELL 1983). De même, ils ont une activité trypanocidale mais ne sont pas mycobactéricides avec une action mycobactériostatique. Les AQs possèdent des propriétés antifongiques, plutôt fongistatiques que fongicides (MOORE et PAYNE 2004).

Les virus résistent plus au AQs que les bactéries et les mycètes, seuls les virus lipophiles qui montrent une sensibilité élevée vis-à-vis des AQs (tels que le virus de l'herpès et les adénovirus) (MAILLARD 2004b). Les AQs sont plus efficaces aux pH alcalins et neutres qu'en milieu acide (MOORE et PAYNE 2004).

Plusieurs auteurs ont montré que la souche *Pseudomonas sp.* peut utiliser certains composés d'ammoniums quaternaires comme source de carbone. WINTER, 1962, n'a trouvé aucune dégradation de BCTA à une concentration de 10 µg/ml par des espèces de *Pseudomonas*. Cependant, dans une autre étude, DESBORDES et JOURDAN, 1974, ont signalé que le BCTA a été assimilé par cette souche. (DEAN-RAYMOND et ALEXANDER 1977).

#### 3.2.2. Mécanismes d'action :

Les microorganismes exposés aux agents cationiques subissent une séquence d'opérations qui altèrent leurs fonctions vitales. Ce mécanisme proposé par SALTON (1968) se résume comme suit : (1) adsorption et pénétration de l'agent dans la paroi cellulaire; (2) réaction avec la membrane cytoplasmique (lipide ou protéine) suivie de sa déstabilisation; (3) fuite des composés intracellulaires de faibles poids moléculaire; (4) dénaturation des protéines et des acides nucléiques; et (5) autolyse provoquée par les enzymes autolytiques (McDONNELL et RUSSELL 1999).

De même, le BCTA présente l'avantage d'agir sur la membrane des microorganismes en dénaturant les protéines cytoplasmiques (CHAPMAN 2003a). L'ensemble de ces actions implique l'intervention des interactions ioniques entre le biocide chargé positivement et les biomolécules chargées négativement.



### Interactions avec les lipides :

Le BCTA exerce son activité antimicrobienne par déstabilisation de la bicouche lipidique de la membrane plasmique des bactéries ou des levures et la membrane externe des bacilles à gram négatif par l'association de la charge positive de l'azote quaternaire avec les principaux groupes polaires des phospholipides. La queue hydrophobe (chaîne alkylique) de BCTA agit plus tard sur le cœur hydrophobe de la membrane (les chaînes d'acide gras) par des interactions hydrophobes et déstabilisent les interactions entre les lipides et les protéines membranaires [(LAMBERT 2004a), (MAILLARD 2004a), (McBAIN et coll. 2004)].

Le BCTA montre une activité antivirale vis-à-vis des virus lipophiles, par attaque de l'enveloppe virale. Cette activité peut être expliquée par l'effet délétère contre les protéines virales incorporées dans l'enveloppe, ce qui induit une rupture de l'enveloppe et par conséquent l'inactivation du virus (MAILLARD 2004b).

### Interactions avec les constituants cytoplasmiques :

Une autre proposition est attribuée au BCTA qui est sa capacité à se lier avec les acides nucléiques et de ce fait, provoquer leur précipitation. Cette propriété est largement exploitée dans le domaine de la biologie moléculaire, particulièrement pour la précipitation de l'ADN [(LAMBERT 2004a), (YU et coll. 2008)].

### **3.2.3. Résistance :**

La résistance des microorganismes vis-à-vis des ammoniums quaternaires (AQs) est généralement attribuée à la modification de la teneur en acide gras des phospholipides membranaire ou à l'acquisition (ou la superexpression) des gènes de pompes d'efflux. Encore plus, la formation des biofilms permettent de renforcer cette résistance (GAZE et coll. 2005).

La résistance aux AQs a été rapportée chez *P.aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, staphylocoque coagulase-négative dans l'industrie alimentaire, *Burkholderia cepacia* et *Achromobacter xylosoxidans* (POOLE 2004).

### **3.3. Utilisation :**

D'une façon générale, les AQs sont recommandés dans l'hygiène alimentaire et dans l'hygiène des hôpitaux (désinfection des surfaces, des instruments d'opérations et des endoscopes, antisepsie de la peau saine -dans les champs opératoires ou pour le nettoyage des mains- et de la peau lésée, ainsi que des muqueuses). Ils sont fréquemment employés dans l'industrie de la transformation alimentaire [(MOORE et PAYNE 2004), (TENNSTEDT 2008)].



Par ailleurs, ils sont utilisés dans la désinfection de l'eau, dans le domaine agricole, la médecine vétérinaire, l'industrie des textiles, l'industrie du cuir, l'industrie plastique et dans l'usage ménager. Habituellement, les AQs sont disponibles sous forme concentrés, car les solutions diluées (aux concentrations d'emploi) peuvent facilement se contaminer avec le temps [(PRESTON 1983), (TENNSTEDT 2008), (CHATTERJEE et coll. 2009)].

### **3.4. Toxicité :**

Les effets secondaires cutanés par les ammoniums quaternaires peuvent être produits en provoquant une dermatite de contact d'irritation de la peau ou au niveau des muqueuses. (Tableau 10) (TENNSTEDT 2008).

**Tableau (11) : Solutions de conservateurs**

<b>Techniques et Méthodes</b>		<b>Concentrations finales (mg/ml)</b>
Technique de diffusion sur milieu solide		1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160
Méthodes des micro-dilutions (CMI, CMB et CMF)		à partir de 25
Méthode des courbes « <i>Time Kill Curve</i> » (CMF)	IU	3; 4; 10; 20; 30; 40
	DU	2; 3; 4; 5; 6
	BCTA	0,025; 0,05; 0,1; 1; 3; 5; 10
Evaluation de la cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes	IU, DU, GB	12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19
	BCTA	2,5; 0,62; 0,15; 0,03; 0,0097; 0,0024; 0,0006; 0,00015

L'inoculum est ajusté par numération des cellules viables sur cellule de Malassez pour avoir une concentration cellulaire de  $10^6$  à  $5 \times 10^6$  cellules/ml préparée dans l'eau physiologique (0,9% de NaCl).

Les boîtes de Pétri contenant de la gélose sont ensemencées aseptiquement par écouvillonnage. Ensuite elles sont séchées à proximité de la flamme.

Des disques de 6 mm de diamètre préparés à base de papier filtre (Whatman No.1), puis stérilisés par autoclavage sont imprégnés par la solution de nos conservateurs à tester puis placés sur la gélose préalablement ensemencée avec la levure à tester. Les disques sont préparés en extemporané [(ABIRAMI et VENUGOPAL 2005), (NEJJAH et coll. 2006)].

Les boîtes sont laissées pendant 15 minutes à la température ambiante avant d'être mises à incuber dans une étuve à 35°C pendant 20 à 24 heures. Après l'incubation, une zone ou un halo clair apparaît.

La lecture des résultats est faite par mesure des diamètres des zones d'inhibitions en (mm).

Les zones doivent être uniformément circulaires (ESPINEL-INGROFF et CANTÓN 2007).

Selon BARROS et coll., 2007, l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit :

- ✓ Diamètres inférieurs à 7 mm : *aucune activité antimicrobienne* (-)
- ✓ Diamètres de 7 à 9,9 mm : *activité antimicrobienne faible* (+)
- ✓ Diamètres de 10 à 11,9 mm : *activité antimicrobienne modeste* (++)
- ✓ Diamètres de 12 à 15 mm : *activité antimicrobienne élevée* (+++)
- ✓ Diamètres supérieurs à 15 mm : *activité antimicrobienne forte* (++++)

### **b. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par La méthode des micro-dilutions sur milieu liquide:**

Nous avons utilisé la méthode décrite en 2002 par *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A2 (CLSI). C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI et les CMF correspondantes (CLSI-M27-A2 2002).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des microorganismes.

#### • Principe :

Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des levures à produire une croissance visible dans les puits d'une microplaque à fond rond (à 96 puits) contenant le milieu de



Avant la lecture de la microplaque, nous avons ajouté 10µl d'un indicateur de croissance ou de viabilité des levures, il s'agit du tétrazolium (MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényltétrazolium bromide (Sigma). Le MTT est préparé en extemporané à une concentration de 0,4 mg/ml dans de l'eau physiologique stérile. La microplaque est réincubée à 35°C pendant 30 minutes. Les puits où une croissance a eu lieu présentent une couleur bleue violette.

Nous avons utilisé comme antifongique de référence l'amphotéricine B, qui nous donne une CMI de 0,5 µg/ml et nous confirme la sensibilité et la qualité de la souche testée (CLSI-M27-A2 2002).

### **c. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :**

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par CANTON et coll., 2003. Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI « *Clinical and Laboratory Standards Institute* » (ESPINEL-INGROFF et CANTÓN 2007).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMF.

Pour ce faire, 20 µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu SDA. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (MAJOROS et coll., 2005).

### **d. Détermination de la CMF par la méthode des courbes (time-kill curve) :**

Dans cette méthode, nous avons suivi la croissance du *C.albicans* en présence des conservateurs antimicrobiens au cours du temps. Différentes concentrations ont été utilisées pour chaque conservateur jusqu'à l'inhibition totale des levures dans la suspension.

Des cultures dans des Erlenmeyers de 250 ml ont étéensemencés aseptiquement par des levures provenant d'une préculture de 24 heures, ils ont été additionnés par le volume approprié de la concentration du conservateur, et ont été complétés par le Bouillon Sabouraud (BS) (pH 6,2 ± 0,2) jusqu'à un volume finale de 100 ml. Cette préculture est elle même obtenue dans les mêmes conditions par ensemencement des levures conservées sur le milieu Sabouraud gélosé à 4°C.

La densité des levures dans le volume finale (100 ml) est de  $2 \times 10^6$  UFC/ml. Les précultures et les cultures sont incubées dans un incubateur de paillasse (*Bioblock Scientific ROTATEST*) à 30°C sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minute. A chaque heure, on a mesuré la croissance par numération cellulaire sur cellule de Malassez ou Thomas à l'aide d'un microscope binoculaire. Les résultats sont représentés sous forme de courbes, le nombre des cellules par ml en fonction du temps.

### 2.2.2. Activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne des différents conservateurs a été évaluée par trois méthodes de référence :

- Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques);
- Méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ;
- Méthode pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB).

Pour s'assurer de la validité des résultats obtenus par nos techniques, nous avons utilisé la Gentamycine comme antibiotique de référence.

#### a. Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques):

Nous avons utilisé la méthode de diffusion des disques des antibiotiques sur gélose.

L'obtention de l'inoculum pour les bactéries s'effectue de la même manière que pour les levures. A partir d'une préculture jeune sur gélose nutritive, nous avons prélevé quelques colonies que nous avons resuspendues dans 5ml de bouillon nutritif. L'inoculum est ajusté à  $10^8$  cellules/ml (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm. La concentration cellulaire finale, fixée à  $10^6$  cellules/ml, est obtenue par dilution de l'inoculum initial à  $1/100^{\text{ème}}$  dans de l'eau physiologique (0,9% de NaCl).

Les boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller Hinton (pH de 7,2 à 7,4) sontensemencées aseptiquement par écouvillonnage. Ensuite elles sont séchées à proximité de la flamme.

Des disques de 6 mm de diamètre préparés à base de papier filtre (Whatman No.1), puis stérilisés par autoclavage sont imprégnés par la solution du conservateur à tester puis placés sur la gélose préalablementensemencée par les bactéries à tester. Les disques sont préparés en extemporané.

Les boîtes ainsi préparées sont préincubées pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être placées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.



La lecture se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition autour du disque (CLSI-M2-A9 2006).

### **b. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide:**

La technique utilisée a été décrite par CLSI en 2006. Elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne (CLSI-M7-A7 2006).

Cette méthode est réservée uniquement pour les bactéries aérobies non exigeantes.

Le Bouillon Muëller Hinton (MH) (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence. Deux autres milieux de culture ont été utilisés le Bouillon au Cœur Cerveau (BHIB) à pH 7,4 et le Bouillon Trypticase Soja (TSB) à pH 7,2.

A partir d'une préculture bactérienne en milieu solide (gélose nutritive) de 24 h à 37°C, nous avons prélevé quelques colonies à l'aide d'une anse de platine que nous avons resuspendues dans du bouillon nutritif. Elles sont ensuite placées dans une étuve à 37°C jusqu'à l'obtention d'une concentration cellulaire de  $10^8$  cellules/ml (une DO de 0.08 à 0.1,  $\lambda = 625\text{nm}$ ).

Une dilution au  $1/100^{\text{ème}}$  est effectuée pour avoir un inoculum final de  $10^6$  cellules/ml.

#### **- Préparation de la microplaque :**

Il s'agit de la même méthode que pour les levures, mais le milieu de culture utilisé est le Bouillon Muëller-Hinton (MH), le Bouillon au cœur cerveau (BHIB) et le Bouillon Trypticase Soja (TSB).

Après une incubation de 16 – 20 h à 37°C, nous avons ajouté l'indicateur de croissance ou de viabilité des bactéries qui est le p-iodonitrotétrazolium (INT). Ce colorant est présent sous forme de sel violet. Lorsqu'il est dissout dans l'eau, il devient incolore.

Cet indicateur coloré est préparé en extemporané à 0,4 mg/ml dans l'eau distillée. 40µl de la solution de INT sont rajoutés dans chaque puits. La microplaque est incubée à nouveau à 37°C pendant 30 minutes (QAIYUMI 2007).

Le tétrazolium sert comme un accepteur d'électrons, sous sa forme réduite il prend une couleur rouge. Lorsqu'il est ajouté aux puits où il ya une croissance microbienne avec libération d'électrons, il se transforme sous une forme réduite et le contenu du puits devient rouge. Quand les bactéries sont inhibées, le contenu des puits reste clair (AI-BAYATI, 2008).



La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par la recherche de la CMB.

Nous avons utilisé comme antibiotique de référence la Gentamycine, qui nous donne une CMI de :  $0,5 \times 10^{-3}$  mg/ml vis-à-vis d'*E.coli*,  $2 \times 10^{-3}$  mg/ml vis-à-vis de *P.aeruginosa*,  $0,25 \times 10^{-3}$  mg/ml vis-à-vis de *S.aureus*, qui nous confirme la sensibilité et la qualité de la souche testée.

### **c. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :**

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibiotique qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en substance conservatrice strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB.

Pour ce faire, un échantillon de 50µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (Prescott et coll., 1995).

### **2.3. Etude de la cytotoxicité des conservateurs vis-à-vis des érythrocytes :**

#### **2.3.1. Préparation de la suspension érythrocytaire :**

Du sang fraîchement prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec la solution de lavage de chlorure de magnésium  $MgCl_2$  (2mM) contenant 150mM de NaCl, puis resuspendu à nouveau dans le tampon phosphate salé de sodium (PBS) 100mM, pH 7,4 contenant aussi 150mM de NaCl.

#### **2.3.2. Evaluation de la cytotoxicité des conservateurs :**

Les globules rouges sont suspendus dans du tampon PBS pH 7,4 100mM, à raison de 4000 cellules/ml. La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant 120 minutes, dès l'addition de la solution du conservateur à des concentrations finales différentes.

Des prélèvements de 500µl à partir de la solution réactionnelle sont effectués à intervalles réguliers auxquels nous avons ajouté 2ml d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM,  $MgCl_2$  2mM).

Après centrifugation à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes, nous avons récupéré le surnageant dans lequel on dose l'hémoglobine par la densité optique à une longueur d'onde de 548nm.

# Troisième partie: Résultats et discussion



Notre objectif a été tracé, dans un premier temps, à l'évaluation de l'activité antifongique et antibactérienne de quatre conservateurs utilisés dans les produits cosmétiques, ce sont: l'Imidazolidinyl urée (IU), le Diazolidinyl urée (DU), le Germaben II<sup>®</sup> (GB) et le Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA).

Dans un deuxième temps, nous avons examiné la cytotoxicité de ces conservateurs sur les globules rouges humains.

Les concentrations finales de nos conservateurs ont été choisies selon leurs utilisations commerciales dans les produits cosmétiques.

Les tests de cette étude ont été réalisés de telle façon à ce que nos conservateurs soient solubilisés dans l'eau distillée stérile. Le choix de l'eau distillée est justifié par sa capacité à solubiliser plusieurs conservateurs (parmi eux nos conservateurs) et par son innocuité vis-à-vis des microorganismes.

Avant de procéder à l'évaluation de l'activité antimicrobienne des conservateurs, un contrôle de qualité vis-à-vis des souches de références utilisées a été effectué par l'antibiotique la Gentamicine et l'antifongique l'Amphotéricine B. Ce contrôle a pour avantage de vérifier la conformité de nos souches de référence et la validité des manipulations.

Nous avons utilisé plusieurs milieux de culture dans nos tests pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des quatre conservateurs (IU, DU, GB et BCTA), et ceci pour deux raisons principales : l'absence de techniques standards dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne des conservateurs vis-à-vis des microorganismes; et l'étude de l'influence des milieux de culture sur l'activité antimicrobienne des conservateurs dans ces tests.

### **1. Evaluation du pouvoir antimicrobien :**

#### **1.1. Activité antifongique :**

La souche de référence utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique des conservateurs Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA est *Candida albicans* ATCC 10231.

Dans cette partie, nous avons utilisé trois techniques qui sont :

- Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton supplémentée (méthode des disques), pour l'évaluation qualitative.

- Technique des micro-dilutions sur milieu liquide, pour une évaluation quantitative (détermination des CMI et CMF).
- Technique de *Time-Kill* sur milieu liquide, aussi pour une évaluation quantitative (détermination seulement de la CMF au cours du temps).

### **1.1.1. Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton supplémentée (méthode des disques) :**

Nous nous sommes intéressés dans ces tests à étudier l'activité antifongique vis-à-vis de *C.albicans* sur deux milieux de culture. Il s'agit du : Sabouraud Dextrose Agar (SDA) et Mueller Hinton Agar (MHA) supplémenté de 2% de glucose et de 0,5 µg/ml de bleu de méthylène.

#### **1.1.1.1. Milieu de culture SDA :**

Les résultats de l'activité antifongique des conservateurs Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA, vis-à-vis de *C.albicans* sur le milieu de culture SDA, sont présentés dans le tableau (12).

Les résultats obtenus ne montrent aucune activité antifongique de l'Imidazolidinyl urée, le Diazolidinyl urée et le Germaben II<sup>®</sup> vis-à-vis de *C.albicans*. En revanche, à 80 mg/ml et 160 mg/ml, une faible activité antifongique de Diazolidinyl urée et de Germaben II<sup>®</sup> est enregistrée.

De 1,25 mg/ml à 5 mg/ml de BCTA, nous ne remarquons aucune activité antifongique vis-à-vis de *C.albicans*. Cependant, de 10 mg/ml à 80 mg/ml, une faible activité a été révélée. A 160 mg/ml, le BCTA possède une activité antifongique élevée.

Tableau (12) : Zones d'inhibition (mm) de : Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA vis-à-vis de *C.albicans* sur SDA

Conservateurs Concentrations finales (mg/ml)	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben <sup>®</sup>	BCTA
1,25	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
2,5	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
5	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
10	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	07,0 (+)
20	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	07,0 (+)
40	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	08,0 (+)
80	06,0 (-)	07,0 (+)	08,0 (+)	09,0 (+)
160	06,0 (-)	09,0 (+)	09,0 (+)	12,0 (+ + +)

06,0 : aucune zone d'inhibition n'est observée



### 1.1.1.2. Milieu de culture MHA :

Les résultats de l'activité antifongique des quatre conservateurs (IU, DU, GB et BCTA) vis-à-vis de *C.albicans* sur le milieu de culture MHA, sont présentés dans le tableau (13).

Aucune activité antifongique n'a été enregistrée par l'Imidazolidinyl urée, le Diazolidinyl urée et Germaben II<sup>®</sup> vis-à-vis de *C.albicans*. A 80 mg/ml, le Diazolidinyl urée montre une faible activité antifongique. Cependant, le Diazolidinyl urée et le Germaben II<sup>®</sup> montrent une activité antifongique modeste à 160 mg/ml.

Aux concentrations 1,25 et 2,5 mg/ml de BCTA, aucune activité antifongique n'a été enregistrée. De 5 mg/ml à 20 mg/ml l'activité antifongique est faible, modeste à 40 mg/ml et élevée à 80 et 160 mg/ml.

### Conclusion :

Les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique des quatre conservateurs sur les deux milieux de cultures révèlent que :

- ✓ L'Imidazolidinyl urée ne possède aucune activité antifongique et ceci dans les deux milieux de culture SDA et MHA.
- ✓ A 160 mg/ml, le Diazolidinyl urée, le Germaben II<sup>®</sup> possèdent une activité antifongique faible sur le milieu SDA et modeste sur le milieu MHA.
- ✓ le BCTA possède une activité antifongique élevée à 160 mg/ml sur les deux milieux de culture SDA et MHA.
- ✓ Le BCTA montre une activité antifongique beaucoup plus élevée que le Diazolidinyl urée et le Germaben II<sup>®</sup> dans les deux milieux. Cette activité est traduite par des zones d'inhibition de l'ordre de 12 mm dans le milieu SDA et de 15 mm dans le milieu MHA. Ce qui nous fait dire que le milieu MHA représente un bon milieu de culture pour l'évaluation de l'activité des produits tels que nos conservateurs par la méthode des disques. Ce milieu favorise la formation d'un réseau poreux qui permet la diffusion libre des produits à tester.

**Tableau (13) :** Zones d'inhibition (mm) de : Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA vis-à-vis de *C.albicans* sur MHA

Conservateurs Concentrations finales (mg/ml)	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben <sup>®</sup>	BCTA
1,25	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
2,5	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
5	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	07,0 (+)
10	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	08,0 (+)
20	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	09,0 (+)
40	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	11,0 (+ +)
80	06,0 (-)	08,0 (+)	06,0 (-)	13,0 (+ + +)
160	06,0 (-)	10,0 (+ +)	10,0 (+ +)	15,0 (+ + +)

06,0 : aucune zone d'inhibition n'est observée



### 1.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF) par la méthode des microdilutions sur milieu liquide:

L'étude de la CMI et de la CMF de nos conservateurs vis-à-vis de *C.albicans* a été réalisée sur trois milieux de culture : RPMI-1640 « *Roswell Park Memorial Institut* », Bouillon Trypticase Soja (TSB) et le Bouillon Sabouraud (BS).

Le tableau (14) représente les CMI et les CMF des quatre conservateurs (Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA) vis-à-vis de *C.albicans* sur les trois milieux de culture: RPMI, TSB et BS.

#### 1.1.2.1. Milieu de culture RPMI :

L'Imidazolidinyl urée et le Germaben II<sup>®</sup> montrent dans le milieu RPMI une faible activité antifongique par rapport au Diazolidinyl urée vis-à-vis de *C.albicans*. L'Imidazolidinyl urée et le Germaben II<sup>®</sup> possèdent des CMI des CMF identiques (12,5 et 25 mg/ml). Cependant, les concentrations minimales inhibitrices et fongicides du Diazolidinyl urée sont de 0,097 mg/ml et 0,195 mg/ml respectivement. Nous pouvons dire que le milieu de culture (RPMI) est le plus adéquat pour les tests de Diazolidinyl urée vis-à-vis de *C.albiacans*.

Des travaux antérieures ont montré qu'une molécule d'Imidazolidinyl urée peut libérer deux molécules de formaldéhydes dans des conditions appropriés, cependant, une molécule de Diazolidinyl urée peut libérer quatre molécules de formaldéhyde dans des conditions appropriées (KARLBERG et coll. 1998).

Nos résultats montrent que l'activité du Diazolidinyl urée est plus élevée que celle de l'Imidazolidinyl urée d'un facteur de 130 fois environ vis-à-vis de *C.albicans*. Ces résultats nous laissent penser que l'activité de l'Imidazolidinyl urée et du Diazolidinyl urée est due aux formaldéhydes libérés ainsi qu'à leurs molécules de décomposition : le HU [(4-hydroxymethyl-2,5-dioxo-imidazolidin-4-yl)-urea] pour l'Imidazolidinyl urée et le BHU [1-(3,4-bis-hydroxymethyl-2,5-dioxo-imidazolidin-4-yl)-1,3-bis-hydroxymethyl-urea] pour le Diazolidinyl urée.

Nos résultats sur les CMI et les CMF du Germaben II<sup>®</sup> vis-à-vis de *Candida albicans* sont très élevés ceci pourrait s'expliquer par le caractère hydrophobe du Méthylparaben (MP) et du Propylparaben (PP) contenus dans les milieux de cultures (LLABRES et coll. 1985)..

Le BCTA montre dans le milieu RPMI des CMI et des CMF très basses (CMI = 0,076 µg/ml et CMF = 0,15) et de ce fait les activités antifongiques les plus élevées par rapport aux autres conservateurs.



Le BCTA exerce son activité antifongique par déstabilisation de la bicouche lipidique de la membrane plasmique des levures par l'association de la charge positive de l'azote quaternaire avec les principaux groupes polaires des phospholipides. La queue hydrophobe (chaîne alkylique) du BCTA agit plus tard sur le cœur hydrophobe de la membrane (les chaînes d'acide gras) par des interactions hydrophobes et déstabilisent les interactions entre les lipides et les protéines membranaires (McBAIN et coll. 2004).

### 1.1.2.2. Milieu de culture TSB :

La CMI et CMF de l'Imidazolidinyl urée et de Germaben II<sup>®</sup> vis-à-vis de *C.albicans* sur le milieu TSB sont identiques (12,5 mg/ml).

La CMI et la CMF du Diazolidinyl urée sont: 1,562 mg/ml et 3,125 mg/ml, respectivement. Ces concentrations sont 16 fois supérieures à celles obtenues sur le milieu de culture RPMI.

La CMI et CMF de BCTA sur le milieu TSB sont: 1,52 µg/ml et 3 µg/ml, respectivement, elles sont supérieures à celles obtenues sur le milieu RPMI.

### 1.1.2.3. Milieu de culture BS :

L'Imidazolidinyl urée et le Germaben II<sup>®</sup> montrent sur le milieu BS vis-à-vis de *C.albicans* une CMI et une CMF identiques et égales à 12,5 mg/ml, les CMI et la CMF du Diazolidinyl urée sont également identiques et égales à 3,125 mg/ml.

Les activités de l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée vis-à-vis de *C.albicans* sont inférieures par rapport à celles obtenues avec la méthode de dilution. Nous pensons que le formaldéhyde libéré par l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée diffuse mieux dans un milieu liquide que dans un milieu solide.

Nous remarquons également que l'activité du Germaben II<sup>®</sup> sur milieux solide vis-à-vis de *C.albicans* est relativement faible du fait que le Méthylparaben et le Propylparaben diffusent mal dans la gélose du milieu de culture.

La CMI de BCTA vis-à-vis de *C.albicans* sur le milieu BS est de l'ordre de 6,1 µg/ml. La CMF est dans ce cas identique à la CMI.

La CMI du BCTA vis-à-vis de *C.albicans* est de 1,52 µg/ml sur le milieu TSB. Ces résultats ne semblent pas en accord avec ceux obtenus par **NICOLETTI et coll.** (32 µg/ml sur TSB), ceci est dû à la quantité d'inoculum utilisé ( $10^6$  cellules/ml). En effet, la méthode que nous avons utilisée (CLSI) préconise l'utilisation de  $5 \times 10^2$  à  $2,5 \times 10^3$  cellules/ml.

Les activités de BCTA vis-à-vis de *C.albicans* sont inférieures par rapport à celles obtenues avec la méthode de dilution. Le BCTA forme des structures micellaires aux concentrations de 0,3 mg/ml à 110 mg/ml (POKHRIYAL et coll. 2003). En conséquence, ces structures peuvent influencer la diffusion de ce conservateur dans la gélose de milieu de culture solide, ce qui se traduit par la diminution de son activité.

### **Conclusion :**

A l'issue des résultats obtenus, et par comparaison des CMI des différents milieux de culture, nous pouvons dire que les trois milieux de culture n'influencent pas sur l'activité des conservateurs : Imidazolidinyl urée et Germaben II<sup>®</sup>, vis-à-vis de *C.albicans*.

En revanche, nous pouvons conclure que le milieu de culture RPMI représente le milieu adéquat pour les tests d'évaluation de l'activité antifongique des deux conservateurs : Diazolidinyl urée et BCTA, vis-à-vis de *C.albicans*.

Pour déterminer la nature fongicide ou fongistatique de nos conservateurs, on calcule le rapport CMB/CMI (FAUCHER et AVRIL, 2002). Si ce rapport est inférieur ou égal à 2, l'agent conservateur est considéré comme fongicide; si ce rapport est supérieur à 2, l'agent conservateur est considéré comme fongistatique.

Le tableau (15) comprend les rapports CMF/CMI des quatre conservateurs : Imidazolidinyl urée (IU), Diazolidinyl urée (DU), Germaben II<sup>®</sup> (GB) et Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA) vis-à-vis de *C.albicans*, Nous constatons que ces conservateurs possèdent une activité fongicide vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231 et ceci sur les trois milieux de culture : RMPI, TSB et BS.



**Tableau (14) :** Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et fongicides (CMF) : Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA vis-à-vis de la souche *C.albicans* sur les trois milieux de culture : RPMI, TSB et BS.

Milieux de culture		RPMI	TSB	BS
		Conservateurs		
Imidazolidinyl urée et Germaben II <sup>®</sup> (mg/ml)	CMI	12,5	12,5	12,5
	CMF	25	12,5	12,5
Diazolidinyl urée (mg/ml)	CMI	0,097	1,562	3,125
	CMF	0,195	3,125	3,125
BCTA (µg/ml)	CMI	0,076	1,52	6,1
	CMF	0,15	3	6,1

RPMI : « RPMI-1640» Roswell Park Memorial Institut; TSB : Bouillon Trypticase Soja; BS : Bouillon Sabouraud.

**Tableau (15) :** Rapports CMF/CMI vis-à-vis de *C.albicans*

Milieux de culture conservateurs	RPMI	TSB	BS
	Imidazolidinyl urée	2	1
Diazolidinyl urée	2	2	1
Germaben II <sup>®</sup>	2	1	1
BCTA	2	2	1



### 1.1.3. Détermination de la CMF par la méthode des courbes (*Time-kill curve*) :

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à déterminer les CMF des trois conservateurs : Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée et BCTA vis-à-vis de *C.albicans* par la méthode de *Time Kill curve*.

Nous n'avons utilisé le Germaben II<sup>®</sup> dans cette étude puisque c'est une substance huileuse et sa distribution dans les milieux liquides est hétérogène, par conséquent, il montre une activité instable au cours de l'expérimentation.

Les figures (08), (09) et (10) représentent l'influence des trois conservateurs (Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée et BCTA) sur la croissance de *C.albicans*. Nous remarquons sur la courbe témoin (courbe (a)), qui correspond à la croissance cellulaire sur Bouillon Sabouraud, qu'après incorporation de l'inoculum au temps zéro à la concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/ml, les levures passent par une phase de latence d'environ deux heures caractérisée par un nombre constant des cellules de départ.

Ensuite, les cellules entrent en phase de croissance exponentielle par six générations successives, pour atteindre un maximum de cellules au bout de 8 heures d'incubation. Ce taux reste inchangé durant une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue (130 tours/min). Le temps de génération est donc égal à une heure.

En absence de conservateurs et après une heure d'incubation à 30°C sous agitation continue (130 tours/min), la taille des cellules grandit avec apparition de bourgeons. Au bout de 2 heures d'incubation toutes les cellules bourgeonnent (nous avons également noté la présence de quelques agrégats cellulaires). Il est à noter que pendant les 2 premières heures, le nombre de levures déterminé par numération cellulaire, est constant et égal à  $2 \times 10^6$  cellules/ml.

Trois heures après, les observations microscopiques montrent l'apparition de cellules filles juste aux côtés des cellules mères. Ceci explique l'augmentation du nombre de cellules par ml. Le nombre de cellules de la levure augmente donc d'une manière exponentielle jusqu'à 8 heures d'incubation. Cet état reste stationnaire, et les cellules ont la même apparence que les cellules de départ jusqu'à 10 heures d'incubation.

Les courbes (b), (c), (d) et (e) de la figure (08) représentent l'effet de l'Imidazolidinyl urée à différentes concentrations sur la croissance de *C.albicans*. Nous constatons qu'après une phase de latence de 3 à 6 heures, le degré d'inhibition passe de 18,4% à 3 mg/ml à 81,17% à 20 mg/ml, par rapport à la culture témoin au bout de 10 à 12 heures d'incubation. A 30 et 40 mg/ml, le Diazolidinyl urée exerce une inhibition totale de la croissance.

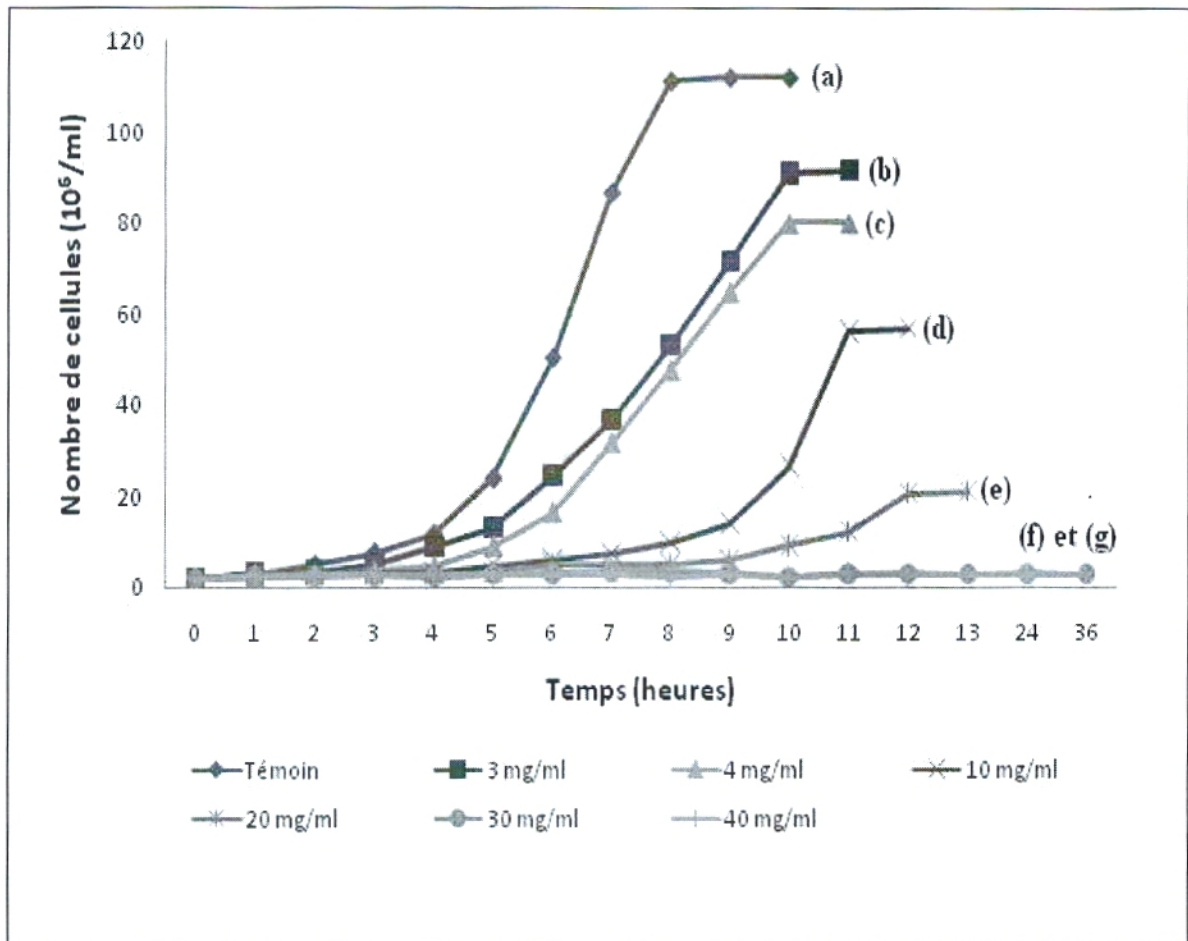
Les courbes (b), (c) et (d) de la figure (09), représentent l'effet du Diazolidinyl urée aux concentrations de 2, 3 et 4 mg/ml sur la croissance de *C.albicans*. Nous remarquons que le degré d'inhibition passe de 26,34% à 2 mg/ml à 49,38% à 4 mg/ml, par rapport à la culture témoin et cela au bout de 10 à 24 heures d'incubation. Le Diazolidinyl urée aux concentrations de 5 mg/ml et 6 mg/ml, exerce une inhibition totale de la croissance des levures durant les 48 heures.

Les courbes de la figure (10) montrent une inhibition totale de la croissance de *C.albicans* par le BCTA à des concentrations de 0,0025 à 10 mg/ml.

### **Conclusion :**

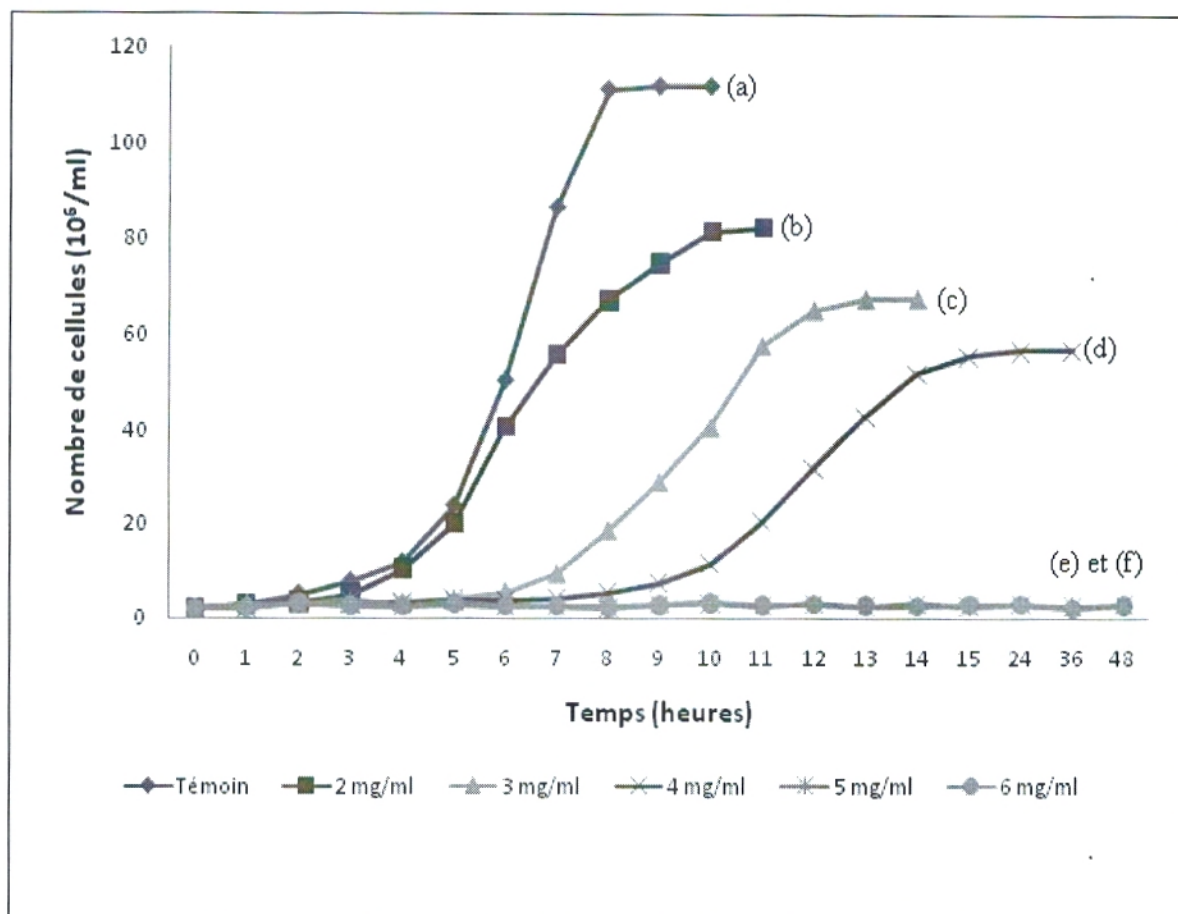
Nous pouvons dire que :

- ✓ L'Imidazolidinyl urée possède une activité fongicide à la concentration de 30 mg/ml sur milieu BS.
- ✓ Le Diazolidinyl urée possède une activité fongicide à la concentration de 5 mg/ml sur milieu BS.
- ✓ Le BCTA est un agent fongicide à la concentration de 0,025 mg/ml sur milieu BS.
- ✓ Nous constatons que les CMF obtenues par la méthode de « *Time Kill Curves* » et celles obtenues par la méthode des micro-dilutions de CLSI, sont différentes. Nous pouvons donc dire que :
  - Pour la méthode de *Time Kill Curves*, l'agitation continue accélère le métabolisme cellulaire de *Candida albicans* en provoquant des fermentations qui diminuent le pH du milieu, et par conséquent, influe sur l'activité antifongique des conservateurs.
  - Les inocula pour les deux méthodes sont différents. Ils sont de  $2 \times 10^6$  cellules/ml pour la méthode de « *Time Kill Curves* » et de  $5 \times 10^2$  à  $2,5 \times 10^3$  cellules/ml pour la méthode des micro-dilutions, et donc les CMF de chaque méthode dépendent de la concentration de l'inoculum.

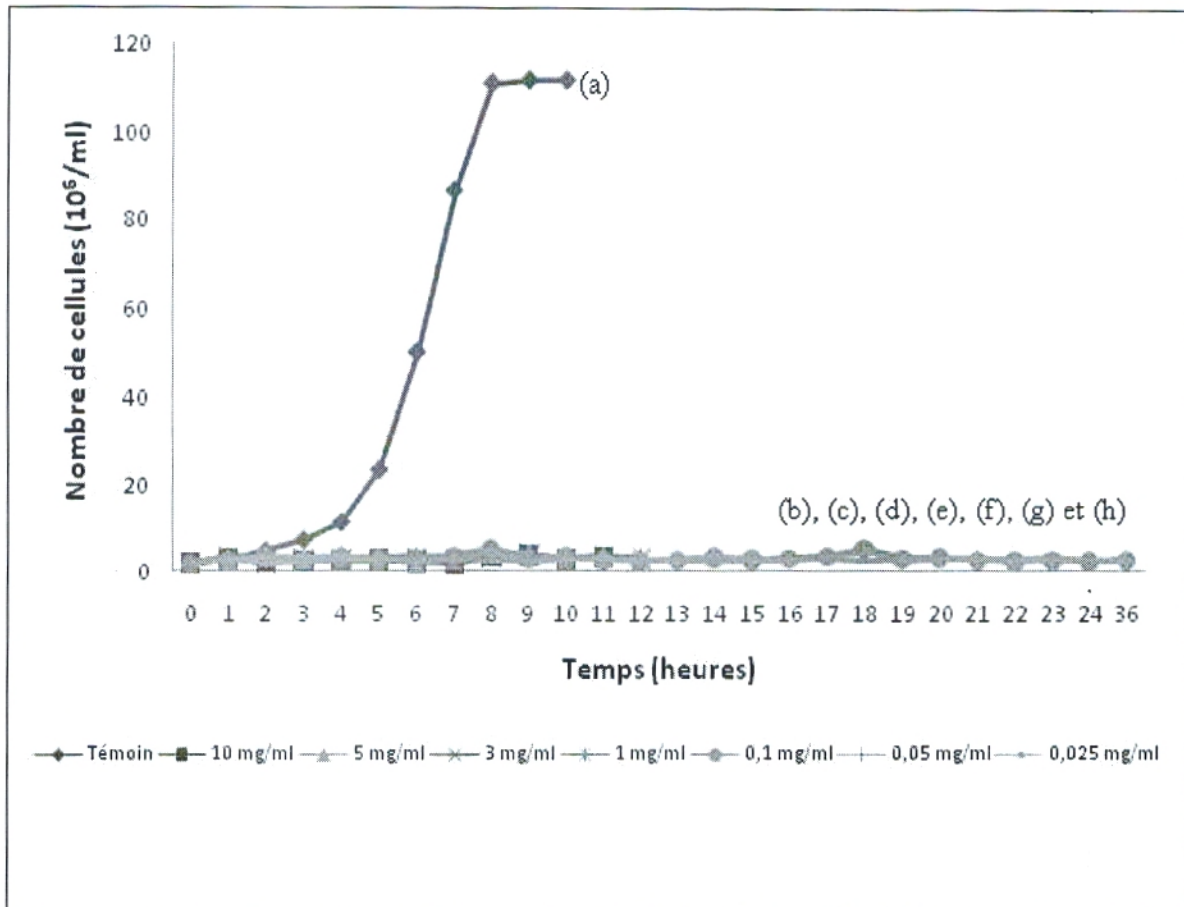


**Figure (08) :** Croissance des levures de *C.albicans* à 30°C sur milieu BS en présence de concentrations croissantes de l'Imidazolidinyl urée.





**Figure (09) :** Croissance des levures de *C. albicans* à 30°C sur milieu BS en présence de concentrations croissantes du Diazolidinyl urée.



**Figure (10) :** Croissance des levures de *C.albicans* à 30°C sur milieu BS en présence de concentrations croissantes de BCTA.

### 1.2. Activité antibactérienne :

Le choix des souches est basé sur les recommandations connues pour les tests d'efficacité des conservateurs antimicrobiens dans les produits cosmétiques. Parmi elles, la *Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CFTA)*, la *U.S. Pharmacopeia (USP)*, la *Japanese Pharmacopoeia (JP)*, la *Pharmacopée Européenne (PE)* et *Scientific Committee on Cosmetics Products and Non Food Products intended for consumers (SCCNFP)* [(SUTTON 2006) (DELARRAS 2007)].

Ces souches représentent les principaux contaminants des produits cosmétiques. Ainsi, deux bactéries gram négatifs : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, une souche à gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ont été choisies au cours de cette étude.

Nous avons utilisé deux techniques pour étudier l'activité antibactérienne des conservateurs, Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA ; il s'agit de la technique :

- de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques), pour l'évaluation qualitative.
- des micro-dilutions sur milieu liquide, pour l'évaluation quantitative (détermination des CMI et CMB).

#### 1.2.1. Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques):

Les concentrations des conservateurs utilisées dans les disques varient de 1,25 à 160 mg/ml.

Les résultats relatifs à l'activité antibactérienne des quatre conservateurs vis-à-vis d'*E.coli* par la méthode des disques sont présentés dans le tableau (16).

Jusqu'à 5mg/ml, l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée ne montrent aucune activité vis-à-vis d'*E.coli*. En revanche une activité élevée est enregistrée à 40 mg/ml ainsi qu'une forte activité à 80 et 160 mg/ml.

Le Germaben II<sup>®</sup> et le BCTA ne montrent aucune activité aux concentrations allant de 1,25 à 20 mg/ml. A 160 mg/ml, le Germaben II<sup>®</sup> montre une activité élevée et le BCTA montre une faible activité, vis-à-vis d'*E.coli*.

Le BCTA est le conservateur le moins actif vis-à-vis d'*E.coli* par rapport aux autres conservateurs (IU, DU et GB).



**Tableau (16) :** Zones d'inhibition (mm) de : l'Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II® et BCTA vis-à-vis d'*E.coli* sur MHA

<b>Conservateurs</b> <b>Concentrations finales (mg/ml)</b>	<b>Imidazolidinyl urée</b>	<b>Diazolidinyl urée</b>	<b>Germaben II®</b>	<b>BCTA</b>
<b>1,25</b>	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>2,5</b>	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>5</b>	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>10</b>	<b>09,0 (+)</b>	<b>08,0 (+)</b>	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>20</b>	<b>12,0 (+++)</b>	<b>11,0 (++)</b>	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>40</b>	<b>14,0 (+++)</b>	<b>14,0 (+++)</b>	<b>09,5 (+)</b>	<b>08,0 (+)</b>
<b>80</b>	<b>18,5 (++++)</b>	<b>21,0 (++++)</b>	<b>11,0 (++)</b>	<b>09,0 (+)</b>
<b>160</b>	<b>20,0 (++++)</b>	<b>22,0 (++++)</b>	<b>13,5 (+++)</b>	<b>09,0 (+)</b>

06,0 : aucune zone d'inhibition n'est observée

Le tableau (17) présente l'activité antibactérienne des quatre conservateurs : Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA vis-à-vis de *P.aeruginosa* par la méthode des disques.

Aucune activité antibactérienne n'est observée aux concentrations de l'Imidazolidinyl urée allant de 1,25 à 10 mg/ml. Cependant, à 160 mg/ml, l'Imidazolidinyl urée montre une activité élevée vis-à-vis de *P.aeruginosa*.

Dans l'intervalle de 1,25 à 5 mg/ml, le Diazolidinyl urée ne montre aucune activité antibactérienne vis-à-vis de *P.aeruginosa*. Toutefois, ce conservateur révèle une forte activité à 160 mg/ml.

L'activité antibactérienne pour le Germaben II<sup>®</sup> vis-à-vis de *P.aeruginosa* n'est observée qu'à partir de 80 mg/ml. Cette activité est élevée à 160 mg/ml.

Le BCTA ne possède aucune activité antibactérienne vis-à-vis de *P.aeruginosa* aux concentrations inférieures à 20 mg/ml. Au-delà de cette concentration, ce conservateur montre une faible activité antibactérienne à 160 mg/ml.

**Tableau (17) :** Zones d'inhibition (mm) de : l'Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II® et BCTA vis-à-vis de *P.aeruginosa* sur MHA

<b>Conservateurs</b> <b>Concentrations finales (mg/ml)</b>	<b>Imidazolidinyl urée</b>	<b>Diazolidinyl urée</b>	<b>GermabenII®</b>	<b>BCTA</b>
<b>1,25</b>	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>2,5</b>	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>5</b>	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>10</b>	06,0 (-)	<b>10,0 (++)</b>	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>20</b>	<b>09,0 (+)</b>	<b>11,0 (++)</b>	06,0 (-)	06,0 (-)
<b>40</b>	<b>10,0 (++)</b>	<b>13,0 (+++)</b>	06,0 (-)	<b>07,0 (+)</b>
<b>80</b>	<b>12,0 (+++)</b>	<b>15,0 (+++)</b>	<b>10,0 (++)</b>	<b>08,0 (+)</b>
<b>160</b>	<b>14,0 (+++)</b>	<b>18,0 (+++)</b>	<b>12,0 (+++)</b>	<b>09,0 (+)</b>

06,0 : aucune zone d'inhibition n'est observée



Les résultats relatifs à l'activité antibactérienne des quatre conservateurs vis-à-vis de *S.aureus* sont présentés dans le tableau (18).

Les deux conservateurs l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée ne montrent aucune activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus* aux concentrations de : 1,25, 2,5 et 5 mg/ml. Cependant, ces deux conservateurs s'avèrent de forte activité aux concentrations supérieures à 20 mg/ml.

Pour des concentrations inférieures à 20 mg/ml, le Germaben II<sup>®</sup> ne montre aucune activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus*. A 160 mg/ml, ce conservateur présente une forte activité.

Contrairement aux autres conservateurs, le BCTA, est le seul qui possède une activité à 1,25 mg/ml vis-à-vis de *S.aureus*. Cette activité est élevée à 160 mg/ml.

Selon **MOORE et PAYNE, 2004**, l'Imidazolidinyl urée à 10 mg/ml par disque, montre une zone d'inhibition de l'ordre de 7,6 mm vis-à-vis de *S. aureus (MRSA)* (**MOORE et PAYNE 2004**), alors que nous avons obtenus un diamètre de l'ordre de 11mm. Ces résultats sont probables étant donné que *S. aureus (MRSA)* est une souche connue pour sa résistance.

### **Conclusion :**

- ✓ L'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée présentent une activité antibactérienne forte et identique vis-à-vis des deux souches *E.coli* et *S.aureus* à 160 mg/ml. A cette concentration, l'Imidazolidinyl urée montre une activité élevée et le Diazolidinyl urée montre une forte activité vis-à-vis de *P.aeruginosa*.
- ✓ Le Germaben II<sup>®</sup> a une activité élevée à 160 mg/ml vis-à-vis des deux souches à gram négatif : *E.coli* et *P.aeruginosa* et une forte activité vis-à-vis de *S.aureus*.
- ✓ Le BCTA présente une faible activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches à gram négatif : *E.coli* et *P.aeruginosa* et une activité élevée vis-à-vis de *S.aureus* à la concentration de 160 mg/ml.

**Tableau (18) :** Zones d'inhibition (mm) de :l'Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA vis-à-vis de *S.aureus* sur MHA

<b>Conservateurs</b> <b>Concentrations finales (mg/ml)</b>	<b>Imidazolidinyl urée</b>	<b>Diazolidinyl urée</b>	<b>Germaben II<sup>®</sup></b>	<b>BCTA</b>
<b>1,25</b>	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	<b>08,0 (+)</b>
<b>2,5</b>	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	<b>08,5 (+)</b>
<b>5</b>	06,0 (-)	06,0 (-)	06,0 (-)	<b>09,0 (+)</b>
<b>10</b>	<b>11,0 (++)</b>	<b>09,0 (+)</b>	06,0 (-)	<b>10,0 (++)</b>
<b>20</b>	<b>15,0 (+++)</b>	<b>12,0 (+++)</b>	06,0 (-)	<b>10,5 (++)</b>
<b>40</b>	<b>17,0 (++++)</b>	<b>19,0 (++++)</b>	<b>09,0 (+)</b>	<b>11,0 (++)</b>
<b>80</b>	<b>24,0 (++++)</b>	<b>28,0 (++++)</b>	<b>12,0 (+++)</b>	<b>12,0 (+++)</b>
<b>160</b>	<b>27,0 (++++)</b>	<b>30,0 (++++)</b>	<b>19,0 (++++)</b>	<b>13,0 (+++)</b>

06,0 : aucune zone d'inhibition n'est observée



### 1.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide :

La détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB) des conservateurs vis-à-vis des trois souches bactériennes est réalisée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide.

Nous avons utilisé trois milieux de culture : Mueller Hinton (MH), cœur cerveau (BHIB) et Trypticase Soja (TSB). Le milieu de culture MH est le milieu de référence pour la détermination des CMI des agents antimicrobiens (particulièrement les antibiotiques) vis-à-vis des bactéries. Le milieu BHIB est le milieu alternatif du milieu MH dans les mêmes tests. Le milieu de culture TSB est employé largement dans plusieurs études d'évaluation de l'activité de différents agents conservateurs vis-à-vis des bactéries et même des mycètes.

#### 1.2.2.1. *Escherichia coli* :

Le tableau (19) montre les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des quatre conservateurs vis-à-vis d'*E.coli*.

Les résultats montrent que les CMI de l'Imidazolidinyl urée sont identiques à celles des CMB vis-à-vis d'*E.coli*, dans les trois milieux de culture utilisés. Elles sont de 1,562 mg/ml. De ce fait, nous pouvons dire que ces trois milieux de culture n'ont aucune influence sur l'activité antibactérienne de l'Imidazolidinyl urée vis-à-vis d'*E.coli*.

Le Diazolidinyl urée révèle la même valeur de la CMI (0,781 mg/ml) vis-à-vis d'*E.coli* sur deux milieux de cultures différents MH et TSB, alors que les CMB (1,5625 mg/ml) sont identiques sur les trois milieux de culture.

A partir de nos résultats, nous avons constaté que l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée possèdent une activité bactéricide similaire vis-à-vis d'*E.coli*. Ainsi, nous pouvons conclure que l'activité antibactérienne de ces deux conservateurs vis-à-vis de cette souche est fortement liée à la libération de formaldéhyde.

Le Germaben II<sup>®</sup> a la même CMI (3,125 mg/ml) sur les trois milieux de culture utilisés. Ces résultats montrent que les trois milieux de cultures n'ont aucune influence sur l'activité antibactérienne du Germaben II<sup>®</sup> vis-à-vis d'*E.coli*. De plus, la CMB obtenue sur le milieu BHIB (3,125 mg/ml) est égale à celle obtenue sur le milieu TSB, alors que la CMB sur le milieu MH est supérieure à cette valeur (6,25 mg/ml).

Le BCTA montre une CMI sur le milieu MH de 1,5 µg/ml et de 12,2 µg/ml sur les deux milieux de culture BHIB et TSB vis-à-vis d'*E.coli*.



D'après les résultats obtenus par **NICOLETTI et coll., 1993**, la CMI de BCTA vis-à-vis d'*E.coli* sur le milieu TSB est de l'ordre de 16 µg/ml. Cette valeur est en accord avec la CMI que nous avons obtenue sur le même milieu de culture (12,2 µg/ml).

**Tableau (19) :** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de : l'Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA vis-à-vis de la souche *E.coli* sur les trois milieux de culture : MH, BHIB et TSB.

Milieux de culture		MH	BHIB	TSB
		Conservateurs		
Imidazolidinyl urée (mg/ml)	CMI	1,5625	1,5625	1,5625
	CMB	1,5625	1,5625	1,5625
Diazolidinyl urée (mg/ml)	CMI	0,781	1,5625	0,781
	CMB	1,5625	1,5625	1,5625
Germaben II <sup>®</sup> (mg/ml)	CMI	3,125	3,125	3,125
	CMB	6,25	3,125	3,125
BCTA (µg/ml)	CMI	1,5	12,2	12,2
	CMB	3	12,2	12,2

MH : Bouillon Muëller Hinton; BHIB : Bouillon au cœur cerveau; TSB : Bouillon Trypticase Soja.

### 1.2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* :

Les résultats des CMI et des CMB des quatre conservateurs vis-à-vis de *P.aeruginosa* sont présentés dans le tableau (20).

La CMI de l'Imidazolidinyl urée est la même (1,5625 mg/ml) sur les deux milieux de culture: BHIB et TSB vis-à-vis de *P.aeruginosa*. Cependant, sur le milieu MH la CMI est inférieure (0,39 mg/ml) à celle obtenue sur les deux milieux BHIB et TSB.

Les CMB de l'Imidazolidinyl urée vis-à-vis de *P.aeruginosa* varient selon le milieu de culture utilisé, elles sont comme suit: 0,39 mg/ml sur le milieu MH, 3,125 mg/ml sur le milieu BHIB et 1,5625 mg/ml sur le milieu TSB.

**BOWMAN et LINDSTROM, 1985**, ont montré dans que l'Imidazolidinyl urée exerce un effet bactéricide vis-à-vis de *P.aeruginosa* (ATCC 9027) à la concentration de 2,5 mg/ml. Ceci est en accord avec notre résultat où la CMI de l'Imidazolidinyl urée est de l'ordre de 3,125 mg/ml vis-à-vis de *P.aeruginosa* (ATCC 27853).

Les valeurs des CMI et des CMB de Diazolidinyl urée vis-à-vis de *P.aeruginosa* sont identiques (0,781 mg/ml) sur les trois milieux de culture.

Plusieurs auteurs ont montré que le Diazolidinyl urée possède une bonne activité vis-à-vis des souches de *Pseudomonas* que l'Imidazolidinyl urée [(KANTOR et coll. 1985), (STEPHENS et coll. 1987)]. Nos résultats ont confirmé cette activité seulement sur les deux milieux de culture BHIB et TSB.

Le Germaben II® montre des CMI identiques (3,125 mg/ml) sur les trois milieux de culture utilisés. Néanmoins, la CMB est supérieure sur le milieu TSB (6,25 mg/ml) à celle obtenue sur les autres milieux de culture MH et BHIB (3,125 mg/ml).

Sur milieu MH, la CMI du BCTA est égale à sa CMB vis-à-vis de *P.aeruginosa*. (0,39 mg/ml). Cependant, les résultats de la CMI et de la CMB du BCTA sur le milieu BHIB sont de 0,781 et 1,5625 mg/ml.

Sur milieu TSB, la CMI du BCTA vis-à-vis de *P.aeruginosa* est supérieure d'un facteur de 8 par rapport à celle obtenue sur milieu BHIB et d'un facteur de 16 par rapport à celle obtenue sur le milieu MH. De même, la CMB sur le milieu TSB (12,5 mg/ml) est très élevée par rapport à celles des milieux MH et BHIB (0.39 et 1.56 mg/ml).

La souche *P.aeruginosa* est plus résistante vis-à-vis du BCTA. Cette résistance est due principalement à la couche extérieure de cette bactérie qui est fortement réticulée par les LPS, et qui empêche la pénétration du BCTA à l'intérieur de la cellule (STICKLER 2004). **Par ailleurs** plusieurs auteurs ont montré que la souche *Pseudomonas sp.* peut utiliser certains composés d'ammonium quaternaire comme source de carbone (DEAN-RAYMOND et ALEXANDER 1977).



En fait, nous pensons que la faible activité du BCTA vis-à-vis de *P.aeruginosa* sur les milieux BHIB et TSB par rapport au milieu MH est due à la présence de NaCl dans ces deux milieux. Nous pensons que la quantité de 5 mg/ml de NaCl dans les deux milieux de culture est à l'origine de la modification des propriétés physico-chimique de BCTA (transition de la forme sphérique à la forme micellaire) et qui a pour conséquence la perte de la forme active de ce conservateur (DWIVEDI et coll. 2006).

Concernant le milieu TSB, nous pouvons dire que ce milieu favorise particulièrement la croissance de *P.aeruginosa* par sa composition riche en tryptophane et de carbohydrates, qui sont utilisés comme source de carbone. De plus nous pensons aussi que la souche *P.aeruginosa* a utilisé, dans des conditions défavorables, le BCTA comme source de carbone. Ceci a été démontré dans plusieurs études, où la souche *P.aeruginosa* a utilisé les ammoniums quaternaires comme source de carbone ou de nitrogène dans des conditions défavorables à sa croissance (TAKENAKA et coll. 2007).

Les résultats rapportés par NICOLETTI et coll., 1993, montrent que la CMI de BCTA vis-à-vis de *P.aeruginosa* est supérieure à 1,024 mg/ml, ce qui est en accord avec nos résultats obtenue sur le milieu TSB.

**Tableau (20) :** Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricides (CMB) de : l'Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA vis-à-vis de la souche *P.aeruginosa* sur les trois milieux de culture : MH, BHIB et TSB.

Milieux de culture		MH	BHIB	TSB
		Conservateurs		
Imidazolidinyl urée (mg/ml)	CMI	0,39	1,5625	1,5625
	CMB	0,39	3,125	1,5625
Diazolidinyl urée (mg/ml)	CMI	0,781	0,781	0,781
	CMB	0,781	0,781	0,781
Germaben II <sup>®</sup> (mg/ml)	CMI	3,125	3,125	3,125
	CMB	3,125	3,125	6,25
BCTA (mg/ml)	CMI	0,39	0,781	6,25
	CMB	0,39	1,5625	12,5

MH : Bouillon Muëller Hinton; BHIB : Bouillon au cœur cerveau; TSB : Bouillon Trypticase Soja.

### 1.2.2.3. *Staphylococcus aureus* :

Le tableau (21) montre les CMI et les CMB de: l'Imidazolidinyl urée, le Diazolidinyl urée, le Germaben II<sup>®</sup> et le BCTA vis-à-vis de *S.aureus* sur les trois milieux de culture : MH, BHIB et TSB.

Les CMI de l'Imidazolidinyl urée sont les mêmes (0,781 mg/ml) sur les trois milieux de culture vis-à-vis de *S.aureus*. Par contre, les CMB sont identiques seulement sur les deux milieux de culture MH et TSB (0,781 mg/ml), sur milieu BHIB la CMB est de 3,125mg/ml. En effet, le rapport CMB/CMI sur le milieu BHIB est de l'ordre de 4, cette valeur montre que le mode d'action de l'Imidazolidinyl urée vis-à-vis de *S.aureus* est bactériostatique.

La CMI du Diazolidinyl urée vis-à-vis de *S.aureus* sur le milieu TSB est identique à celle obtenue sur le milieu BHIB (0,195 mg/ml). Ce conservateur exerce un effet bactéricide sur *S.aureus* sur milieu TSB à une concentration de 0,39 mg/ml qui est très proche de sa CMI. Le rapport CMB/CMI de Diazolidinyl urée vis-à-vis de *S.aureus* sur le milieu de culture BHIB est de l'ordre de 8, nous pouvons donc dire que le Diazolidinyl urée possède une activité bactériostatique vis-à-vis de *S.aureus*. La CMI est égale à la CMB sur le milieu MH.

Ces résultats nous amènent à dire que le Diazolidinyl urée est quatre fois plus actif sur les milieux BHIB et TSB que sur le milieu MH.

Dans le milieu TSB, le conservateur BCTA n'a montré aucune activité dans l'intervalle de concentrations utilisées, vis-à-vis de *S.aureus*. Ceci nous laisse penser que la CMI et la CMB sont inférieures à la concentration de 0,15 µg/ml et que le BCTA possède une activité très forte vis-à-vis de *S.aureus*.

Par contre, et contrairement à ce que l'on attendait, le BCTA montre des CMI et des CMB très élevées sur les deux milieux de culture BHIB et MH (CMI de 2,4 µg/ml et 39 µg/ml) par rapport au milieu TSB (< 0,15 µg/ml). La CMB sur le milieu BHIB est supérieure à sa CMI et le rapport CMB/CMI sur les milieux MH et TSB est de l'ordre de 1.

La souche *S.aureus* est plus résistante que la souche *E.coli* sur le milieu MH. La présence des acides teicoïques (charge négative) dans la paroi des bactéries à gram positif peut établir des interactions ioniques avec le BCTA afin de réduire sa pénétration vers l'intérieure des cellules.

Sur la base des résultats obtenus sur les trois milieux de culture, nous remarquons que le BCTA montre une faible activité vis-à-vis de *S.aureus* sur le milieu MH par rapport aux deux milieux de culture BHIB et TSB. Nous savons que le milieu de culture MH ne représente pas le milieu de culture adéquat pour la croissance de souches de *S.aureus* (CLSI M7-A7, 2006), pour



cela, nous pensons que cette faible activité de BCTA dépend de la souche et non des propriétés physico-chimiques de ce conservateur.

D'après les résultats de NICOLETTI et coll., 1993, le BCTA montre une CMI vis-à-vis de *S.aureus*, de l'ordre de 16 µg/ml. Ce résultat est en accord avec nos résultats obtenus sur le milieu de culture MH.

### **Conclusion :**

A l'issue des résultats, nous pouvons conclure que:

- ✓ L'Imidazolidinyl urée est plus actif sur le milieu de culture MH que sur les deux milieux de culture BHIB et TSB vis-à-vis de *P.aeruginosa*.
- ✓ Le BCTA présente une forte activité antibactérienne sur le milieu MH vis-à-vis des deux souches à gram négatif : *E.coli* et *P.aeruginosa*. Cependant, il possède une forte activité sur le milieu TSB vis-à-vis de *S.aureus*.
- ✓ Quant aux deux conservateurs Diazolidinyl urée et Germaben II<sup>®</sup>, aucune influence significative des milieux de culture n'a été enregistrée sur leur activité antibactérienne.
- ✓ Le BCTA s'avère plus actif que les autres conservateurs vis-à-vis d'*E.coli* et de *S.aureus*. En revanche, le conservateur Germaben II<sup>®</sup> se montre le moins actif par rapport aux autres conservateurs.
- ✓ La souche *S.aureus* se révèle la plus sensible par rapport aux autres bactéries à gram négatif vis-à-vis des deux libérateurs de formaldéhyde (Imidazolidinyl urée et Diazolidinyl urée), cependant, la souche *E.coli* est la plus sensible par rapport à *P.aeruginosa* et *S.aureus* vis-à-vis de BCTA.
- ✓ Les tableaux (22), (23) et (24) représentent les rapports CMB/CMI des trois souches : *E.coli*, *P.aeruginosa* et *S.aureus*. A partir de ces tableaux, les quatre conservateurs : Imidazolidinyl urée (IU), Diazolidinyl urée (DU), Germaben II<sup>®</sup> (GB) et Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA) sont considérés comme des agents bactéricides vis-à-vis des deux souches à gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sur les trois milieux de culture : MH, BHIB et TSB. Cependant, les quatre conservateurs possèdent un effet bactériostatique vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sur le milieu BHIB.

**Tableau (21) :** Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricides (CMB) de : l'Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA vis-à-vis de la souche *S.aureus* sur les trois milieux de culture : MH, BHIB et TSB.

Conservateurs		Milieux de culture		
		MH	BHIB	TSB
Imidazolidinyl urée (mg/ml)	CMI	0,781	0,781	0,781
	CMB	0,781	3,125	0,781
Diazolidinyl urée (mg/ml)	CMI	0,781	0,195	0,195
	CMB	0,781	1,5625	0,39
Germaben II <sup>®</sup> (mg/ml)	CMI	3,125	1,5625	3,125
	CMB	3,125	6,25	3,125
BCTA (µg/ml)	CMI	39	2,4	< 0,15
	CMB	39	19,5	< 0,15

MH : Bouillon Muëller Hinton; BHIB : Bouillon au cœur cerveau; TSB : Bouillon Trypticase Soja.

Tableau (22) : Rapports CMB/CMI vis-à-vis de la souche *E.coli*

Milieux de culture	MH	BHIB	TSB
conservateurs			
<b>Imidazolidinyl urée</b>	1	1	1
<b>Diazolidinyl urée</b>	2	1	2
<b>Germaben II<sup>®</sup></b>	2	1	2
<b>BCTA</b>	2	1	1

Tableau (22) : Rapports CMB/CMI vis-à-vis de la souche *P.aeruginosa*

Milieux de culture	MH	BHIB	TSB
conservateurs			
<b>Imidazolidinyl urée</b>	1	2	1
<b>Diazolidinyl urée</b>	1	1	1
<b>Germaben II<sup>®</sup></b>	1	1	2
<b>BCTA</b>	1	2	2

Tableau (23) : Rapports CMB/CMI vis-à-vis de la souche *S.aureus*

Milieux de culture	MH	BHIB	TSB
conservateurs			
<b>Imidazolidinyl urée</b>	1	4	1
<b>Diazolidinyl urée</b>	1	8	2
<b>Germaben II<sup>®</sup></b>	1	4	1
<b>BCTA</b>	1	8	1



### 1.2.3. Etude de l'effet synergique de l'acide gallique avec l'IU et le DU :

La synergie se produit quand des agents différents (deux ou plus) agissent ensemble pour créer un effet plus grand que la somme des effets des différents agents testés séparément (HARRISON et coll. 2008).

L'acide gallique « AG » (figure (11)) est un composant connu pour ses activités antioxydantes largement exploitées dans les produits cosmétiques (STEAD, 1994). Dans cette partie, nous avons étudié la synergie de l'Imidazolidinyl urée avec l'acide gallique d'une part et le Diazolidinyl urée avec l'acide gallique d'autre part.

Pratiquement, deux étapes sont nécessaires pour étudier la synergie, la première est d'évaluer l'effet des deux agents testés par la méthode des disques; la deuxième est de déterminer la CMI et la CMB si la synergie est apparue dans la première étape.

#### **Milieu solide :**

L'évaluation qualitative de l'effet synergique entre l'Imidazolidinyl urée et l'acide gallique et entre le Diazolidinyl urée et l'acide gallique a été effectuée par la méthode de diffusion sur milieu solide MHA.

La figure (12) montre que l'association des deux conservateurs Imidazolidinyl urée et Diazolidinyl urée avec l'acide gallique révèle une activité antibactérienne synergique.

#### **Milieu liquide :**

Les résultats obtenus sur milieu solide ont été confirmés par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide (BHIB). Ces résultats montrent que la CMI et la CMB de l'acide gallique seul vis-à-vis d'*E.coli* (figures (13) et (14)) et de *P.aeruginosa* (figures (15) et (16)), sont similaires et égale à 6,25 mg/ml. La CMI et la CMB de l'AG vis-à-vis de *S.aureus* (figures (17) et (18)) sont aussi identiques, elles sont de l'ordre de 3,125 mg/ml.

#### ***Escherichia coli* :**

La meilleure activité de l'association a été obtenue vis-à-vis d'*E.coli*, où l'acide gallique baisse considérablement les valeurs des CMI de l'Imidazolidinyl urée et du Diazolidinyl urée. La nouvelle CMI de l'Imidazolidinyl urée a été réduite d'un facteur de 4 (0,39 mg/ml) et la nouvelle CMI de Diazolidinyl urée a été réduite d'un facteur de 8 (0,195 mg/ml).

#### ***Pseudomonas aeruginosa* :**

Aucun changement dans les CMI de l'Imidazolidinyl urée et du Diazolidinyl urée n'a été enregistré par l'association avec l'acide gallique vis-à-vis de *P.aeruginosa* (CMI de : 1,562

mg/ml et 0,781 mg/ml). Cependant, les CMB de l'association sont inférieures à celles des conservateurs seules.

Ce résultat inattendu peut s'expliquer par la capacité de *P.aeruginosa* de dégrader l'acide gallique et de l'utiliser comme substrat (BEVERIDGE et HUGO 1964).

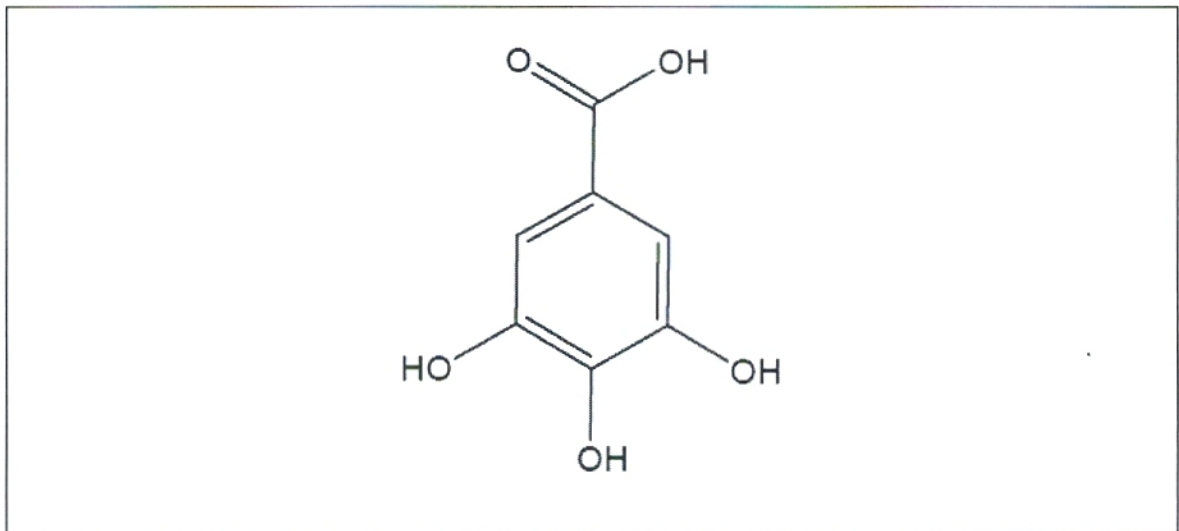
### ***Staphylococcus aureus* :**

Les résultats de l'association de l'acide gallique à l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée vis-à-vis de *S.aureus* montrent une variation remarquable dans les valeurs des CMI et des CMB de l'Imidazolidinyl urée. La CMI de l'Imidazolidinyl urée associé avec l'acide gallique est passé de 0,78 mg/ml (seul) à 0,39 mg/ml (associé). Ainsi, la CMI du Diazolidinyl urée associé à l'acide gallique est passé de 0,39 mg/ml (seul) à 0,097 mg/ml (associé).

### **Conclusion :**

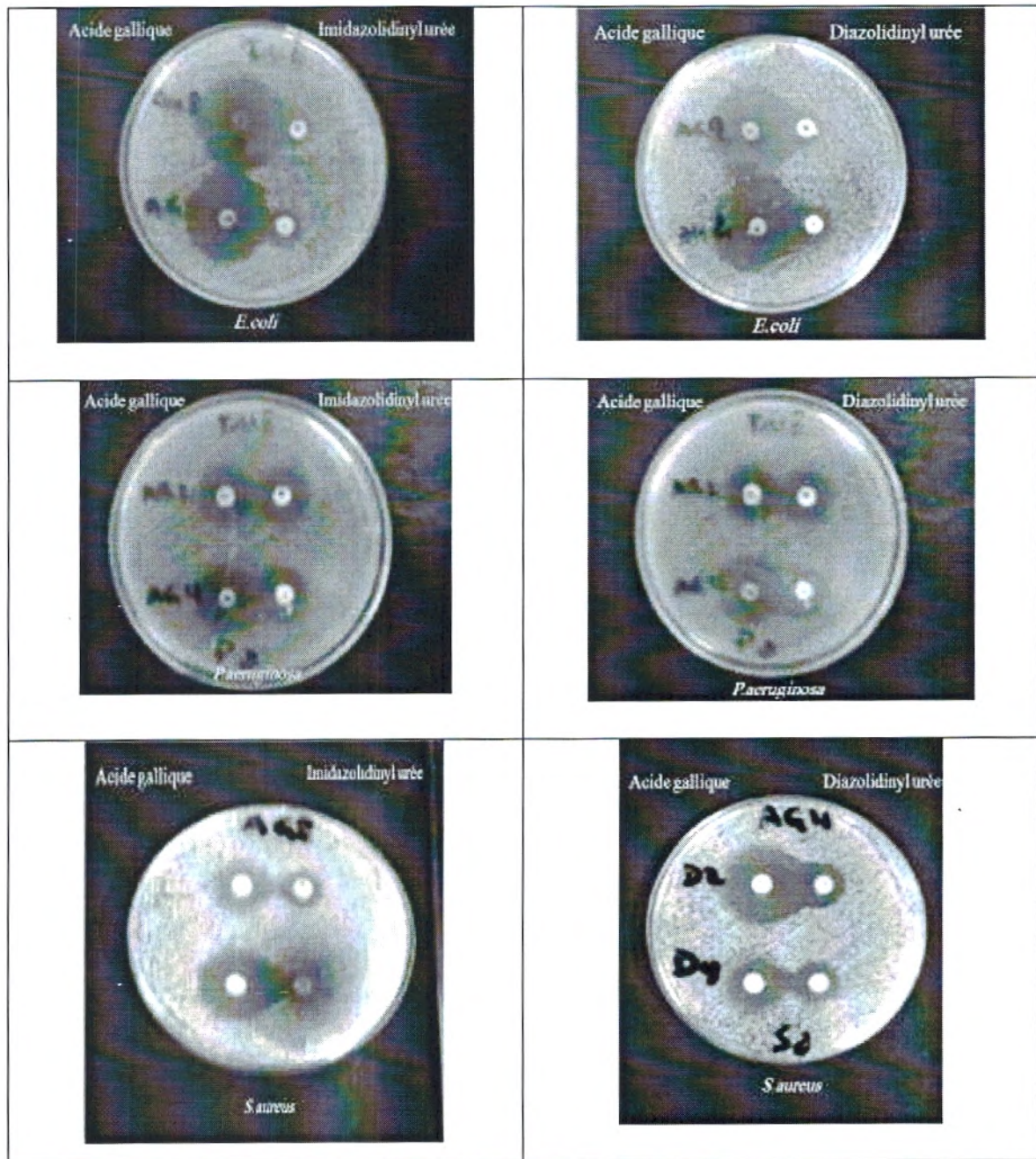
Ces résultats nous amènent à conclure que :

- ✓ L'acide gallique exerce un effet synergique avec l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée vis-à-vis des deux souches : *E.coli* et *S.aureus*.
- ✓ L'acide gallique a un effet cumulé avec l'Imidazolidinyl urée et le Diazolidinyl urée vis-à-vis de *P.aeruginosa*.

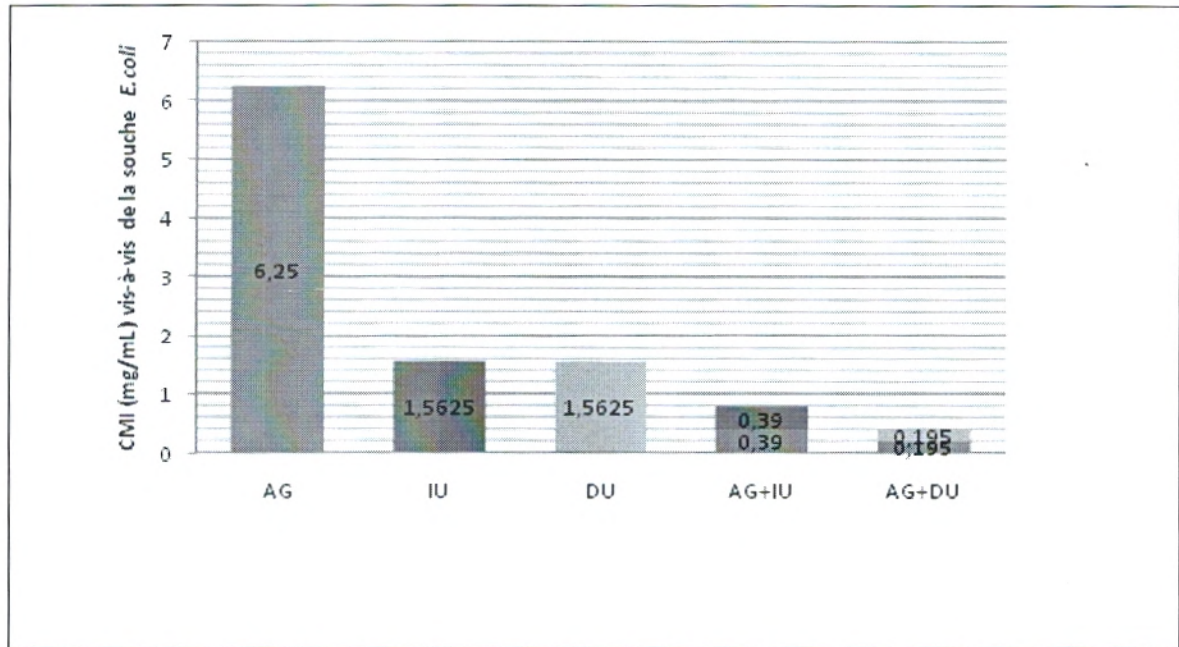


**Figure (11) :** Structure chimique de l'acide gallique

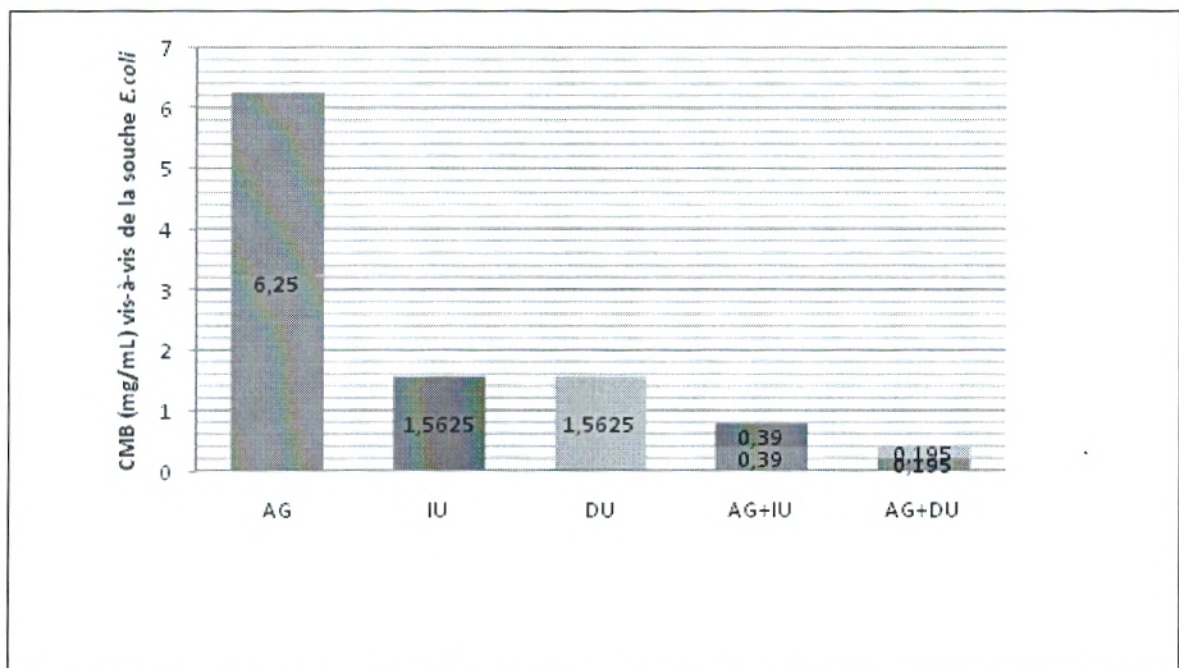




**Figure (12) :** Effet synergique de l'acide gallique avec l'IU et le DU vis-à-vis des trois souches : *E.coli*, *P.aeruginosa* et *S.aureus*

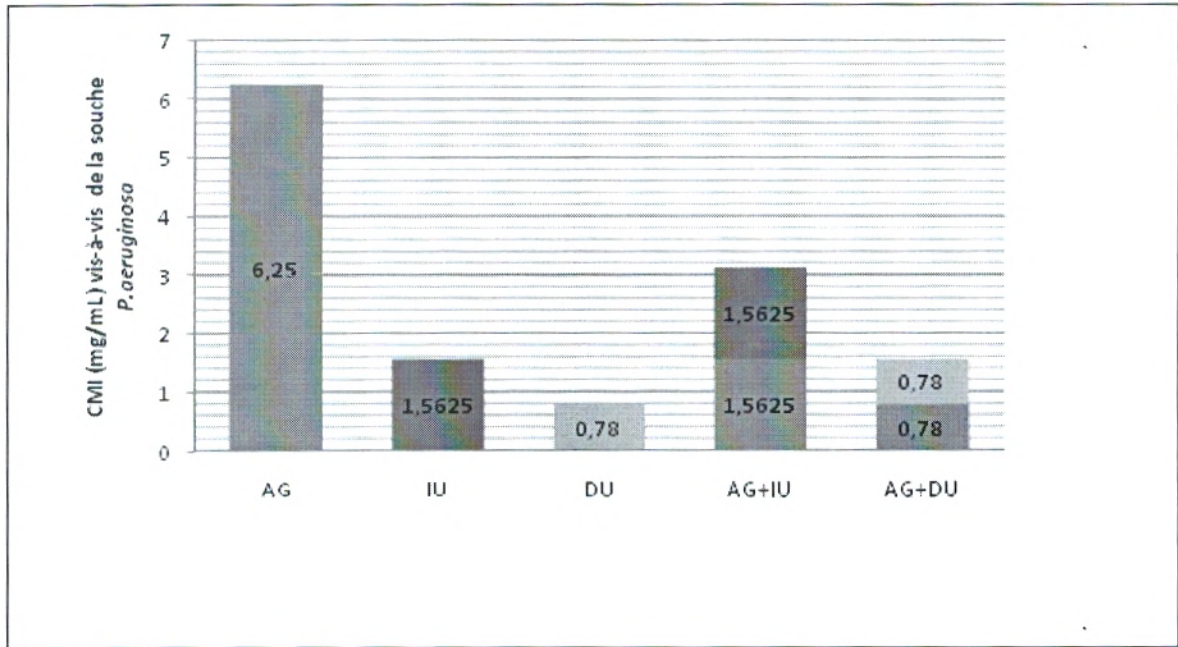


**Figure (13) :** Concentrations minimales inhibitrices de l'acide gallique associé avec : l'IU et le DU vis-à-vis d' *E.coli*

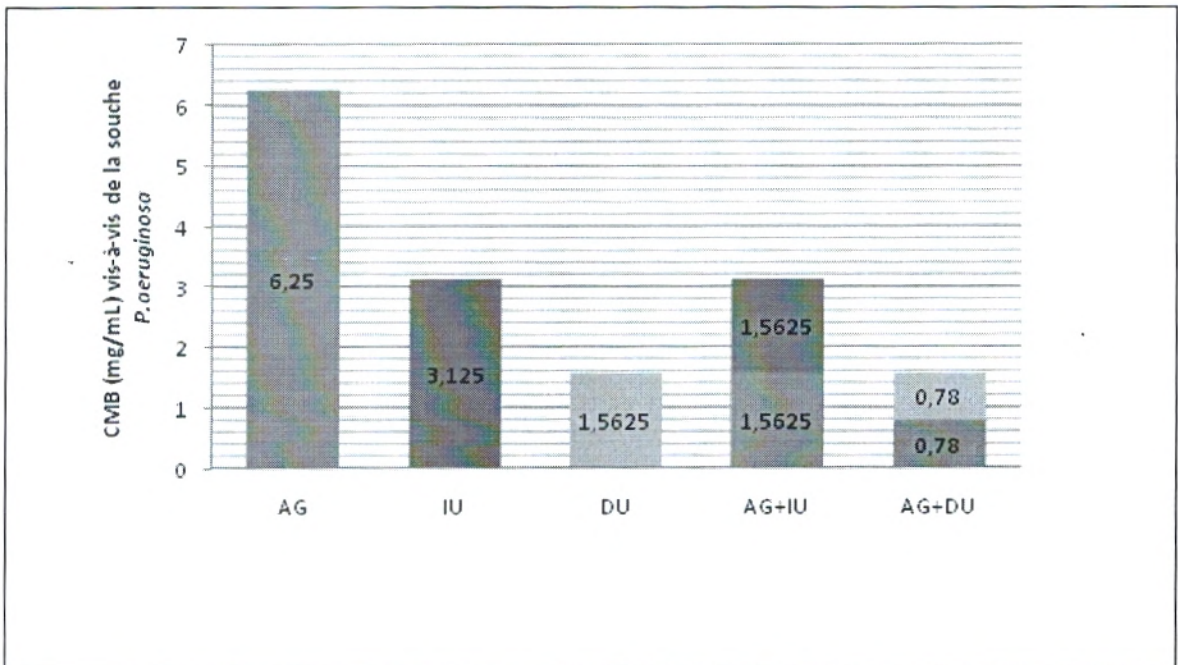


**Figure (14) :** Concentrations minimales bactéricides de l'acide gallique associé avec : IU et DU vis-à-vis d'*E.coli*



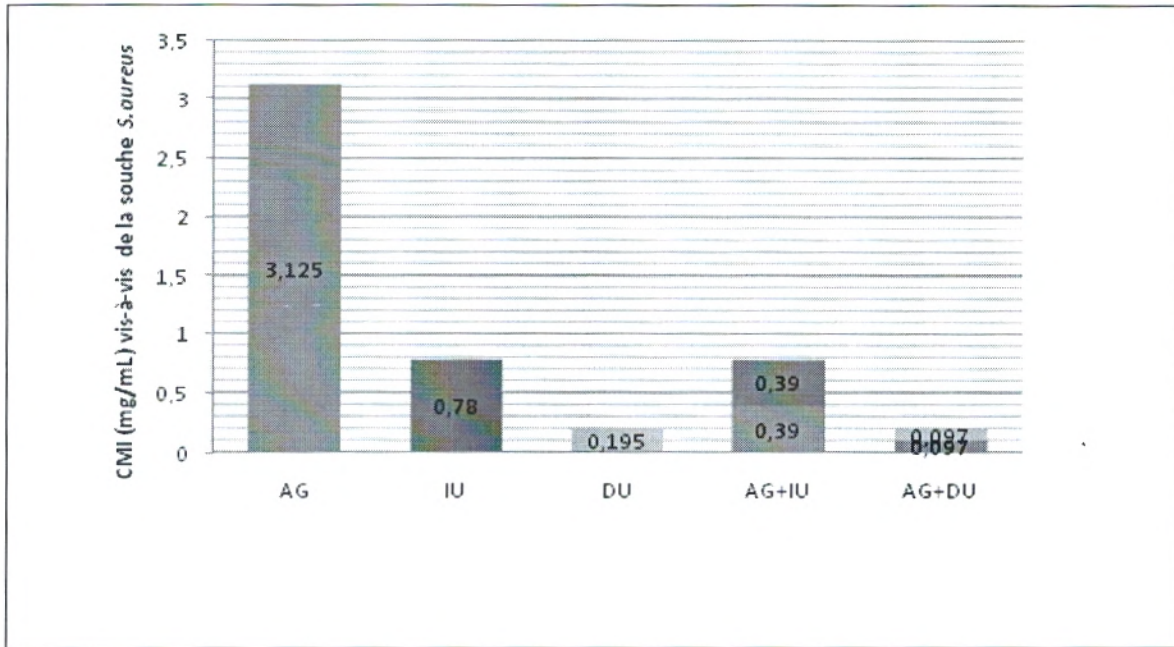


**Figure (15) :** Concentrations minimales inhibitrices de l'acide gallique associé avec : IU et DU vis-à-vis de *P. aeruginosa*

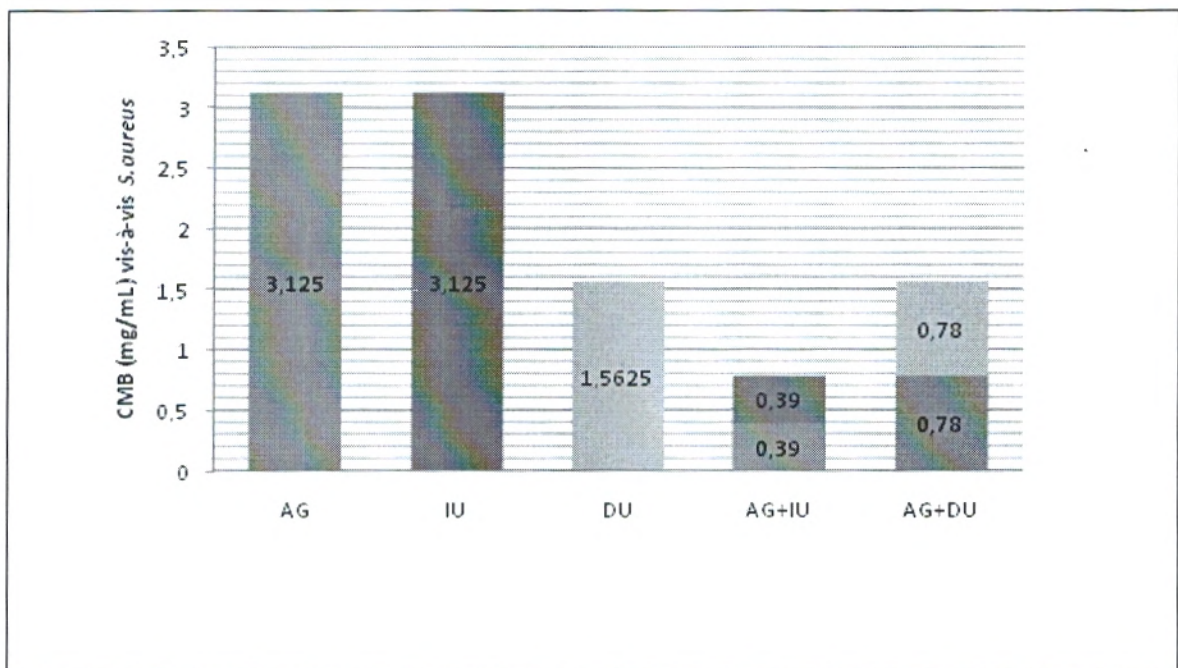


**Figure (16) :** Concentrations minimales bactéricides de l'acide gallique associé avec : IU et DU vis-à-vis de *P. aeruginosa*





**Figure (17) :** Concentrations minimales inhibitrices de l'acide gallique associé avec : IU et DU vis-à-vis de *S.aureus*



**Figure (18) :** Concentrations minimales bactéricides de l'acide gallique associé avec : IU et DU vis-à-vis de *S.aureus*

### 3. Evaluation de la cytotoxicité des conservateurs vis à vis des globules rouges :

Dans cette partie, notre travail a porté sur l'évaluation de la cytotoxicité des quatre conservateurs : Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II<sup>®</sup> et BCTA, vis-à-vis du globule rouge humain.

Lorsque la membrane plasmique du globule rouge est altérée par l'action des conservateurs, il s'ensuit une lyse qui se traduit par la libération de l'hémoglobine chez le globule rouge, c'est pourquoi nous avons dosé le taux d'hémoglobine extracellulaire après l'addition des différentes concentrations des conservateurs.

Les concentrations finales de chaque conservateur ont été choisies selon deux critères : les concentrations employées dans les produits cosmétiques et les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (fongicides pour les levures).

#### 3.1. Effet de l'Imidazolidinyl urée (IU) sur les globules rouges:

La figure (19) représente, l'effet de l'Imidazolidinyl urée préparé à des concentrations de : 0,097 à 12,5 mg/ml, sur la libération de l'hémoglobine par le globule rouge à 37 °C.

La courbe témoin représente la courbe où il n'y a aucune addition de conservateur, nous n'observons pas d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire durant les 120 minutes d'incubation.

Les courbes (a) et (b) représentent l'effet de l'Imidazolidinyl urée préparé aux concentrations de 0,097 à 0,195 mg/ml. Après 90 minutes d'incubation, les globules rouges perdent autour de 5% de leur hémoglobine. Cette perte est environ de 10% au bout de 120 minutes à ces concentrations.

Les courbes (c), (d), (e), (f), (g) et (h), représentent l'effet de l'Imidazolidinyl urée préparé aux concentrations de : 0,39 à 12,5 mg/ml. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est autour de 10% après 5 minutes d'incubation et reste constant durant les premières 90 minutes d'incubation pour toutes ces concentrations. Après 120 minutes d'incubation, le taux atteint un pourcentage de 20% à 33%.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le taux d'hémoglobine est constant durant 90 minutes d'incubation, il augmente après 120 minutes d'incubation à des taux d'hémoglobine doublés.

Il semble que dans le premier temps, l'Imidazolidinyl urée provoque la lyse des globules rouges par la libération du formaldéhyde dans le milieu aqueux. Le formaldéhyde est un composant qui est de petite taille, très réactif et possède un effet qui se traduit immédiatement après le contact avec ces cibles. Dans le deuxième temps, nous pouvons penser que

l'Imidazolidinyl urée manifeste sa cytotoxicité par ces molécules de décomposition qui peuvent montrer leurs activités lentement que le formaldéhyde libéré.



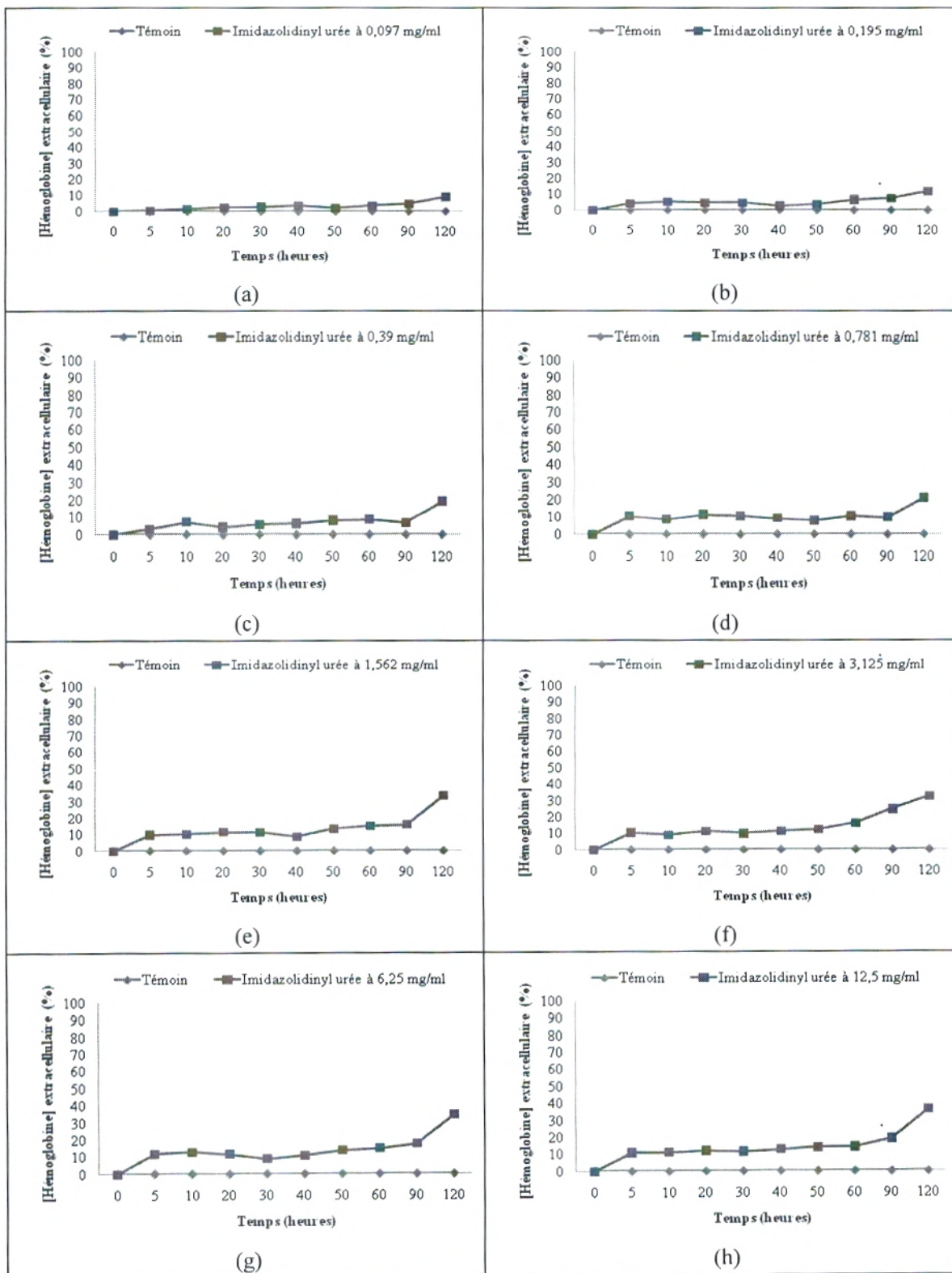


Figure (19) : Effet de la concentration croissante d'Imidazolidinyl urée sur la perte de l'hémoglobine chez le globule rouge

### 3.2. Effet de Diazolidinyl urée (DU) sur les globules rouges:

La figure (20) représente l'effet de Diazolidinyl urée préparé à des concentrations de 0,097 à 12,5 mg/ml, sur la libération de l'hémoglobine par le globule rouge à 37 °C.

La courbe témoin représente la courbe où il n'y a aucune addition de conservateur. Nous n'observons pas d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire durant les 120 minutes d'incubation.

Les courbes (a), (b), (c), (d) et (e) représentent l'effet de Diazolidinyl urée préparé à des concentrations de 0,097 à 1,562 mg/ml. Les globules rouges perdent près de 10% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation. L'hémolyse est estimée de 35% à 62% au bout de 120 minutes d'incubation.

Cette intervalle des concentrations de Diazolidinyl urée représente l'intervalle des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides vis-à-vis des souches testées dans la première partie de notre travail.

La courbe (f) représente l'effet de Diazolidinyl urée à 3,125 mg/ml. Les globules rouges perdent près de 5% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation et près de 30% après 20 minutes d'incubation et reste constant jusqu'à 40 minutes d'incubation. Cette perte est autour de 74% au bout de 120 minutes d'incubation.

Les courbes (g) et (h) représentent l'effet de Diazolidinyl urée à 6,25 et 12,5 mg/ml. Nous constatons une perte de 20% d'hémoglobine après 5 minutes d'incubation. Ce taux reste constant durant 30 minutes d'incubation. Après 40 minutes d'incubation la libération de l'hémoglobine augmente au cours du temps et atteint un taux de 83% au bout de 120 minutes d'incubation.

De même que l'Imidazolidinyl urée, nous remarquons que le Diazolidinyl urée induit une hémolyse en deux phases, la première phase de 10 à 40 minutes d'incubation. La deuxième phase de 60 à 120 minutes d'incubation. Il nous semble, aussi comme l'Imidazolidinyl urée, que le Diazolidinyl urée montre son activité par libération de formaldéhyde dans la première phase et ses composés de décomposition dans la deuxième phase.

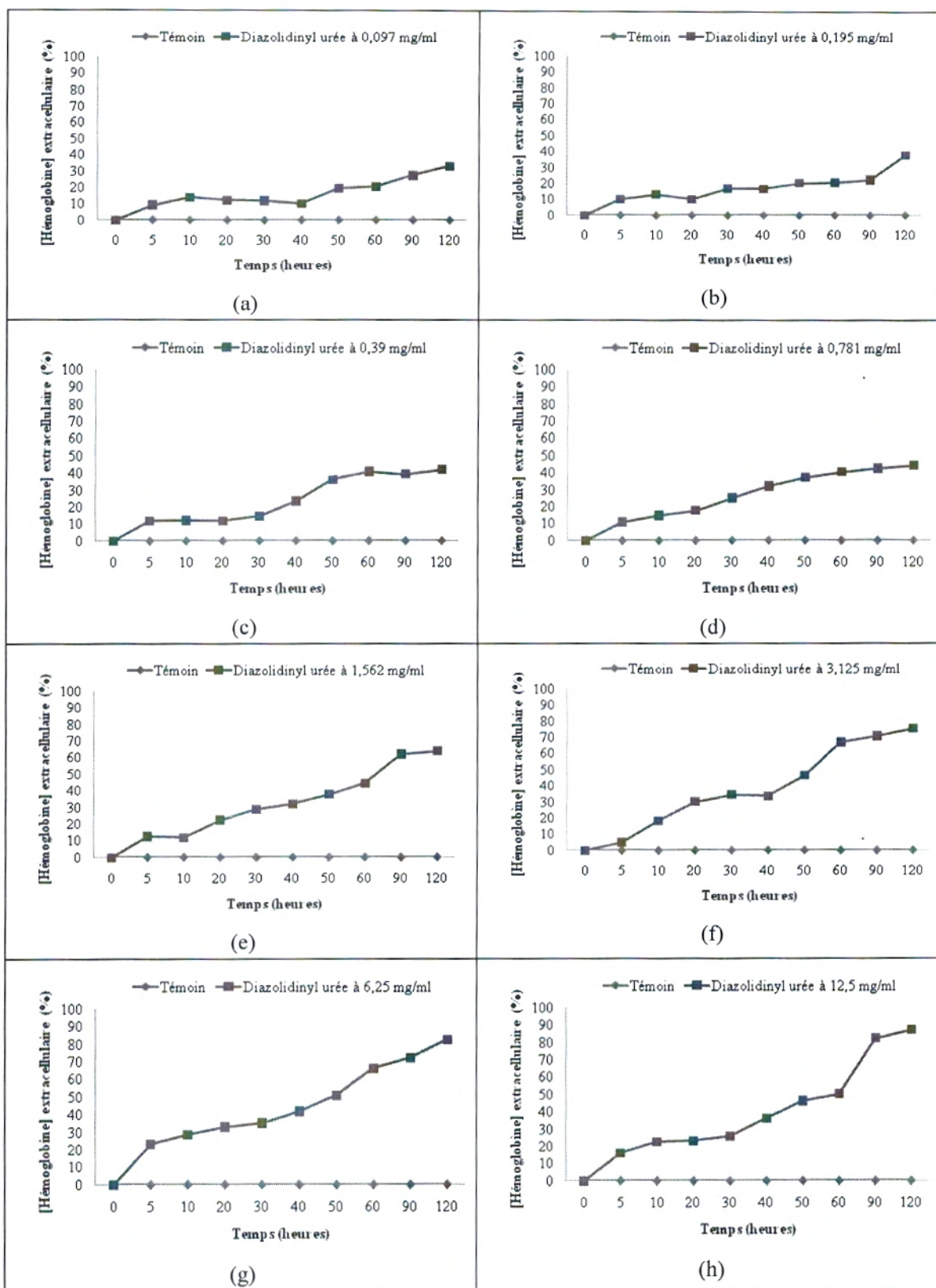


Figure (20) : Effet de la concentration croissante de Diazolidinyl urée sur la perte de l'hémoglobine chez le globule rouge



### 3.3. Effet de Germaben II<sup>®</sup> (GB) sur les globules rouges :

La figure (21) représente l'effet de Germaben II<sup>®</sup> préparé à différentes concentrations, sur la libération de l'hémoglobine par le globule rouge.

La courbe témoin montre la courbe où il n'y a aucune addition de conservateur. Nous n'observons pas d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire durant les 120 minutes d'incubation.

Les courbes (a), (b), (c) et (d) représentent l'effet de Germaben II<sup>®</sup> de 0,39 à 3,125 mg/ml. Nous remarquons que les érythrocytes perdent près de 5% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation et 22% à 32% au bout de 120 minutes.

Les courbes (e) et (f) représentent l'effet de Germaben II<sup>®</sup> de 6,25 à 12,5 mg/ml. Les globules rouges perdent autour de 12% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation. Ce taux atteint 48,71% et 66,58% au bout de 120 minutes d'incubation.

Sur la base des résultats obtenus de l'Imidazolidinyl urée, le Diazolidinyl urée et le Germaben II<sup>®</sup>, il apparaît que la lyse des globules rouges est croissante avec des concentrations des conservateurs.

### 3.4. Effet de BCTA sur les globules rouges :

La figure (22) représente à 37 °C l'effet de BCTA préparé à différentes concentrations sur le globule rouge.

La courbe témoin représente la courbe où il n'y a aucune addition de conservateur. Nous n'observons pas d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire durant les 120 minutes d'incubation.

Les courbes (a), (b), (c), (d), (e) et (f) représentent l'effet de BCTA de 0,00015 à 0,156 mg/ml. Les globules rouges perdent près de 20% à 30% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation. Ce taux reste constant durant les 120 minutes d'incubation.

La courbe (g) représente l'effet de BCTA préparé à une concentration de 0,625 mg/ml. L'hémolyse est estimée autour de 20% après 5 minutes d'incubation, et reste constante durant 120 minutes.

La courbe (h) représente l'effet de BCTA à 2,5 mg/ml. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est autour de 12% au cours de 120 minutes d'incubation.

Sachant que l'ammonium quaternaire, le BCTA, possède des propriétés physico-chimiques particulières, qui favorisent la formation des structures micellaires aux concentrations de 0,3 mg/ml à 110 mg/ml (POKHRIYAL et coll. 2003). En effet, nous pensons que le BCTA va établir des complexes structuraux qui réduisent son activité vis-à-vis des globules rouges.

Des agrégats micellaires de BCTA se forment avec les composants hydrophobes de la membrane et provoquent la lyse cellulaire. Cette dernière se produit par la fuite progressive des constituants cytoplasmiques [(McBAIN et coll. 2004), (BABU et coll. 2009)].

En outre, le BCTA est capable de provoquer la coagulation des protéines cytoplasmiques par des interactions irréversibles avec les protéines, bien que les concentrations exigées pour réaliser cette coagulation soient généralement beaucoup plus élevées que ceux requises pour causer la fuite de la membrane.

La précipitation cytoplasmique peut être également évidente dans certaines études qui se sont intéressées à la fuite cellulaires par des agents actifs sur la membrane. La fuite des constituants cytoplasmiques des cellules traitées par le BCTA peut s'augmenter avec l'augmentation de la concentration de ce conservateur jusqu'à une concentration où la précipitation cytoplasmique se produit [(CHAPMAN 2003a), (LAMBERT 2004a)].

### **Conclusion :**

De l'ensemble de nos résultats nous concluons que :

- ✓ L'Imidazolidinyl urée n'induit qu'une faible libération de l'hémoglobine au bout de 120 minutes d'incubation.
- ✓ Le Diazolidinyl urée induit une libération massive de l'hémoglobine par rapport l'Imidazolidinyl urée qui atteint un taux de 83% aux concentrations de 12,5 mg/ml et 6,25 mg/ml.
- ✓ La cytotoxicité de Germaben II<sup>®</sup> vis-à-vis des globules rouges est élevée au bout de 120 minutes par rapport les premières 60 minutes d'incubation.
- ✓ En dessous de la concentration de 0,156 mg/ml, le BCTA commence à provoquer la lyse cellulaire de manière décroissante.



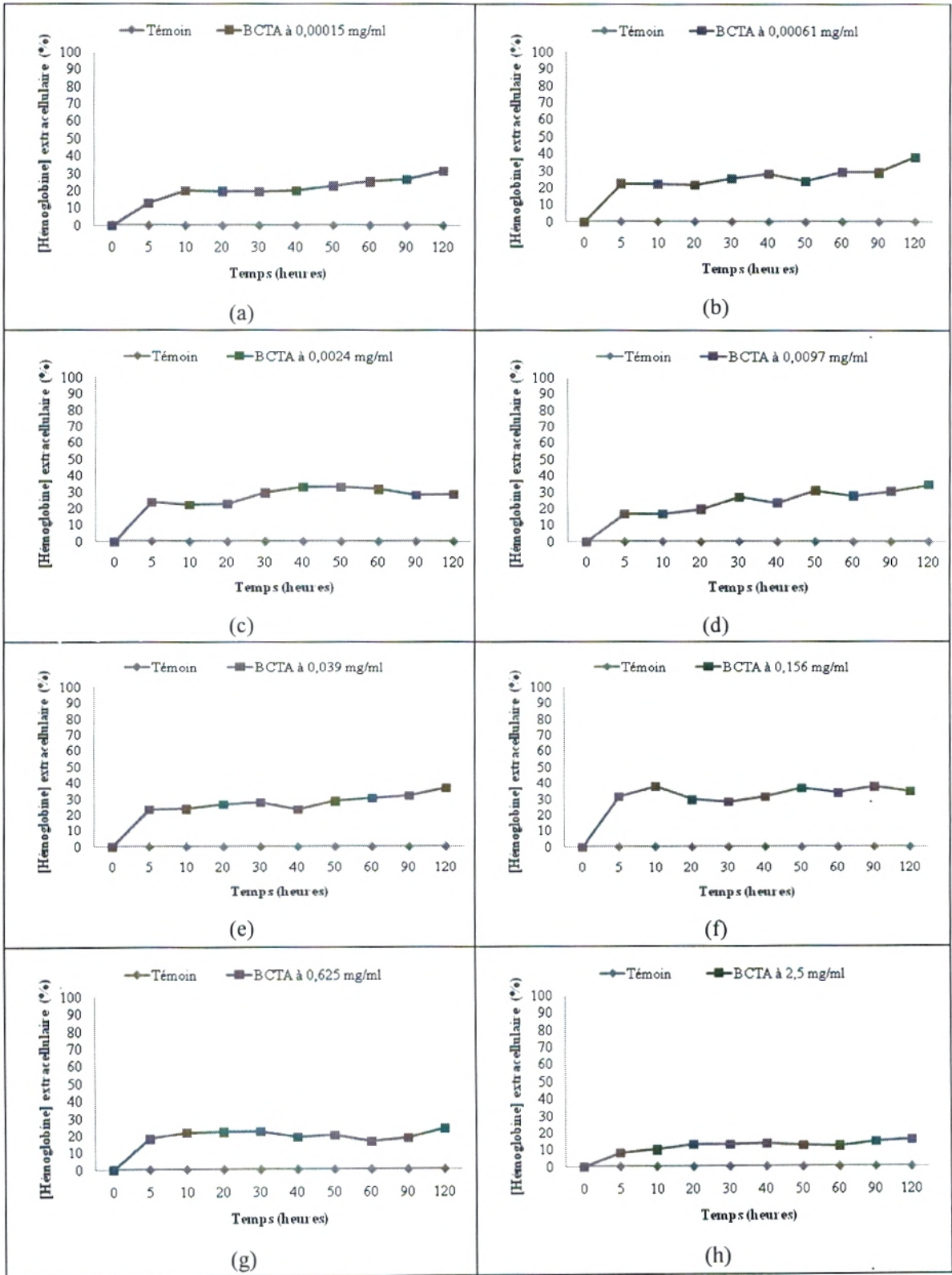


Figure (23) : Effet de la concentration croissante de BCTA sur la perte de l'hémoglobine chez le globule rouge

# Conclusion générale

Ce travail a porté sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne (antifongique et antibactérienne) de quatre conservateurs largement utilisés dans les produits cosmétiques; il s'agit de : l'Imidazolidinyl urée (IU), du Diazolidinyl urée (DU), du Germaben<sup>®</sup> (GB) et du Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA) ceci d'une part, et sur la cytotoxicité de ces conservateurs vis-à-vis du globule rouge humain d'autre part.

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur une levure : *Candida albicans*, et sur trois bactéries : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Différents milieux de culture ont été utilisés.

Il ressort de ce travail les points suivants:

- Les résultats relatifs aux concentrations de l'Imidazolidinyl urée et du Germaben<sup>®</sup> vis-à-vis de *Candida albicans*, montrent que la protection des produits cosmétiques par ces conservateurs est très insuffisante. En revanche le Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium est capable de protéger les produits cosmétiques contre les contaminations microbiennes.
- L'Imidazolidinyl urée est plus actif sur les bactéries que sur la levure, toutefois son spectre antimicrobien est plus réduit que celui du Diazolidinyl urée. Le Germaben<sup>®</sup> est le moins actif de tous les conservateurs, alors que le Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium reste le plus actif (BCTA > DU > IU > GB).
- L'activité antibactérienne et antifongique des conservateurs vis-à-vis des quatre souches testées est nettement meilleure dans les milieux de culture liquides que dans les milieux de culture solides.
- Les milieux de culture utilisés n'ont eu aucun effet significatif de l'Imidazolidinyl urée vis-à-vis de *C.albicans*, *E.coli* et *S.aureus*. Par contre sur milieu MH ce conservateur possède l'activité la plus élevée vis-à-vis de *P.aeruginosa*.
- La meilleure activité du Diazolidinyl urée vis-à-vis de *C.albicans* et de *S.aureus* est obtenue sur les milieux de culture RPMI et TSB, respectivement. Cependant, aucune influence significative des milieux de culture n'a été enregistrée sur l'activité du Diazolidinyl urée vis-à-vis: *E.coli* et *P.aeruginosa*.
- Aucune influence significative des milieux de culture n'a été enregistrée sur l'activité du Germaben<sup>®</sup> vis-à-vis des quatre souches testées.
- La meilleure activité du Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium a été enregistrée : sur le milieu de culture RPMI vis-à-vis de *C.albicans*, sur milieu MH vis-à-vis de *E.coli* et de *P.aeruginosa* et sur milieu TSB vis-à-vis de *S.aureus*.



- L'acide gallique exerce un effet synergique avec l'Imidazolidinyl urée et avec le Diazolidinyl urée vis-à-vis des deux souches : *E.coli* et *S.aureus* et un effet cumulé vis-à-vis de *P.aeruginosa*. Nous suggérons de l'utiliser dans les formulations cosmétiques en association avec ces deux conservateurs pour deux raisons: réduire la concentration de l'Imidazolidinyl urée et du Diazolidinyl urée dans les produits cosmétiques et comme un ingrédient antioxydant compatible avec ces deux conservateurs.
- Concernant la cytotoxicité, les concentrations autorisées dans les produits cosmétiques induisent une libération de l'hémoglobine des globules rouges à des taux de : 33 à 36% pour l'Imidazolidinyl urée, 75 à 82% pour le Diazolidinyl urée, 48% pour le Germaben® et 24% pour le Bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium .

Perspectives :

Il serait intéressant :

- d'élargir cette étude à d'autres conservateurs et d'autres souches de bactéries et de levures.
- Tester certains extraits de plantes, les huiles essentielles, l'alcool, certaines enzymes, pouvant contribuer à la conservation microbiologique
- La stabilité microbiologique des produits cosmétiques.
- Nécessité de mettre en œuvre des études expérimentales sur les cosmétiques dans le but de mieux préciser le risque d'allergie et le seuil de toxicité.

# Références bibliographiques

1. 76/768 /CEE, Directive 76/768 /CEE (2008) du 27/07/1976 JOCE L262 du 27/09/76.
2. AALTO-KORTE KRISTIINA, KUULIALA O., SUURONEN K. AND ALANKO K. (2008) Occupational contact allergy to formaldehyde and formaldehyde releasers. *Contact Dermatitis*; 59: 280–289.
3. Abirami C.P. and Venugopal P.V. (2005) In vitro evaluation of the antifungal activity of toothpastes. *Journal de Mycologie Médicale*; 15:247–249.
4. Adams Robert M., and Maibach Howard. (1985) A five-year study of cosmetic reactions. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 13 (6): 1062-1069.
5. Afssaps. (2009) Surveillance du marché Produits cosmétiques "sans conservateur" labellisés "BIO", Mars 2009.
6. Agarwal Vivek, Singh Mohit, McPherson Gary, John Vijay, Bose Arijit. (2006) Microstructure evolution in aqueous solutions of cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) and phenol derivatives. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*; 281:246–253.
7. AGNER T., ANDERSEN K. E., BJÖRKNER B., BRUZE M., FROSCH P. J., GRUVBERGER B., HOECK U., KREILGAARD B., T. The National Cancer Institute (NCI) for consideration by the Chemical Selection Working Group (CSWG) by Technical Resources International, Inc. under contract No. N02-CB-07007 (09/03; 08/04). (2004) Imidazolidinyl urea 39236-46-9.
8. AHLSTROM B., THOMPSON R. A. and EDEBO L. (1999) Loss of bactericidal capacity of long-chain quaternary ammonium compounds with protein at lowered temperature. *APMIS*; 107:606-14.
9. Al-Bayati F.A. (2008) Synergistic antibacterial activity between Thymus vulgaris and Pimpinella anisum essential oils and methanol extracts, *Journal of Ethnopharmacology* ; 116 : 403–406.
10. André Marc P, O and Howard I. M. (2006) Handbook of Cosmetic Science and Technology. Taylor & Francis Group, USA; 1-3.
11. AppliChem GmbH. (2004) Material Safety Data Sheet: Cetyltrimethylammonium bromide.1-5.
12. Babu T. Ganesh, Nithyanand P., Babu N. K. Chandra and Pandian S. Karutha. (2009) Evaluation of cetyltrimethylammonium bromide as a potential short-term preservative agent for stripped goat skin. *World J Microbiol Biotechnol*; 25:901–907.
13. Badreshia Sonia and Marks James G. (2002) Iodopropynyl Butylcarbamate. *American Journal of Contact Dermatitis*, 13(2):77-79.
14. Barros Lillian, Calhella Ricardo C., Vaz Josiana A., Ferreira Isabel C. F. R., Baptista Paula, Estevinho Leticia M. (2007) Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur Food Res Technol*; 225:151–156.
15. Belsito Donald V. (2008) Contact Dermatitis: Allergic and Irritant. *Clinical and Basic Immunodermatology*; 2:171-192.
16. BENASSI C. A., RETTORE A., SEMENZATO A., BETTERO A. and CERINI R. (1988) Chemical stability and microbiological reply of preservative systems in cosmetics: a direct correlation. *International Journal of Cosmetic Science*; 10: 231-239.
17. BENASSI C. A., RETTORE A., SEMENZATO A., BETTERO A. and CERINI R. (1988) Chemical stability and microbiological reply of preservative systems in cosmetics: a direct correlation. *International Journal of Cosmetic Science*; 10:231-239.
18. BENASSI C. A., SEMENZATO A., LUCCHIARI M. and BETTERO A. (1988) Dehydroacetic acid sodium salt stability in cosmetic preservative mixtures. *International Journal of Cosmetic Science*; 10:29-37.
19. Bercy P., Flamand Y. and Defleur P. (1994) Effectiveness of Bromochlorophene on Gingival Health. *Advances in Therapy*; 11(4):1-5.
20. BERKE PHILIP A. and ROSEN WILLIAM E. (1978) Imidazolidinyl urea activity against Pseudomonas. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 29:757-766.
21. BEVERIDOE, E. G. and HUGO, W. B. (1964).The Metabolism of Gallic Acid by Pseudomoms convexa X.I. *J. Appl. Bact*; 27 (3): 448-460.
22. Bilková Katerina and Gulbrandsen Egil. (2008) Kinetic and mechanistic study of CO2 corrosion inhibition by cetyl trimethyl ammonium bromide. *Electrochimica Acta*; 53:5423–5433.
23. Bill Statham. (2007) What's really in your basket? *Summersdale Publishers*.
24. BLANCHARD JAMES. (1980) Effect of Polyols on Interaction of Paraben Preservatives with Polysorbate 80. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 69(2):169-173.
25. BOROVIAN GAYLE E. (1983) Pseudomonas cepacia: growth in and adaptability to increased preservative concentrations. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 34: 197-203
26. Borremans M., Van Loco J., Roos P. and Goeyens L. (2004) Validation of HPLC Analysis of 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl,



- Ethyl, Propyl, Butyl and Benzyl 4-Hydroxybenzoate (Parabens) in Cosmetic Products, with Emphasis on Decision Limit and Detection Capability. *Chromatographia*; 59:47–53.
27. **BOU-CHACRA NADIA A., PINTOC TEREZINHA DE JESUS A., OHARA and MITSUKO TABA. (2003)** Evaluation of preservative systems in a sunscreen formula by the linear regression method. *J. Cosmet. Sci.*; 54: 1-7.
28. **BOUCHERIT-ATMANI Zahia., (2007)** Mécanisme d'action des antifongiques polyéniques. Exemple de l'amphotéricine B. *UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TELMCEN.*
29. **BOYVAT AYŞE, AKYOL AYNUR AND GÜRGEY ERBAK. (2005)** Contact sensitivity to preservatives in Turkey. *Contact Dermatitis*; 2: 329–332.
30. **Bozena B. Michniak-Kohn, Philip W. Wertz, Mohammad Al-Khalili, Victor M. Meidan. (2005)** Skin: Physiology and Penetration Pathways. In: **Meyer R. Rosen.** *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products.* William Andrew, USA; 77–100.
31. **Branna Tom. (2007)** Preservative market update. *HAPPI*, (May). [www.Happi.com](http://www.Happi.com).
32. **Brannan Daniel K. (2006)** Validation of methods. In: **Philip A. Geis.** *Cosmetic microbiology: a practical approach*; 2nd ed. Taylor & Francis Group; 147-160.
33. **BRANNAN DANIEL K. AND DILLE JAMES C. (1990)** Type of Closure Prevents Microbial Contamination of Cosmetics during Consumer Use. *Applied and Environmental Microbiology*; 56(5):1476-1479.
34. **Breast Cancer Fund and The campaign for safe cosmetics. (2008)** US and European Union Approaches to Cosmetic Safety. *FDA & EU Directive Fact Sheet.*
35. **Burmester Gerd-Riidiger and Pezzutto Antonio. (2000)** Atlas de poche d'immunologie es, analyses biologiques, pathologies. Traduit par Péter Van Endert. *Flammarion Médecine-Sciences.*
36. **C.I.C., Cosmetic Ingredients and Chemicals. (2009)** Germaben II. [http://cosmechem.com/germaben\\_preservative.htm](http://cosmechem.com/germaben_preservative.htm)
37. **C.S., The Chemistry Store.com. (2009)** Germaben II. [http://www.chemistrystore.com/Preservatives-Germaben\\_II\\_1.html](http://www.chemistrystore.com/Preservatives-Germaben_II_1.html).
38. **Campana R., Scesa C., Patrone V., Vittoria E. and Baffone W. (2006)** Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*; 43:301–306.
39. **Canton E., J. Pema 'N, A. Viudes, G. Quindo 'S, M. Gobernado, and A. Espinel-Ingroff. (2003)** Minimum fungicidal concentration of amphotericin B for bloodstream Candida species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45:203–206
40. **Chapman John S. (2003)** Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 51:133-138.
41. **Chapman John S. (2003)** Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 51:271-276.
42. **Chapman John S. (2006)** Antimicrobial mechanisms of selected preservatives and the bacterial response. In: **Philip A. Geis.** *Cosmetic microbiology: a practical approach*; 2nd ed. Taylor & Francis Group; 181-190.
43. **Charles A. K. and Darbre P. D. (2009)** Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells in vitro. *J. Appl. Toxicol*; [www.interscience.wiley.com/journal/jat](http://www.interscience.wiley.com/journal/jat).
44. **Charnock C. and Finsrud T. (2007)** Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*; 32:567–572.
45. **Chatterjee Sudipta, Lee Dae S., Lee Min W. and Wooa Seung H. (2009)** Enhanced adsorption of congo red from aqueous solutions by chitosan hydrogel beads impregnated with cetyl trimethyl ammonium bromide. *Bioresource Technology*; 100:2803–2809.
46. **Chevalier J., Corre J. and Crémieux A. (1995)** Evaluation of synergistic effects of three bactericidal agents associated in an antiseptic formulation. *Pharmaceutica Acta Helveticae*; 70:155-159.
47. **Cho Kyung-Hwan, Park Jong-Eun, Osaka Tetsuya and Park Soo-Gil. (2005)** The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*; 51:956–960.
48. **CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006)** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Ninth Edition (M2-A9). 26 (1).
49. **CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002)** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2, 2nd ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA*, 22 (15).



50. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2004) Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline M44-A. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA*; 2004. 24 (15).
51. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006) Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA*; 26 (2).
52. Connolly P., Bloomfield Sally F. and Denyer S.P. (1993) A study of the use of rapid methods for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics. *Journal of Applied Bacteriology*; 75: 456-462.
53. Connolly P., Bloomfield Sally F. and Denyer S.P. (1994) The use of impedance for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetic products. *Journal of Applied Bacteriology*; 76:68-74.
54. Cortez Ely Vieira, Pessoa Adalberto, Jr, Felipe Maria das Graças de Almeida, Roberto Inês Conceição and Vitolo Michele. (2004) Optimized extraction by cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate. *Journal of Chromatography B*; 807:47-54.
55. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. (2003) Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments-2001/2002. *International Journal of Toxicology*; 22(Suppl.1):1-35.
56. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. (2008) Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments:2005. *International Journal of Toxicology*; 27(Suppl.1):77-142.
57. COWEN R. A. and STEIGER B. (1976) Antimicrobial activity—a critical review of test methods of preservative efficiency. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 27: 467-481.
58. Coz Christophe J. and Lepoittevin Jean-Pierre. (2006) Dictionary of Contact Allergens: Chemical Structures, Sources and References. In : Frosch Peter J. ,Menné Torkil, Lepoittevin Jean-Pierre . Contact Dermatitis 4<sup>th</sup> Ed.; Springer; 943-1105.
59. Crémieux A., Cupferman S. and Lens C. (2005) Method for evaluation of the efficacy of antimicrobial preservatives in cosmetic wet wipes. *International Journal of Cosmetic Science*; 27:223-236.
60. CRÉPY M.N. (2006) Dermatoses professionnelles aux cosmétiques. *Fiche d'allergologie-dermatologie professionnelle; dmt* ; N° 107 3<sup>e</sup> trimestre.
61. Cruces-Blanco Carmen, Carretero Antonio Segura, Peinado Silvia Fernaández and Alberto Gutiérrez Fernaández. (2000) Spectrofluorimetric Determination of Methyl Paraben in Pharmaceutical Preparations by Means of its Dansyl Chloride Derivative. *Mikrochim. Acta*; 134:107-111.
62. Cuenca-Estrella Manuel, Lee-Yang Wendy, Ciblak Meral A., Arthington-Skaggs Beth A., Mellado Emilia, Warnock David W. and Rodriguez-Tudela Juan L. (2002) Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11):3644-3647.
63. D.H.I. - Centre for Environment and Toxicology. (2008) FICHE DE DONNEES DE SECURITE: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). *FeF Chemicals A/S*; 1-7.
64. Darbre P. D., Aljarrah A., Miller W. R., Coldham N. G., Sauer M. J. and Pope G. S. (2004) Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours. *J. Appl. Toxicol.*; 24:5-13.
65. Darbre Philippa D. and Harvey Philip W. (2008) Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*. 28: 561-578.
66. Dart R.K. (1996) Biodeterioration. In: Microbiology for the Analytical Chemist. *The Royal Society of Chemistry, UK*; 16-17.
67. Dart R.K. (1996) Sterility, Sterility Testing, Disinfectants and Preservatives. In: Microbiology for the Analytical Chemist. *The Royal Society of Chemistry, UK*; 123-131.
68. Darwish Rula M. and Bloomfield Sally F. (1995) The effect of co-solvents on the antibacterial activity of paraben Preservatives. *International Journal of Pharmaceutics*; 119:183-192.
69. Darwish Rula M., and Bloomfield Sally F. (1997) Effect of ethanol, propylene glycol and glycerol on the interaction of methyl and propyl p-hydroxybenzoate with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Pharmaceutics*; 147: 51-60.
70. Davin-Regli A., Chollet R., Bredin J., Chevalier J., Lepine F. and Pagès J. M. (2006) Enterobacter gergoviae and the prevalence of efflux in parabens resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 57:757-760.
71. Davis De Beer P. and Martel J. (2003) Conditions de la prise en charge exceptionnelle des cosmétiques, *Encycl Méd Chir, Cosmétologie et Dermatologie esthétique*, 50-260-B-10; 3.
73. DE GROOT ANTON C. (1997) Contact allergens-what's new? Cosmetic Dermatitis. *Clinics in Dermatology*; 15:485-491.



74. **De Groot Anton C., and Weyland J. Willem.** (1988) Kathon CG: A review. *Journal of the American Academy of Dermatology*; 18(2):350-358.
75. **De Groot Anton C., Bruynzeel Derk P., Jagtman Berend A. and Weyland J. Willem.** (1988) Contact allergy to Diazolidinyl urea (Germall II®). *Contact Dermatitis*; 18: 202-205. (D2)
76. **DE KRUIJF N., RIJK M. A. H., PRANOTO-SOETARDHI L. A. AND SCHOUTEN A.** (1987) DETERMINATION OF PRESERVATIVES IN COSMETIC PRODUCTS; I. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC PROCEDURE FOR THE IDENTIFICATION OF PRESERVATIVES IN COSMETIC PRODUCTS. *Journal of Chromatography*; 410:395-411.
77. **DEAN-RAYMOND DEBORAH AND ALEXANDER M.** (1977) Bacterial Metabolism of Quaternary Ammonium Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*; 33(5):1037-1041.
78. **Delarras Camille.** (2007) Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. *LAVOISIER*; 409-427.
79. **Denyer Stephen P., Hugo W. Barry and Harding Valerie D.** (1985) Synergy in preservative combinations. *International Journal of Pharmaceutics*; 25:245-253.
80. **Doi Takahiro, Kajimura Keiji, Takatori Satoshi, Fukui Naoki, Taguchi Shuzo and Iwagami Shozo.** (2009) Simultaneous measurement of diazolidinyl urea, urea, and allantoin in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B*; 877:1005–1010.
81. **Ducombs G.** (2000) Intolérance aux cosmétiques. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris)*; 50-250-A-10, 10.
82. **Dwivedi M.K., Yadav R.A. and Tiwari S.N.** (2006) Liquid crystalline behaviour of N-cetyl N,N,N-trimethyl ammonium bromide: An experimental study. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*; 52:91-98.
83. **Easley Jeffrey, Gorman Wilma, and Mendoza Monika.** (2003) Approaches for Adding Antibacterial Properties to Cosmetic Products. In: **Randy Schueller and Perry Romanowski.** Multifunctional Cosmetics. *Marcel Dekker, USA*; 161-176.
84. **Edser Caroline.** (2006) The Role of Preservatives. *Focus on Surfactants*.
85. **Epstein Howard.** (2006) Cosmetics preservation: sense and nonsense. *Clinics in Dermatology*; 24:551–552.
86. **Espinel-Ingroff Ana and Cantón Emilia.** (2007) Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. In: **Richard Schwalbe, Lynn Steele-Moore, and Avery C. Goodwin.** Antimicrobial susceptibility testing protocols. *Taylor & Francis Group*; 173-208.
87. **Essche René Van.** (2006) EEC Cosmetic Directive and Legislation in Europe. In: **Marc P, André O, Howard I. M.** Handbook of Cosmetic Science and Technology. *Taylor & Francis Group, USA*; 869-877.
88. **European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)** (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8):1-7.
89. **European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).** (2000) Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection*; 6(9):503-508.
90. **FARRINGTON J. K., MARTZ E. L., WELLS S. J., ENNIS C. C., HOLDER J., LEVCHUK J. W., AVIS K. E., HOFFMAN P. S., HITCHINS A. D., AND MADDEN J. M.** (1994) Ability of Laboratory Methods to Predict In-Use Efficacy of Antimicrobial Preservatives in an Experimental Cosmetic. *Applied And Environmental Microbiology*; 60(12):4553-4558.
91. **Fauchere J.L. et Avril J.L.** (2002) Bactériologie générale et médicale. *Editions Ellipses*.
92. **FAVET JOCELYNE, GRIFFITHS WILLIAM, HOLZNER GUNTHER, AMACKERS PAUL-A. et SCHORER ELISABETH.** (1987) Etude de l'association Kathon CG-Germall II dans des crèmes hydrophiles. *International Journal of Cosmetic Science*; 9:59-72.
93. **Flares M., Morillo M. and Crespo M. L.** (1997) Deterioration of Raw Materials and Cosmetic Products by Preservative Resistant Microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 40(2.4):57-100.
94. **FLAWN PHYLLIS C., MALCOLM S. A. and WOODROFFE R. C. S.** (1973) Assessment of the preservative capacity of shampoos. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 24:229-238.
95. **Flyvholm Mari-Ann and Andersen Poul.** (1993) Identification of Formaldehyde Releasers and Occurrence of Formaldehyde and Formaldehyde Releasers in Registered Chemical Products. *American Journal of Industrial Medicine*; 24: 533-552.
96. **Fraise Adam P.** (2004) Historical introduction. In: **Adam P. Fraise, Peter A. Lambert, Jean-Yves Maillard, Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization** 4<sup>th</sup> Edi. *Blackwell Publishing Ltd*; 3-7.



97. **Fraise Adam P., Lambert Peter A., Maillard Jean-Yves. (2004)** Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization 4<sup>th</sup> Edi. *Blackwell Publishing Ltd.*
98. **Fritsche Thomas R., Rhomberg Paul R., Sader Helio S. and Jones Ronald N. (2008)** Antimicrobial Activity of Omiganan Pentahydrochloride against Contemporary Fungal Pathogens Responsible for Catheter-Associated Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52(3):1187-1189.
99. **Frosch Peter J. and Swen Malte John. (2006)** Clinical Aspects of Irritant Contact Dermatitis. In : **Frosch Peter J., Menné Torkil, Lepoittevin Jean-Pierre.** Contact Dermatitis 4<sup>th</sup> Edi. *Springer*; 255-294.
100. **Gagliardi L. and Dorato S. (2007)** General Concepts. Current Legislation on Cosmetics in Different Countries. In: **Amparo Salvador and Alberto Chisvert.** Analysis of Cosmetic Products, *Elsevier B.V.*; 3-28.
101. **Gaze W. H., Abdoulsam N., Hawkey P. M., and Wellington E. M. H. (2005)** Incidence of Class I Integrons in a Quaternary Ammonium Compound-Polluted Environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 49(5):1802-1807.
102. **Geier Johannes, Lessmann Holger, Hellriegel Simin and Fuchs Thomas. (2008)** Positive patch test reactions to formaldehyde releasers indicating contact allergy to formaldehyde. *Contact Dermatitis*; 58: 175-177.
103. **Geis Philip A. (2006)** Appendix Common cosmetic preservatives Scott. In: **Philip A. Geis.** Cosmetic microbiology: a practical approach; 2nd ed. *Taylor & Francis Group*; 227-281.
104. **Geis Philip A. (2006)** Preservation strategies. In: **Philip A. Geis.** Cosmetic microbiology: a practical approach; 2nd ed. *Taylor & Francis Group*; 163-180.
105. **GEISE ROBERT J., MACHNICKI NANCY I. and IANNIELLO ROBERT M. (1994)** Determination of diazolidinyl urea in cosmetic formulations by capillary electrophoresis. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 45:173-181.
106. **Gilliland D., Li Wan Po A. and Scott E. (1992)** The bactericidal activity of a methyl and propyl parabens combination: isothermal and non-isothermal studies. *Journal of Applied Bacteriology*; 72:252-257.
107. **GIORDANO FERDINANDO, BETTINI RUGGERO, DONINI CRISTINA, GAZZANIGA ANDREA, CAIRA MINO R., ZHANG GEOFFREY G. Z., AND GRANT DAVID J. W. (1999)** Physical Properties of Parabens and Their Mixtures: Solubility in Water, Thermal Behavior, and Crystal Structures. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 88(11):1210-1216.
108. **Gorman Sean and Scott Eileen. (2004)** Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives. In: **Stephen Denyer, Norman A. Hodges, Sean P. Gorman.** Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology; 7<sup>th</sup> Edi; *Blackwell Science Ltd*; 285-305.
109. **Gough Michael, Hart Ronald, Karrh Bruce W., Koestner Adalbert, Neal Robert, Parkinson David, Perera Frederica, Powell Kenneth E. and Rosenkranz Herbert S. (1984)** Report on the consensus workshop on formaldehyde. *Environmental Health Perspectives*; 58:323-381.
110. **GRUVBERGER BIRGITTA and BRUZE MAGNUS. (1997)** Preservatives. *Clinics in Dermatology*; 15:493-497.
111. **Guin Jere D. (2007)** Contact Dermatitis and Other Contact Reactions. In: **P. Lieberman and J. A. Anderson.** Current Clinical Practice: Allergic Diseases: Diagnosis and Treatment, 3<sup>rd</sup> Edi. *Humana Press, Totowa, NJ*; 249-270.
112. **Halper Allen R., Milstein Stanley R., and Katz Linda M. (2006)** Regulatory Requirements for the Marketing of Cosmetics in the United States. In: **Marc P, André O, Howard I. M.** Handbook of Cosmetic Science and Technology, *Taylor & Francis Group, USA*; 833-859.
113. **Harrison Joe J., Turner Raymond J., Joo Daniel A., Stan Michelle A., Chan Catherine S., Allan Nick D., Vrionis Helen A., Olson Merle E., and Ceri Howard. (2008)** Copper and Quaternary Ammonium Cations Exert Synergistic Bactericidal and Antibiofilm Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*; 52(8): 2870-2881.
114. **Hectorne Kathleen J. and Fransway Anthony F. (1994)** Diazolidinyl urea: incidence of sensitivity, patterns of cross-reactivity and clinical relevance. *Contact Dermatitis*; 30: 16-19.
115. **HERBERT COURTNEY AND RIETSCHER ROBERT L. (2004)** Formaldehyde and formaldehyde releasers: How much avoidance of cross-reacting agents is required? *Contact Dermatitis*; 50: 371-373.
116. **Hiom Sarah J. (2004)** Preservation of medicines and cosmetics. In: **Adam P. Fraise, Peter A. Lambert, Jean-Yves Maillard.** Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization 4<sup>th</sup> Edi. *Blackwell Publishing Ltd*; 484-513.
117. **Huang Hsi-Ya, Lai Yu-Cheng, Chiu Chen-Wen and Yeh Jui-Ming. (2003)** Comparing micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of preservatives in pharmaceutical and cosmetic products. *Journal of Chromatography A*; 993:153-164.



118. **I.S.P., International Specialty Products. (2008)** Material Safety Data Sheet, feuille d'information sur la sécurité de GERMABEN® II-E 20003D.
119. **ISAKSSON MARLÈNE, GRUVBERGER BIRGITTA, GOON ANTHONY T.-J. AND BRUZE MAGNUS. (2006)** Can an imidazolidinyl urea-preserved corticosteroid cream be safely used in individuals hypersensitive to formaldehyde? *Contact Dermatitis*; 54: 29–34.
120. **JACOBS GENE, HENRY S. M., and COTTY V. F. (1975)** The Influence of pH, Emulsifier, and Accelerated Ageing upon Preservative Requirements of O/W Emulsions. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 26: 105-117.
121. **Jacobs M.-C., White I. R., Rycroft R. J. G. and Taub N. (1995)** Patch testing with preservatives at St John's from 1982 to 1993. *Contact Dermatitis*; 33:247-254.
122. **James M. W, Duncan A, Barbara E. B, and Vitthal K. (2005)** The Delivery Systems' Delivery System. In: **Meyer R. Rosen.** Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products. *William Andrew, USA*; 437–472.
123. **Janet C. Curry, Daniel K. Brannan, with Philip A. Geis. (2006)** History of cosmetic microbiology. In: **Philip A. Geis.** Cosmetic microbiology: a practical approach; 2nd ed. *Taylor & Francis Group*; 3-17.
124. **JEEN International Corporation. (1998)** MATERIAL SAFETY DATA SHEET of JEECIDU-14. - *MSDS* -, 1-4. Website: [www.jeen.com](http://www.jeen.com)
125. **Jennifer B. and Stephen H. (1998)** Regulatory Aspects of Cosmetic Claims Substantiation. In: **Aust, Louise B.** Cosmetic Claims Substantiation Cosmetic Science and Technology Series. *Marcel Dekker, INC. USA*; 18:1-21.
126. **JONG CHERNG T., STATHAM BARRY N., GREEN CATHY M., KING CODAGH M., GAWKRODGER DAVID J., SANSOM JANE E., ENGLISH JOHN S. C., WILKINSON S.MARK, ORMEROD ANTHONY D. AND CHOWDHURY MAHBUB M. U. (2007)** Contact sensitivity to preservatives in the UK, 2004–2005: results of multicentre study. *Contact Dermatitis*; 57: 165–168.
127. **Joseph A. Dunn, Robert A. Coburn, Richard T. Evans, and Robert J. Gencon, Kenneth A. Walters. (2008)** Novel Topically Active Antimicrobial and Anti-inflammatory Compounds for Acne. In : **Kenneth AW, Michael SR.** Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches. *Informa Healthcare USA*; 243-254.
128. **Journal Officiel de la République Algérienne N°4. (1997)** Les conditions et les modalités de fabrication, de conditionnement, d'importation, et de commercialisation sur le marché national des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle. Décret exécutif n° 97-37 ; 13-15.
129. **JPA 2004: Ateliers de l'Anaforcal. (2004)** Allergie et cosmétiques. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*; 44 :682–685.
130. **Kabara Jon J. and Orth Donald S. (1997)** Principles for Product Preservation. In: **John J. Kabara.** Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: principles and practice. *Marcel Dekker*; 1-14.
131. **Kang Mi-Sun, Oh Jong-Suk, Kang In-Chol, Hong Suk-Jin, and Choi Choong-Ho, (2008)**Inhibitory Effect of Methyl Gallate and Gallic Acid on Oral Bacteria. *The Journal of Microbiology*, 46 (6): 744-750.
132. **Kantor G.R., Taylor J.S., Ratz J.L. and Evey P.L. (1985)** Acute allergic contact dermatitis from diazolidinyl urea (Germall II) in a hair gel. *J Am Acad Dermatol*; 13: 116-119.
133. **Karabit Mufid Shamil, Juneskans Olaf T. and Lundgren Per. (1989)** Studies on the evaluation of preservative efficacy. IV. The determination of antimicrobial characteristics of some pharmaceutical compounds in aqueous solutions. *International Journal of Pharmaceutics*; 54: 51-56.
134. **KARLBERG ANN-THERESE, SKARE LIZBET, LINDBERG INGRID AND NYHAMMAR EVA. (1998)** A method for quantification of formaldehyde in the presence of formaldehyde donors in skin-care Products. *Contact Dermatitis*; 38:20–28.
135. **Kazama Hitoshi, Hamashima Hajime, Sasatsu Masanori, Arai Taketoshi. (1998)** Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEvI* in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*; 165:295-299.
136. **Kazama Hitoshi, Hamashima Hajime, Sasatsu Masanori, Arai Taketoshi. (1998)** Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacEvI* in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*; 159:173-178.
137. **Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme S. and Choi A.H. (2009)** PAN Pesticide Database: Cetyl trimethyl ammonium bromide. *Pesticide Action Network, North America*.
138. **KLEPSE MICHAEL E., ERNST ERIKA J., LEWIS RUSSELL E., ERNST MICHAEL E. AND PFALLER MICHAEL A. (1998)** Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 42(5):1207–1212.



139. **Kränke Birger, Szolar-Platzer Christiane and Aberer Werner. (1996)** Reactions to formaldehyde and formaldehyde releasers in a standard series. *Contact Dermatitis*; 35: 192-193.
140. **Kücken Detmar, Feucht Heinz-Hubert and Paul-Michael Kaulfers. (2000)** Association of qacE and qac $\Delta$ I with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*; 183:95-98.
141. **KÜMMERLE NICOLE, FEUCHT HEINZ-HUBERT, AND KAULFERS PAUL-MICHAEL. (1996)** Plasmid-Mediated Formaldehyde Resistance in *Escherichia coli*: Characterization of Resistance Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 40(10): 2276–2279.
142. **Kunicka-Styczyńska A., Sikora M. and Kalembe D. (2009)** Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology*; 1-9.
143. **Lambert Peter A. (2004)** Bacterial resistance "Resistance of bacterial spores to chemical agents". In: **Adam P. Fraise, Peter A. Lambert, Jean-Yves Maillard.** Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization 4<sup>th</sup> Edi. *Blackwell Publishing Ltd*; 184-190.
144. **Lambert Peter A. (2004)** Mechanisms of action of biocides. In: **Adam P. Fraise, Peter A. Lambert, Jean-Yves Maillard.** Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization 4<sup>th</sup> Edi. *Blackwell Publishing Ltd*; 139-153.
145. **LARRY E. MILLIKAN. (2001)** Cosmetology, Cosmetics, Cosmeceuticals: Definitions and Regulations. *Clinics in Dermatology*; 19:371–374.
146. **Larsen et al. (1991)** A primer on cosmetics. *Journal of the American Academy of Dermatology*; 469-484.
147. **Lass-Flörl Cornelia, Mayr Astrid, Perkhofer Susanne, Hinterberger Guido, Hausdorfer Johann, Speth Cornelia, and Fille Manfred. (2008)** Activities of Antifungal Agents against Yeasts and Filamentous Fungi: Assessment according to the Methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52 (10):3637–3641.
148. **LEE EUNYOUNG, AN SUSUN, CHOI DONGWON, MOON SEONGJOON AND CHANG IHSEOP. (2007)** Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives. *Contact Dermatitis*; 56: 131–136.
149. **Lehmann Søren Vig, Hoeck U., Breinholdt J. and Olsen C.E. (2004)** New characterization and chemistry of Germall 115 and Germall II. *New drugs & diagnostics*; (Résumé).
150. **LEHMANN SØREN VIG, HOECK ULLA, BREINHOLDT JENS, OLSEN CARL ERIK AND KREILGAARD BO. (2006)** Characterization and chemistry of Imidazolidinyl urea and diazolidinyl urea. *Contact Dermatitis*; 54: 50–58.
151. **Lemini C., Hernández A., Jaimez R., Franco Y., Avila M.E. and Castell A. (2004)** Morphometric analysis of mice uteri treated with the preservatives methyl, ethyl, propyl, and butylparaben. *Toxicology and Industrial Health*; 20: 123 -132.
152. **Li Xueming, Tang Libin, Liu Hongcheng, Mu Guannan and Liu Guangheng. (2008)** Influence of halide ions on inhibitive performance of cetyl trimethyl ammonium bromide in various concentrations of phosphoric acid for cold rolled steel. *Materials Letters*; 62:2321–2324.
153. **LINTNER K. and GENET V. (1998)** A physical method for preservation of cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*; 20: 103–115.
154. **LLABRES CARLOS M. AND AHEARN DONALD G. (1985)** Antimicrobial Activities of N-Chloramines and Diazolidinyl Urea. *Applied and Environmental Microbiology*; Feb: 370-373.
155. **Lodén Marie. (2005)** Moisturizers. In: **Peter Elsner, Howard I. Maibach.** Cosmeceuticals and active cosmetics: drugs versus cosmetics 2nd ed. *Taylor & Francis Group*; 219-246
156. **Lodén Marie. (2006)** Hydrating Substances. In: **Marc P, André O, Howard I. M.** Handbook of Cosmetic Science and Technology. *Taylor & Francis Group, USA*; 265-280.
157. **LUNDOV MICHAEL DYRGAARD, MOESBY LISE, ZACHARIAE CLAUS and JOHANSEN JEANNE DUUS. (2009)** Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*; 60: 70-78.
158. **Maccioni A. M., Anchisi C., Sanna A., Sardu C. and Dessi S. (2002)** Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*; 24:53-59.
159. **Maillard Jean-Yves. (2004)** Antifungal activity of disinfectants "Antifungal activity of biocides". In: **Adam P. Fraise, Peter A. Lambert, Jean-Yves Maillard.** Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization 4<sup>th</sup> Edi. *Blackwell Publishing Ltd*; 205-219.
160. **Maillard Jean-Yves. (2004)** Viricidal activity of biocides. In: **Adam P. Fraise, Peter A. Lambert, Jean-Yves Maillard.** Russell, Hugo &



- Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization 4<sup>th</sup> Edi. *Blackwell Publishing Ltd*; 272-323.
161. **Majoros L., Kardos G., Szabo B. and Sipiczki M. (2005)** Caspofungin susceptibility testing of *Candida inconspicua*: correlation of different methods with the minimal fungicidal concentration (MFC). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 49(8): 3486-3488.
162. **MANCHEE RICHARD J., BROSTER MALCOLM G., STAGG ANTHONY J. AND HIBBS STEPHEN E. (1994)** Formaldehyde Solution Effectively Inactivates Spores of *Bacillus anthracis* on the Scottish Island of Gruinard. *Applied and Environmental Microbiology*; Nov:4167-4171.
163. **Maouad Michele, Fleischer Alan B., Sherertz Elizabeth E., and Feldman Steven R. (1999)** Significance-prevalence index number: A reinterpretation and enhancement of data from the North American Contact Dermatitis Group. *J. Am. Acad. Dermatol*; 41(4): 573-576.
164. **Martini M.-C. (2006)** « Excipients » en cosmétologie, *Elsevier Masson SAS, Cosmétologie et Dermatologie esthétique*; 50-120-B-10.
165. **Martini M.-C. (2006)** Conservateurs. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Cosmétologie et Dermatologie esthétique*, 50-120-D-10.
166. **Martini M.-C. (2006)** Tensioactifs. *Elsevier Masson SAS, Cosmétologie et Dermatologie esthétique*; 50-120-C-10.
167. **Masuda Mitsuteru and Harada Fusae. (2006)** Legislation in Japan. In: **Marc P, André O, Howard I. M.** Handbook of Cosmetic Science and Technology. *Taylor & Francis Group, USA*; 861-868.
168. **McBain Andrew J., Ledder Ruth G., Moore Louise E., Catrenich Carl E., and Gilbert Peter. (2004)** Effects of Quaternary-Ammonium-Based Formulations on Bacterial Community Dynamics and Antimicrobial Susceptibility. *Applied And Environmental Microbiology*, June: 3449–3456.
169. **McDONNELL GERALD AND RUSSELL A. DENVER. (1999)** Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*; 12(1): 147-179.
170. **MENNE' AND SOMMER J. (2001)** Standardization of the TRUE Test Imidazolidinyl urea and diazolidinyl urea patches. *Contact Dermatitis*; 45:21–25.
171. **Michael S.R, Kenneth A.W. (2008)** Skin Structure, Pharmaceuticals, Cosmetics, and the Efficacy of Topically Applied Agents. In: **Kenneth AW, Michael SR.** Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches. *Informa Healthcare USA*; 1-2.
172. **MILCENT René. (2007)** Chimie Organique, Stéréochimie, entités réactives et réactions. *EDP Sciences*. 536-537.
173. **Millard Jeffrey W., Alvarez-Núñez F.A. and Yalkowsky S.H. (2002)** Solubilization by cosolvents Establishing useful constants for the log<sub>10</sub> linear model. *International Journal of Pharmaceutics*; 245:153-166.
174. **Milne George W. A. (2005)** Gardner's Commercially Important Chemicals: Synonyms, Tradenames, and Properties. *John Wiley & Sons*.
175. **Miloudi Yousra. (2007)** Femme magazine : Le marché de l'esthétique en Algérie. *Le Soir d'Algérie*; <http://www.lesoirdalgerie.com/articles/2007/03/26/article.php?sid=51390&cid=7>
176. **Milstein Stanley R., Halper Allen R., and Katz Linda M. (2006)** Definition of Cosmetics. In: **Marc P, André O, Howard I. M.** Handbook of Cosmetic Science and Technology, *Taylor & Francis Group, USA*; 815-831.
177. **Mitsui Takeo. (1993)** Preservation of cosmetics. In: **Takeo Mitsui.** New Cosmetic Science. *Nanzando Co., Japon*; 199-208.
178. **Mizuba S. and Sheikh W. (1987)** Antimicrobial efficacy of potassium salts of four parabens. *Journal of Industrial Microbiology*; 1:363-369.
179. **Monika, Siddique Wequar A., Dubey Arwind. (2005)** Inhibiting Effect of N-Cetyl N,N,N-Trimethyl Ammonium Bromide on Corrosion of Mild Steel in Acidic Medium. *Portugaliae Electrochimica Acta*; 23:445-455.
180. **Moore Suzanne L. and Payne David N. (2004)** Types of antimicrobial agents. In: **Adam P. Fraise, Peter A. Lambert, Jean-Yves Maillard.** Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization 4<sup>th</sup> Edi. *Blackwell Publishing Ltd*; 8-97.
181. **N.Z.D.S.I., New Zealand Dermatological Society Incorporated. (2007)** Imidazolidinyl urea contact allergy. *DermNet NZ*. (<http://www.dermnetnz.org/dermatitis/imidazolidinylurea-allergy.html>)
182. **NEELY W. BROCK. (1963)** Action of formaldehyde on microorganisms, I. Correlation of activity with formaldehyde metabolism. *J. Bacteriol*; 85:1028-1031.
183. **NEELY W. BROCK. (1963)** Action of formaldehyde on microorganisms, III. bactericidal action of sublethal concentrations of formaldehyde on *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol*; 86:445-448.



184. **NEJJAH Fatima, OUHSSINE Mohammed, SRHIRI Abdou Allah, EL YACHIOUI Mohammed, HAJJAJI Najat. (2006)** ACTIVITÉ INHIBITRICE DE LA N-HEXADÉCYLBÉTAÏNE SUR *Staphylococcus aureus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*; 145:85-90.
185. **Neves Eva Raquel, Schäfer Stephan, Phillips Alan, Canejo João, Macedo Maria Filomena. (2008)** Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 1-6.
186. **Nguyen Thom, Clare Brian, Guo Wei and Martinac Boris. (2005)** The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*. *Eur Biophys J*; 34: 389-395.
187. **Nicoletti G., Boghossian V., Gurevitch F., Borland R. and Morgenroth P. (1993)** The antimicrobial activity in v&o of chlorhexidine, a mixture of isothiazolinones ('Kathon' CC) and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). *Journal of Hospital Infection*; 23:87-111.
188. **Nostro A., Cannatelli M.A., Morelli I., Cioni P.L., Bader A. Marino A. and Alonzo V. (2002)** Preservative properties of Calamintha officinalis essential oil with and without EDTA. *Letters in Applied Microbiology*; 35:385-389.
189. **O'BRIEN T J. (1987)** Imidazolidinyl Urea (Germall 115) Causing Cosmetic Dermatitis. *Aust. J. Derm.*; 28:36-37.
190. **O'NEILL JOHN J. and MEAD CATHERINE A. (1982)** The parabens: Bacterial adaptation and preservative capacity. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 33: 75-84.
191. **ORTH D. S. (1979)** Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 30:321-332.
192. **ORTH D. S. and ECK K. S. (2005)** Use of triphenyltetrazolium chloride in preservative efficacy testing. *J. Cosmet. Sci.*, 56: 167-174.
193. **ORTH D. S. and ENIGL D. C. (1993)** Preservative efficacy testing by a rapid screening method for estimation of D-values. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 44: 329-336.
194. **ORTH D. S., ANDERSON C. M. LUTES, SMITH D. K., and MILSTEIN S. R. (1989)** Synergism of preservative system components: Use of the survival curve slope method to demonstrate anti-Pseudomonas synergy of methyl paraben and acrylic acid homopolymer/copolymers in vitro. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 40:347-365.
195. **ORTH D. S., LUTES C. M., and SMITH D. K. (1989)** Effect of culture conditions and method of inoculum preparation on the kinetics of bacterial death during preservative efficacy testing. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 40:193-204.
196. **ORTH D. S., LUTES C. M., MILSTEIN S. R., and ALLINGER J. J. (1987)** Determination of shampoo preservative stability and apparent activation energies by the linear regression method of preservative efficacy testing. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 38:307-319.
197. **ORTH D.S. (1980)** Establishing cosmetic preservative efficacy by use of D-values. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 31:165-172.
198. **PATEL NAGIN K. and ROMANOWSKI JOYCE M. (1970)** Heterogeneous Systems II: Influence of Partitioning and Molecular Interactions on In Vitro Biologic Activity of Preservatives in Emulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 59(3):372-376.
199. **Peña-García-Brioles D., Gonzalo-Lumbreras R., Izquierdo-Hornillos R., Santos-Montes A. (2004)** Method development for betamethasone and dexamethasone by micellar liquid chromatography using cetyl trimethyl ammonium bromide and validation in tablets Application to cocktails. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 36:65-71.
200. **Perret C. M. and Happle R. (1989)** Contact sensitivity to diazolidinyl urea (Germall II). *Arch Dermatol Res*; 281: 57- 59.
201. **Perrenoud D., Bircher A., Hunziker T., Suter H., Bruckner-Tuderman L., Stäger J., Thürlimann W., Schmid P., Suard A. and Hunziker N. (1994)** Frequency of sensitization to 13 common preservatives in Switzerland. *Contact Dermatitis*; 30: 276-279.
202. **Perret C. M. and Happle R. (1989)** Contact sensitivity to diazolidinyl urea (Germall II). *Arch Dermatol Res*; 281: 57- 59.
203. **Pertsev I. M., Khokhlova L. N., and Dmitrievskii D. I. (1984)** Dependence Of Antimicrobial Activity Of Chemical Preservatives In Suspensions On Certain Pharmaceutical Factors. *Khimiko-farmatsevticheskii Zhurnal*; 18(9):1110-1113.
204. **Pfuhler Stefan and Wolf Hans Uwe. (2002)** Effects of the formaldehyde releasing preservatives dimethylol urea and diazolidinyl urea in several short-term genotoxicity tests. *Mutation Research*; 514:133-146.
205. **PHAM DUC T. L., PAPACONSTANTIN E. and ETIENNE J. J. (1983)** Concentrated solutions of preservatives: their technological and analytical advantages in cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*; 5:29-38.



206. **Pokhriyal Naveen K., Joshi Jayant V., Goyal Prem S. (2003)** Viscoelastic behaviour of cetyl trimethyl ammonium bromide/sodium salicylate/water system: Effect of solubilisation of different polarity oils. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*; 218:201-212.
207. **Polati S., Gosetti F. and Gennaro M.C. (2007)** Preservatives in Cosmetics. Analytical Methods (Preservatives in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods). In: **Amparo Salvador and Alberto Chisvert**. Analysis of Cosmetic Products, *Elsevier B.V.*; 211-241.
208. **POLTRONIERI A., PRIVITERA S. and SALVI A. (1985)** Method for determination of the microbiological assay of imidazolidinyl urea. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 36:313-318.
209. **Poole Keith. (2004)** Bacterial resistance "Acquired resistance". In: **Adam P. Fraise, Peter A. Lambert, Jean-Yves Maillard**. Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization 4<sup>th</sup> Edi. *Blackwell Publishing Ltd*; 170-183.
210. **Prescott, Harley et Klein (1995)**. Microbiologie. *De Boek-Wesmael. S.A.*, p.1014.
211. **PRESTON A.F. (1983)** Dialkyldimethylammonium Halides as Wood Preservatives. *JAOCS*; 60 (3).
212. **Prevot A. Bianco, Pramauro E., Gallarate M., Carlotti M.E., Orio G. (2000)** Determination of micelle/water partition coefficients of cosmetic preservatives; Optimisation of the capillary electrophoretic method. *Analytica Chimica Acta*; 412:141-148.
213. **PRICKETT P. S., MURRAY H. L., and MERCER N. H. (1961)** Potentiation of Preservatives (Parabens) in Pharmaceutical Formulations by Low Concentrations of Propylene Glycol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 50(4):316-320.
214. **Prieto-Blanco M.C., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S. and Prada Rodríguez D. (2007)** Surfactants in Cosmetics. Analytical Methods. In: **Amparo Salvador and Alberto Chisvert**. Analysis of Cosmetic Products. *Elsevier B.V.*; 291-322.
215. **PubChem Public Chemical. (2009)** imidazolidinyl urea. Database <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=24895984>.
216. **Qaiyumi Sadaf. (2007)** Macro- and Microdilution Methods of Antimicrobial Susceptibility Testing. In: **Richard Schwalbe, Lynn Steele-Moore, and Avery C. Goodwin**. Antimicrobial susceptibility testing protocols. *Taylor & Francis Group*; 75-79.
217. **Ramesh Babu B., Parande A.K., and Ramasamy P.L. (2006)** Effect of N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide and orthophenylenediamine on the corrosion inhibition of carbon steel in 1 mol/L HCl. *Can. J. Chem*; 84: 1658-1666.
218. **Ravita Timothy D., Tanner Ralph S., Ahearn Donald G., Arms Erin L. and Crockett Patrick W. (2009)** Post-consumer use efficacies of preservatives in personal care and topical drug products: relationship to preservative category. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 36:35-38.
219. **REX JOHN H., PFALLER MICHAEL A., RINALDI MICHAEL G., POLAK ANAMARIE AND GALGIANI JOHN N. (1993)** Antifungal Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*; 6(4):367-381.
220. **RIVERO RENE THOMAS and TOPIWALA VINOD. (2004)** Quantitative determination of formaldehyde in cosmetics using combined headspace-solid-phase microextraction gas chromatography. *J. Cosmet. Sci.*; 55:343-350.
221. **Rogiers V and Pauwels M. (2008)** Safety Assessment of Cosmetics in Europe. *Curr Probl Dermatol*; 36:1-28
222. **Romanowski Perry and Schueller Randy. (2003)** Definition and Principles of Multifunctional Cosmetics. In: **Randy Schueller and Perry Romanowski**. Multifunctional Cosmetics. *Marcel Dekker*; 1-11.
223. **ROSEN MARVIN and McFARLAND ANDREW G. (1984)** Free formaldehyde in anionic shampoos. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 35:157-169.
224. **Ross Gilbert. (2006)** A Perspective on the Safety of Cosmetic Products: A Position Paper of The American Council on Science and Health. *International Journal of Toxicology*; 25:269-277.
225. **Roy Durba, Karmakar Rana, Mondal Sudip Kumar, Sahu Kalyanasis and Bhattacharyya Kankan. (2004)** Excited state proton transfer from pyranine to acetate in a CTAB micelle. *Chemical Physics Letters*; 399:147-151.
226. **Russell A. D. (1983)** Mechanisms of action of chemical sporicidal and sporistatic agents. *International Journal of Pharmaceutics*. 16:127-140.
227. **Russell A. D. (1995)** Mechanisms of Bacterial Resistance to Biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 247-265.
228. **Russell A. D. (1998)** Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital infection*; 43 (Supplement): S57-S68.



229. **Russell A. D. (2003)** Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis*; 3: 794–803.
230. **RYDER D. S. (1974)** The thin layer chromatographic detection and determination of an imidazolidinyl urea antimicrobial preservative. *J. Soc. Cosmet. Chem.*; 25: 535-544.
231. **S.C.P. Société canadienne de pédiatrie. (2006)** Les produits antimicrobiens à domicile : Le problème de l'antibiorésistance. *Paediatr Child Health*; 11(3):177-182.
232. **Saini Mohini, Nagpaul J. P. and Amma M. K. P. (1993)** Effect of Propane-1,2-diol Ingestion on Carbohydrate Metabolism in Female Rat Erythrocytes. *Journal of Applied Toxicology*; 13(1):69-75.
233. **Santos P., Machado M., Watkinson A.C., Hadgraft J., Lane M.E. (2009)** The effect of drug concentration on solvent activity in silicone membranes. *International Journal of Pharmaceutics*; 377:70–75.
234. **SASSEVILLE DENIS. (2004)** Hypersensitivity to preservatives. *Dermatologic Therapy*; 17:251–263.
235. **SCALZO M., CERRETOU F., ORLANDI C. and SIMONETTI N. (1997)** Utilization of electrochemical silver ions as preservative agent in cosmetic dispersions. *International Journal of Cosmetic Science*; 19: 27-35.
236. **SCCNFP. THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. (2002)** A clarification on the formaldehyde and para-formaldehyde entry in directive 76/768/EEC on cosmetic products. SCCNFP/587/02.
237. **SCCNFP. THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. (2002)** The determination of certain formaldehyde releasers in cosmetic. SCCNFP/586/02.
238. **SCHNUCH A., GEIER J., UTER W. AND FROSCH P.J. (1998)** Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicentre study. *British Journal of Dermatology*; 138: 467–476.
239. **Sedlewicz Linda B. (2005)** Cosmetic Preservatives: Friend or Foe? *Dermatology for the Clinician*; March-April: 98-100.
240. **Sekiguchi Jun-ichiro, Hama Toshio, Fujino Tomoko, Araake Minako, Irie Atsushi, Saruta Katsutoshi, Konosaki Hisami, Nishimura Haruo, Kawana Akihiko, Kudo Koichiro, Kondo Tatsuya, Sasazuki Takehiko, Kuratsuji Tadatashi, Yoshikura Hiroshi and Kirikae Teruo. (2004)** Detection of the Antiseptic- and Disinfectant-Resistant Genes *qacA*, *qacB*, and *qacC* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in a Tokyo Hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57:288-291.
241. **Selvaraju Suresh B., Khan Izhar U. H., and Yadav Jagjit S. (2005)** Biocidal Activity of Formaldehyde and Nonformaldehyde Biocides toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in Pure and Mixed Suspensions in Synthetic Metalworking Fluid and Saline. *Applied and Environmental Microbiology*; 71(1):542–546.
242. **Simonenko L. S., Korsakova I. S., and Dudina Z. A. (1979)** Preservative properties of oil emulsions. *Plenum Publishing Corporation*; 10: 45-47.
243. **Singleton Paul and Sainsbury Diana. (2006)** Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Third Edition. *John Wiley & Sons Ltd.*
244. **Siquet Françoise and Devleeschouwer Michel J. (2006)** Antibacterial Agents and Preservatives. In: **Marc P, André O, Howard I. M.** Handbook of Cosmetic Science and Technology. *Taylor & Francis Group, USA*; 223-231.
245. **Smith C.N. and Alexander B.R. (2005)** The relative cytotoxicity of personal care preservative systems in Balb/C 3T3 clone A31 embryonic mouse cells and the effect of selected preservative systems upon the toxicity of a standard rinse-off formulation. *Toxicology in Vitro*; 19:963–969.
246. **Smith Karen, Gemmell Curtis G. and Hunter Iain S. (2007)** The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; November 2:1-7.
247. **Société Française de Microbiologie. (2008)** Comité De L'antibiogramme De La Société Française De Microbiologie, *Recommandations 2008*.
248. **Sondossi M., Riha V. F., Rossmore H. W. and Sylvestre M. (1993)** Factors Involved in Bactericidal Activities of Formaldehyde and Formaldehyde Condensate/ Isothiazolone Mixtures. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 32:243-261.
249. **Sondossi M., Rossmore H. W. and Williams R. (1989)** Relative Formaldehyde Resistance Among Bacterial Survivors of Biocide-Treated Metalworking Fluid. *International Biodeterioration*; 25: 423-437.
250. **Soni M. G., Burdock G. A., Taylor S. L. and Greenberg N. A. (2001)** Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemistry Toxicology*; 39:513-532.

# Annexes

**Milieux de culture****Bouillon Nutritif (BN, Fluka) :**Formule (en g/l)

Peptone	15,0
Extrait de levure	3,0
Chlorure de sodium	6,0
Glucose	1,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 7,5 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 25g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

**Gélose Nutritive (GN, Fluka) :**Formule (en g/l)

Peptone	15,0
Extrait de levure	3,0
Chlorure de sodium	6,0
Glucose	1,0
Agar	15,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 7,5 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 40g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

**Bouillon Sabouraud :**Formule (en g/l)

Peptone (Fluka)	10,0
Extrait de levure (Fluka)	3,0
Glucose (Sigma-Aldrich)	20,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 5,8 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

**Gélose Sabouraud :**Formule (en g/l)

Peptone (Fluka)	10,0
Extrait de levure (Fluka)	3,0
Glucose (Sigma-Aldrich)	20,0
Agar	15,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 5,8 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.



**Bouillon Mueller Hinton (BMH, Fluka) :**Formule (en g/l)

Infusion de viande de bœuf	2,0
Hydrolysate de caseine	17,5
Amidon	1,5
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 7,4 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 23 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

**Gélose Mueller Hinton (GMH, Fluka) :**Formule (en g/l)

Infusion de viande de bœuf	4,0
Hydrolysate de caseine	17,5
Amidon	1,5
Agar	15,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 7,5 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 38g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

**Bouillon au cœur cerveau : (BHIB, INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE)**Formule (en g/l)

Extrait de cerveau	7,8
Extrait de cœur	9,7
Peptone	10,0
Chlorure de sodium	5,0
di-sodium Phosphate	2,5
Dextrose	2,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 7,4 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 37g de la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

**Milieu RPMI-1640 « Roswell Park Memorial Institut:**

<u>Formule (en g/l)</u>	
L -Arginine (free base)	0,200
L-Asparagine	0,050
L-Aspartic acid	0,020
L-Cystine. 2HCl	0,0652
L-Glutamic acid	0,300
Glycine	0,010
L-Histidine (free base)	0,015
L-Hydroxypropoline	0,020
L-Isoleucine	0,050
L-Leucine	0,050
L-Lysine. HCl	0,040
L-Methionine	0,015
L-Phenylalanine	0,015
L-Proline	0,020
L-Serine	0,030
L-Threonine	0,020
L-Tryptophan	0,005
L-Tyrosine. 2Na	0,02883
L-Valine	0,020
Biotin	0,0002
D-Pantothenic acid	0,00025
Choline chloride	0,003
Folic acid	0,001
Myoinositol	0,035
Niacinamide	0,001
Para amino benzoic acid	0,001
Pyridoxine HCl	0,001
Riboflavin	0,0002
Thiamine HCl	0,001
Vitamin B <sub>12</sub>	0,000005
Calcium nitrate H <sub>2</sub> O	0,100
Potassium chloride	0,400
Magnesium sulfate (anhydrous)	0,04884
Sodium chloride	6,000
Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	0,800
D-Glucose	2,000
Glutathione, reduced	0,001
Phenol red, Na	0,0053
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 7,0 à 25°C

Suspendre 16,4 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min

## ملخص

إن مواد التجميل معرضة بكل سهولة للتلوث الميكروبي والذي يتم تجنبه بإضافة بعض المركبات الكيميائية التي يوصف عليها بالمحافظات. يتمثل دور هذه الأخيرة في تثبيط نمو الميكروبات البكتيرية والفطرية. لكن بالموازاة تشكل هذه المحافظات بتراكيز معينة خطراً على صحة المستهلك نظراً لفعاليتها وسميتها الكيميائية. إذن نرسم من عسنا هذا إلى تحديد التراكيز الفعالة ضد الميكروبات لكل من المحافظات: Imidazolidinyl urée (IU)، Diazolidinyl urée (DU)، Germaben II®، bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA)، وبالموازاة دراسة سمية ميمتها الخلوية اتجاه كريات الدم الحمراء.

فيما يخص دراسة الفعالية ضد الميكروبات تم اختيار كل من *Candida albicans* ATCC10231 والتي تصنف ضمن الفطريات، وكل من السلالات البكتيرية التالية: *Escherichia coli* ATCC25922، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853، *Staphylococcus aureus* ATCC25923. تمثل هذه السلالات الأربع أهم الميكروبات المسؤولة في تلوث مواد التجميل. أما فيما يخص الطرق والتقنيات المستعملة في تحديد هذه الفعالية فقد كانت بداية بتقنية الانتشار بالأفراص على الأوساط الغذائية الصلبة، ثم باستعمال تقنية النمو في الأوساط السائلة لتحديد التراكيز الأدنى للتثبيط (CMI) والتراكيز الأدنى للقاتل للميكروبيا (CMB) و الفطريات (CMF) (« Clinical and Laboratory Standards Institute « CLSI »).

لقد بُدَّت النتائج للحصول عليها أن أعلى تركيز أدنى قاتل للميكروبات لكل من IU، DU، GB و BCTA هي على الترتيب 25، 3، 125، 25 و 12,5 مع/مل. وللملاحظة أن هذه التراكيز حرصت كريات الدم الحمراء على تحرير الهيموغلوبين الخلوي بنسب تقدر بـ: 36%، 75%، 66% و 15,5% على الترتيب.

بمقارنة هذه النتائج مع التراكيز المسموح استعمالها في مواد التجميل من قبل المنظمات الأوروبية، الأمريكية واليابانية، نستطيع القول أن المواد التي تحتوي على 6 مع/مل من IU و 10 مع/مل من GB تبقى معرضة لتلوث بالميكروبات الفطرية. بينما المركب DU لتواحد بتركيز 5 مع/مل في مواد التجميل يمثل تحفظاً جيداً لهذه المواد ضد التلوثات الميكروبية، إلا أنه يشكل في الوقت نفسه سمية كيميائية حادة تجاه كريات الدم الحمراء. أما المركب BCTA فهو مستعمل بتراكيز (1 مع/مل) قادرة على حماية مواد التجميل من التلوثات الميكروبية.

الكلمات المفتاحية: حافظ، تجميل، فعالية ضد ميكروبية، سمية خلوية.

## Résumé

Les produits cosmétiques sont exposés facilement aux contaminations microbiennes. Dans le but de palier à ce phénomène qui pose un réel problème, ces produits sont supplémentés de conservateurs chimiques qui ont pour rôle principal, l'inhibition de la croissance des microorganismes. Malheureusement, ces conservateurs sont à l'origine de phénomènes toxiques très sévères, c'est pourquoi, nous avons entrepris cette étude qui consiste à évaluer l'activité antimicrobienne (antifongique et antibactérienne) de quatre conservateurs Imidazolidinyl urée (IU), Diazolidinyl urée (DU), Germaben II® et bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammonium (BCTA); et à étudier la cytotoxicité de ces conservateurs vis-à-vis du globule rouge humain.

Pour ce faire, nous avons testé une souche de levure type *Candida albicans* ATCC10231. Des souches de bactéries ont été également testées, il s'agit de *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Ces souches représentent les principaux contaminants des produits cosmétiques.

Pour l'évaluation de l'activité de ces conservateurs vis-à-vis des souches sélectionnées, nous avons utilisé la méthode de diffusion de disques en milieu solide et la croissance en milieu liquide pour la détermination de la CMI et la CMB (CMF) (Clinical and Laboratory Standards Institute « CLSI »).

Les résultats obtenus ont montré que la concentration minimale microbicide (bactéricide et fongicide) la plus élevée de IU, DU, GB et de BCTA est de l'ordre de 25; 3, 125; 25 et 12,5 mg/ml, respectivement. Ces concentrations induisent une libération de l'hémoglobine des globules rouges par des taux de : 36%, 75%, 66% et 15,5%, respectivement.

En comparant nos résultats avec les concentrations autorisées des conservateurs dans les produits cosmétiques par les réglementations : Européenne, Américaine et Japonaise; nous pouvons dire que ces produits qui contiennent une concentration en IU de 6 mg/ml (UE) et en GB de 10 mg/ml sont en risque de contamination fongique. Cependant, le DU présent dans ces produits à une dose de 5 mg/ml (UE) exerce une meilleure inhibition microbienne avec une cytotoxicité massive vis-à-vis des globules rouges. Le BCTA est utilisé à des concentrations (1 mg/ml) capables de prévenir les produits cosmétiques contre la contamination microbienne.

**Mots clés :** conservateur, cosmétique, activité antimicrobienne, cytotoxicité.

## Abstract

The cosmetic products are easily exposed with the microbial contaminations. With an aim of stage to this phenomenon which poses a real problem, these products are supplemented chemical preservatives that have as a main role, the inhibition of the growth of the micro-organisms. Unfortunately, these preservatives are at the origin of very severe toxic phenomena, this is why, we undertook this study which consists in evaluating the antimicrobial activity (antifungal and antibacterial) of four preservatives: Imidazolidinyl urea (IU) and Diazolidinyl urea (DU), Germaben II® and of N-cetyl-N, N, N-trimethylammonium bromide (BCTA); and to study the cytotoxicity of these preservatives with against to the human erythrocyte.

With this intention, we tested a standard yeast stock *Candida albicans* ATCC10231. Strains of bacterium were also tested; it acts of *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC25923. These strains represent the principal contaminants of the cosmetic products.

For the evaluation of the activity of these preservatives against the selected strains, we used the method of Disk Diffusion in solid medium and the growth in liquid medium for the determination of the MIC and MBC (MFC) (Clinical and Standard Laboratory Institute "CLSI").

The results obtained showed that the highest minimum microbicidal concentration (bactericidal and fungicidal) of IU, DU, GB and BCTA is about: 25; 3, 125; 25 and 12,5 mg/ml, respectively. These concentrations induce a release of the hemoglobin of the erythrocytes by rates of: 36%, 75%, 66% and 15,5%, respectively.

By comparing our results with the authorized concentrations of the preservatives in the cosmetic products by the European, American and Japanese regulations; we can say that these products which contain a concentration in IU of 6 mg/ml (EU) and in GB of 10 mg/ml are in risk of fungi contamination. However, the DU present in these products with an amount of 5 mg/ml (EU) exerts a better microbial inhibition with a massive cytotoxicity against the erythrocytes. The BCTA is used with concentrations (1 mg/ml) able to prevent the cosmetic products against the microbial contamination.

**Key words:** preservative, cosmetic, antimicrobial activity, cytotoxicity.