

## Evaluation de l'efficacité de la conservation antimicrobienne d'une préparation pharmaceutique par l'huile essentielle de *thymus satureioides* C.

Kamal OULED TAARABT<sup>1,2\*</sup>, Tayeb KOUSSA<sup>1</sup> et Mohamed NAJIB ALFEDDY<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université Chouaib Doukkali, Faculté des Sciences d'El Jadida, Département de Biologie, Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales, Ecologie et Valorisation des Ecosystèmes, El Jadida, Maroc

<sup>2</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, Centre Régional de la Recherche Agronomique de Marrakech, Unité de Recherche Protection des plantes, Laboratoire de Phyto-Bactériologie, Marrakech, Maroc

(Reçu le 24 Février 2021 ; Accepté le 13 Avril 2021)

\* Correspondance, courriel : [contact.taarabtkamal@gmail.com](mailto:contact.taarabtkamal@gmail.com)

### Résumé

Ce travail a pour objectif l'évaluation de la protection antimicrobienne d'une solution pour bain de bouche, utilisant l'huile essentielle d'une plante spontanée de la flore Marocaine, *thymus satureioides* C., comme conservateur antimicrobien. La formule du bain de bouche avait un haut risque microbiologique et seule l'HE de *thymus satureioides* C. a été utilisée comme agent conservateur antimicrobien à raison de 0,1 %. L'essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne a été conduit selon les recommandations de la pharmacopée européenne, alors que le protocole de la démonstration de l'efficacité du milieu neutralisant a été réalisé selon la norme ISO 11930:2019. Cinq souches microbiennes référencées ont été utilisées au cours de ces essais à savoir : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 43300, *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 11775, *Candida albicans* L11 et *Aspergillus niger* M100. Les résultats ont montré que la règle [ $N_{vt} \geq 0,5N_{vn}$  et  $N_{vn}$  est proche de  $N_v$ ] a été respectée et que par conséquent l'efficacité du milieu neutralisant a été confirmée. Les résultats du challenge test obtenus pour les souches testées ont montré que les taux de réduction des inoculums bactériens et fongiques initiaux ont été au-dessus de ce qui a été exigé par les critères d'acceptation A de la Pharmacopée européenne durant les 28 jours du test. Concluons, notre étude a pu prouver que, dans les conditions du test, l'HE de *thymus satureioides* C. a une efficacité conservatrice et pourrait être considérée comme un nouvel agent conservateur d'origine naturelle alternatif pour les préparations pharma-cosmétiques.

**Mots-clés** : *thymus satureioides* C., huile essentielle, essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne, conservateur antimicrobien.

### Abstract

**Evaluation of the effectiveness of the antimicrobial preservation of a pharmaceutical preparation by the essential oil of *thymus satureioides* C.**

This work aims to evaluate the antimicrobial protection of a mouthwash solution, using the essential oil, of a spontaneous plant of the Moroccan flora, *thymus satureioides* C., as a antimicrobial preservative. The mouthwash formulation had a high microbiological risk and only *thymus satureioides* C. EO was used as an

antimicrobial preservative at 0.1 %. The test for the effectiveness of antimicrobial preservation was conducted according to the recommendations of the European Pharmacopoeia, while the protocol for the demonstration of the effectiveness of the neutralizing medium was carried out according to ISO 11930: 2019. Five referenced microbial strains were used during these tests, namely: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300, *Escherichia coli* ATCC® 11775, *Candida albicans* L11 and *Aspergillus niger* M100. The results showed that the rule [ $N_{vi} \geq 0.5N_{vn}$  and  $N_{vn}$  is close to  $N_v$ ] was respected and that consequently the effectiveness of the neutralizing medium was confirmed. The results of the challenge test obtained for the strains tested showed that the reduction rates of the initial bacterial and fungal inocula were above what was required by the acceptance criteria A of the European Pharmacopoeia during the 28 days of the test. In conclusion, our study was able to prove that, under the conditions of the test, the EO of *thymus satureioides* C. has a conservative efficacy and could be considered as a new alternative preservative of natural origin for pharma-cosmetic preparations.

**Keywords :** *thymus satureioides* C., essential oil, challenge test, antimicrobial preservative.

## 1. Introduction

Assurer la protection microbiologique d'un produit au cours de son développement, son stockage et jusqu'à sa consommation est une exigence réglementaire et normative obligatoire. Aujourd'hui, les propriétés antimicrobiennes inhérentes d'un produit, la conception de son conditionnement, le procédé de sa fabrication, etc., peuvent être des facteurs clés pour optimiser sa protection antimicrobienne globale. Bien que ces facteurs ne soient pas tout le temps suffisants, le recours aux agents chimiques de conservation antimicrobienne reste incontournable. Cependant, les suspicions et preuves de toxicité de certains ingrédients de synthèse, y compris les conservateurs antimicrobiens [1], pourtant utilisés depuis des décennies, ont imposé, d'une part, les autorités compétentes d'interdire l'utilisation des parabènes par exemple dans les produits cosmétiques [2] et d'autre part, ont impulsé le marché de la cosmétique de se tourner vers les ingrédients naturels afin de formuler des produits cosmétiques plus sûrs [3, 4]. Dans ce sens, nous avons adhéré à ceux qui croient à la bio-préservation comme outil inévitable pour assurer une conservation antimicrobienne efficace mais tout en utilisant les ressources naturelles, y compris les ingrédients de la flore et de la faune et les microorganismes et/ou leurs métabolites [5], les HE en exemple. Par ailleurs, un conservateur antimicrobien naturel idéal devrait être efficace à faible concentration sous sa forme naturelle, être économique, ne causer aucune modification sensorielle du produit, inhiber un large éventail de micro-organismes pathogènes et d'altération et être non toxique [6]. Généralement, l'efficacité d'un conservateur antimicrobien peut être évaluée par un test selon une norme donnée. C'est vrai que la plupart des normes (Pharmacopée européenne, américaine et japonaise ; ICH Q6A ; et ISO 11930:2019) décrivent le principe de ce test de façon similaire, bien autant, il n'y a pas une harmonisation quant aux critères d'acceptation entre ces normes [7]. Aussi, ce test n'est applicable que pour les produits liquides et semi-solides quoique les produits solides (poudres, suppositoires, etc.) peuvent également subir une contamination microbienne à la suite d'utilisations répétées par les consommateurs [8]. Toutefois, cette évaluation repose essentiellement sur le test de l'efficacité de la conservation antimicrobienne (jargon de la pharmacopée) et/ou évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique (jargon des cosmétiques) [9] et à la lumière des résultats obtenus, nous allons établir le niveau de protection antimicrobienne requis afin de réduire au minimum le risque pour le consommateur. Le présent travail a pour but donc l'évaluation de l'efficacité de la conservation antimicrobienne de l'HE d'une plante spontanée de la flore Marocaine, *thymus satureioides* C., contre cinq souches microbiennes utilisées au préalable pour contaminer artificiellement une solution pour bain de bouche.

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Conservateur naturel

Le conservateur utilisé était l'HE de *thymus satureioides* C. issue de notre échantillothèque. L'HE était extraite par hydrodistillation de la partie aérienne de la plante que nous avons récoltée en juin 2018 dans la province d'AL HAOUZ, commune *Tidili Mesfioua* (31°26'37.3" N, 07°36'26.5" W, altitude 1119 m) pendant la floraison de la plante. Elle renfermait cinquante-deux composés environ, dont cinq majoritaires, Thymol (28,66 %), Bornéol (21,16 %), Alpha-Terpinéol (12,33 %), Bêta-Caryophyllène (6,39 %) et Carvone (5,49 %). L'activité antimicrobienne de l'HE de *thymus satureioides* C. a été prouvée et documentée dans plusieurs études et publications [10 - 15].

### 2-2. Formulation soumise à l'essai

La formulation est un facteur clé d'optimisation de la stabilité antimicrobienne du produit fini. Les ingrédients genre tensioactifs, co-solvants, agents de pH, choix du type et de la concentration de(s) conservateur(s), etc., pourront également affecter la stabilité microbienne [16]. La formule que nous avons choisie pour cette étude était une solution pour bain de bouche indiquée essentiellement pour nettoyer et parfumer la cavité buccale. C'est ainsi qu'une attention particulière a été portée au choix des ingrédients de manière à ce qu'ils ne contribuent pas à la protection antimicrobienne, et au même temps, pour qu'ils ne bloquent pas le conservateur antimicrobien utilisé. Nous avons donc opté pour une formule à haut risque microbiologique puisqu'elle se caractérise par une très forte activité d'eau, absence d'alcool, pH non extrême, un faible pourcentage de tensioactif et seule l'HE de *thymus satureioides* C. a été utilisée tant que conservateur antimicrobien à raison de 0,1 % car en générale la plage de concentration globale des conservateurs utilisés était souvent comprise entre 0,002 % et 1 %, voire parfois plus [17]. La fabrication du bain de bouche a été réalisée au sein des locaux de THERAPIA LABORATOIRES (société spécialisée dans la fabrication des cosmétiques et produits d'hygiène corporelle à Marrakech-Maroc). La composition, les spécifications et le processus de fabrication de la formule sont respectivement rendus dans les **Tableaux 1, 2 et 3**.

**Tableau 1 : Formule de la solution pour bain de bouche**

Phase	Ingrédients	INCI*	% par poids	Fonction
A	Purified water	Aqua	q.s.* 100	Solvant
	Saccharin	Saccharin	0,01	Edulcorant
	Glycerin	Glycerin	20,00	Humectant
B	Cetiol® HE	PEG-7 glyceryl Cocoate	1,00	Emulsifiant (O/W*), surfactant
	Thymus Satureioides EO		0,1	Conservateur
C	Dehyton® K	Cocamidopropyl Betaine	0,15	Moussant, surfactant

\*INCI : nomenclature internationale des ingrédients de produits cosmétiques

\*q.s : quantité suffisante pour

\*O/W : huile dans eau

**Tableau 2 : Spécifications de la solution pour bain de bouche**

Spécifications	
pH value (23°C)	4,23
Apparence	liquide blanchâtre à odeur aromatique

**Tableau 3 : Processus de fabrication de la solution pour bain de bouche**

Processus de fabrication
Préparez la phase A et agitez jusqu'à ce que l'édulcorant soit complètement dissout. Préparez la phase B et agitez jusqu'à ce que l'huile essentielle se dissolve. Ajouter la phase B à la phase A et agiter vigoureusement pendant 45 minutes. Ajoutez ensuite la phase C et agitez doucement jusqu'à homogénéisation.

### 2-3. Souches microbiennes

Les souches microbiennes utilisées étaient équivalentes à celles décrites par les deux références : la *Pharmacopée européenne* dans le paragraphe "Efficacité de la conservation des antimicrobiens" et ISO 11930:2019. Il s'agit de trois souches bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300, *Escherichia coli* ATCC® 11775; et deux souches fongiques : *Candida albicans* L11, et *Aspergillus niger* M100, récemment reclassé *Aspergillus brasiliensis* [18], fournies par le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (Service Analyses Biologiques et Collections Coordonnées Marocaines de Microorganismes) du Maroc.

### 2-4. Essai de l'efficacité de la conservation (la protection) antimicrobienne

Nous avons adopté la méthodologie décrite par la pharmacopée européenne [19] mais aussi celle de la norme ISO 11930 : 2019 notamment, en ce qui concerne le protocole de la démonstration de l'efficacité du milieu neutralisant. Généralement, les deux méthodes se ressemblent avec peu de différence. La norme ISO 11930 : 2019 était très utile pour nous, spécialement, parce qu'elle nous a fourni suffisamment de détails au niveau des calculs et des critères d'acceptation de la démonstration de l'efficacité du milieu neutralisant. Par la suite, l'essai consiste en la contamination artificielle de la préparation, si possible dans son récipient définitif, au moyen d'un inoculum de microorganismes appropriés prescrit, au maintien de la préparation inoculée à une température prescrite, au prélèvement d'échantillons à partir du récipient à intervalle de temps donné, et au dénombrement des microorganismes dans les échantillons prélevés. De part ces éléments, les propriétés de conservation de la préparation sont adéquates si, dans les conditions de l'essai, une diminution importante ou, selon le cas, l'absence d'augmentation du nombre de microorganismes dans la préparationensemencée se produit après les temps et aux températures prescrites. En d'autres termes, l'essai est une modélisation mathématique [20] représentée par des tableaux de critères d'acceptation en fonction du microbe, du temps et de la voie d'administration, qui va nous permettre d'estimer l'efficacité de la conservation antimicrobienne tout en réduisant le nombre d'expériences coûteuses et fastidieuses. D'autre part, puisque notre solution pour bain de bouche est classée préparation pour application locale, les critères d'acceptation, en terme de diminution du nombre de microorganismes en fonction du temps, sont énumérés dans le tableau ci-après (*Tableau 4*).

**Tableau 4 : Critères d'acceptation des préparations pour application locale**

		Réduction logarithmique			
		2j	7j	14j	28j
Bactéries	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
Champignons	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

*NI : pas d'augmentation*

### **2-4-1. Préparation des inoculums**

Pour réaliser les essais, nous avons préparé au début des cultures mères en étalant en stries les souches conservées sur des boîtes.

#### **2-4-1-1. Préparation des suspensions bactériennes**

Nous avons réalisé une première subculture à partir de la culture mère en repiquant la culture en stries sur des boîtes (TSA) afin d'obtenir une culture confluite. Après incubation à (30-35) °C pendant 18 h à 24 h, nous avons réalisé une deuxième subculture à partir de la première et c'est cette subculture qui constituera la culture de travail pour obtenir l'inoculum. A l'aide d'une anse, nous avons prélevé 3 à 5 colonies de la culture, puis nous les avons transférées dans un tube contenant 5 mL du diluant (Solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0).

#### **2-4-1-2. Préparation de la suspension champignons**

Le milieu de culture utilisé est le SDA et la température d'incubation (20-25) °C. La préparation de la suspension de *C. albicans* est similaire à celle des bactéries sauf pour l'incubation ; la levure doit être incubée pendant 48 h. Pour la suspension de spores d'*Aspergillus niger*, à partir d'une culture mère datant de moins de 2 mois, nous avons préparé une suspension dans le diluant (Solution de polysorbate 80 à 0,05 %) que nous avons inoculée sur boîte par inondation de façon à obtenir une culture confluite, d'ailleurs, que nous avons incubé pendant 7 à 11 jours. Cette dernière constituera pour nous la culture de travail pour obtenir l'inoculum. Nous avons versé 10 mL du diluant sur la culture de travail et à l'aide de spatule nous avons détaché doucement les spores sur la surface. Ensuite, nous avons transféré la suspension dans un tube stérile et après agitation, homogénéisation et stabilisation de la suspension, nous avons prélevé par aspiration la partie supérieure et nous l'avons transférée dans un tube stérile.

#### **2-4-1-3. Calibrage de l'inoculum**

Nous avons utilisé un spectrophotomètre pour ajuster le nombre de cellules dans les suspensions à des valeurs d'environ 10<sup>7</sup> à 10<sup>9</sup> UFC/mL pour les bactéries et d'environ 10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> UFC/mL pour les champignons. Les inoculums calibrés ont été utilisés immédiatement. Nous avons procédé au contrôle de leurs titres initiaux « N » par réalisation des dilutions décimales successives dans leurs diluants et dénombrement sur plaques par ensemencement en profondeur en double de 1 mL des dilutions appropriées. L'incubation était à (30-35) °C pendant 18 h à 24 h pour les bactéries et à (20-25) °C pendant 48 h pour *C. albicans* et 3 jours à 5 jours pour *A. niger*.

### 2-4-2. Démonstration de l'efficacité du milieu neutralisant

L'efficacité de la neutralisation est la vérification que le protocole d'une méthode d'essai (**Figure 1**) neutralise suffisamment les aspects antimicrobiens d'une formulation, garantissant que les micro-organismes peuvent être détectés dans la matrice du produit sans inhiber les micro-organismes d'essai. Bien qu'une telle démonstration soit souvent recommandée par les Pharmacopées, aucune d'elles n'a détaillé clairement le protocole [21], seule la norme ISO 11930:2019 qui s'est prononcée sur les critères d'acceptation de la démonstration de l'efficacité du milieu neutralisant. Bien encore, nous avons dilué chaque suspension calibrée dans son diluant afin d'obtenir une suspension contenant environ  $10^3$  UFC/mL (inoculum). Ensuite, nous avons transféré 1 mL de la formulation soumise à essai dans 9 mL de milieu neutralisant (**Tableau 5**) et nous avons agité l'ensemble jusqu'à dispersion et nous l'avons laissé reposer pendant 30 min.

**Tableau 5 : Formule du milieu neutralisant**

Pour 1 Litre de milieu :	
Polysorbate 80	30,0 g
Laurylsulfate de sodium	4,0 g
Phosphate monopotassique	3,6 g équivalent à 0,067 M
Phosphate disodique dihydraté	7,2 g équivalent à 0,067 M
Chlorure de sodium	4,3 g
Peptone de viande ou de caséine	1,0 g
pH du milieu à 25 °C : $7,0 \pm 0,2$	

En parallèle, nous avons préparé un témoin avec le même milieu neutralisant, mais en remplaçant la formulation soumise à essai par 1 mL de diluant. Par la suite, nous avons inoculé les tubes «essai» et les tubes «témoin» avec 1 mL de l'inoculum. Ainsi, le volume final était de 11 mL par tube. Il est à indiquer aussi que nous avons préparé aussi un «témoin inoculum» en ajoutant 1 mL de l'inoculum dans 10 mL du diluant. Enfin, nous avons procédé au dénombrement sur plaques par ensemencement en profondeur en double de 1 mL de chaque mélange («essai», «témoin» et «témoin inoculum») dans le milieu gélosé approprié. L'incubation était à  $(32,5 \pm 2,5)$  °C pendant 48 h à 72 h pour les bactéries et *C. albicans*, et à  $(22,5 \pm 2,5)$  °C pendant 3 jours à 5 jours pour *A. niger*. L'efficacité du milieu neutralisant est démontrée si  $N_{vf} \geq 0,5 N_{vn}$  et si  $N_{vn}$  est proche de  $N_v$ .

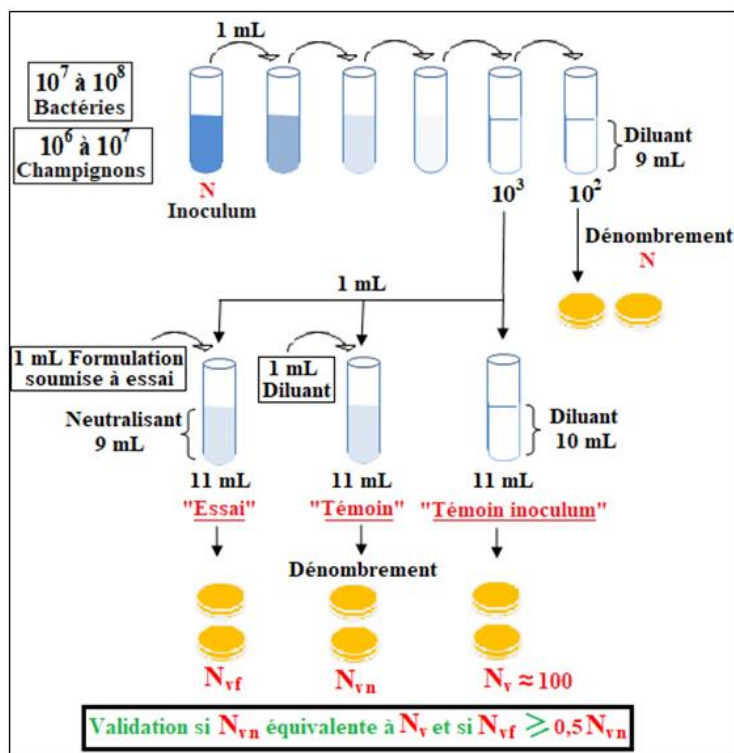


Figure 1 : Schéma du protocole de démonstration de l'efficacité du milieu neutralisant

## 2-5. Détermination de l'efficacité de la protection antimicrobienne de la formulation

L'essai était réalisé séparément pour chaque souche. Pour chaque souche, nous avons réparti 20 mL de la formulation soumise à l'essai dans un récipient stérile. Après, nous avons inoculé chaque récipient de 0,2 mL de l'inoculum calibré pour obtenir  $10^5$  à  $10^6$  UFC/mL pour les bactéries et d'environ  $10^4$  à  $10^5$  UFC/mL pour les champignons. Les récipients inoculés ont été maintenus à une température de 20 à 25 °C à l'abri de la lumière. La concentration réelle des micro-organismes lors de cette inoculation,  $N_0$ , est calculée à l'aide des résultats du dénombrement de l'inoculum calibré,  $N$ . À chaque intervalle de prélèvement spécifié : 2 jours ( $t_2$ ), 7 jours ( $t_7$ ), 14 jours ( $t_{14}$ ) et 28 jours ( $t_{28}$ ) selon la souche d'essai, nous avons prélevé 1 mL de la formulation inoculée et nous avons réalisé des dilutions décimales successives jusqu'à la dilution pour laquelle l'efficacité de neutralisation a été démontrée. Après un temps de contact ( $30 \pm 15$ ) minutes à la température ambiante. Nous avons réalisé des dilutions décimales successives dans le diluant. Pour le dénombrement, nous avons déposé 1 mL de chaque dilution dans une boîte de Pétri et nous avons versé 15 à 20 mL de milieu gélosé approprié (TSA pour les bactéries, SDA pour les champignons) maintenu en surfusion dans un bain-marie à une température ne dépassant pas 48 °C. Nous avons mélangé soigneusement la dilution et le milieu par rotation et inclinaison des boîtes de manière à assurer la dispersion des micro-organismes. Nous avons laissé le mélange se solidifier sur une surface horizontale à température ambiante. Ultérieurement, nous avons laissé incuber à (30-35) °C pendant 24 h à 48 h pour les bactéries, à (20-25) °C pendant 48h à 72h pour *C. albicans* et 3 j à 5 j pour *A. niger*.

### 2-5-1. Calculs

#### 2-5-1-1. Détermination des nombres de micro-organismes, $N$ , $N_0$ et $N_x$

La détermination des nombres de micro-organismes de  $N$ ,  $N_0$  et  $N_x$  est faite respectivement selon les Formules (1), (2) et (3).

$$N = \bar{C} / (V \times d) \quad (1)$$

$N$  : doit être compris entre  $10^7$  et  $10^8$  UFC/mL pour les bactéries, et entre  $10^6$  et  $10^7$  UFC/mL pour *C. albicans* et *A. niger* ;  $\bar{C}$  : est la moyenne du nombre de colonies dénombrées en double sur les boîtes ;  $V$  : est le volume d'inoculum déposé dans chaque boîte, en millilitres (1 mL) ;  $d$  : est le facteur de dilution correspondant à la dilution dénombrée.

$$N_0 = N/100 \quad (2)$$

$N_0$  : doit être compris entre  $10^5$  et  $10^6$  UFC/mL pour les bactéries, et entre  $10^4$  et  $10^5$  UFC/mL pour *C. albicans* et *A. niger*

$$N_x = C / (V \times d) \quad (3)$$

$N_x$  : est le nombre de micro-organismes survivants dans la formulation contaminée, en unités formant colonies par millilitre, à chaque temps de prélèvement,  $t_x$  ( $T_2$ ,  $T_7$ ,  $T_{14}$  ou  $T_{28}$ ) ;  $C$  : est la moyenne du nombre de colonies dénombrées en double sur les boîtes ;  $V$  : est le volume d'inoculum déposé dans chaque boîte, en millilitres (1 mL) ;  $d$  : est le facteur de dilution correspondant à la dilution retenue et dénombrée, en tenant compte éventuellement de la seconde dilution décimale dans le milieu neutralisant.

#### 2-5-1-2. Réduction du nombre de micro-organismes

Le taux de réduction logarithmique des micro-organismes est calculé selon la **Formule (4)**.

$$R_x = \lg N_0 - \lg N_x \quad (4)$$

$R_x$  : taux de réduction ;  $N_0$  : est le nombre de micro-organismes inoculés au temps  $t_0$  ;  $N_x$  : est le nombre de micro-organismes survivants à chaque temps de prélèvement,  $t_x$ .

#### 2-5-2. Critères et interprétation des résultats d'essai

Les taux de réduction logarithmique,  $R_x$  obtenus sont comparés aux valeurs minimales requises pour les critères d'évaluation A ou B indiqués dans le **Tableau**. De ce fait, après avoir démontré l'efficacité du milieu neutralisant pour toutes les souches, nous allons comparer les valeurs de  $R_x$  avec les critères A ou B pour chaque micro-organisme.

- a) Si tous les taux de réduction correspondent aux critères A, la formulation répond aux exigences A de l'essai d'efficacité de la protection antimicrobienne ;
- b) Si tous les taux de réduction correspondent seulement aux critères B, la formulation répond aux exigences B de l'essai d'efficacité de la protection antimicrobienne ;
- c) Si un ou plusieurs taux de réduction ne correspondent ni aux critères A ni aux critères B, la formulation ne répond pas aux exigences de l'essai d'efficacité de la protection antimicrobienne. Le statut du produit ne doit être évalué que sur la base de l'appréciation du risque microbiologique.



### 3. Résultats et discussion

#### 3-1. Résultats de l'efficacité du milieu neutralisant et interprétation

##### 3-1-1. Dénombrement de la population microbienne initiale de l'inoculum

Selon le **Tableau 6**, la taille des inoculums utilisés est en conformité avec les exigences.

**Tableau 6 : Taille des inoculums microbiens en UFC/mL**

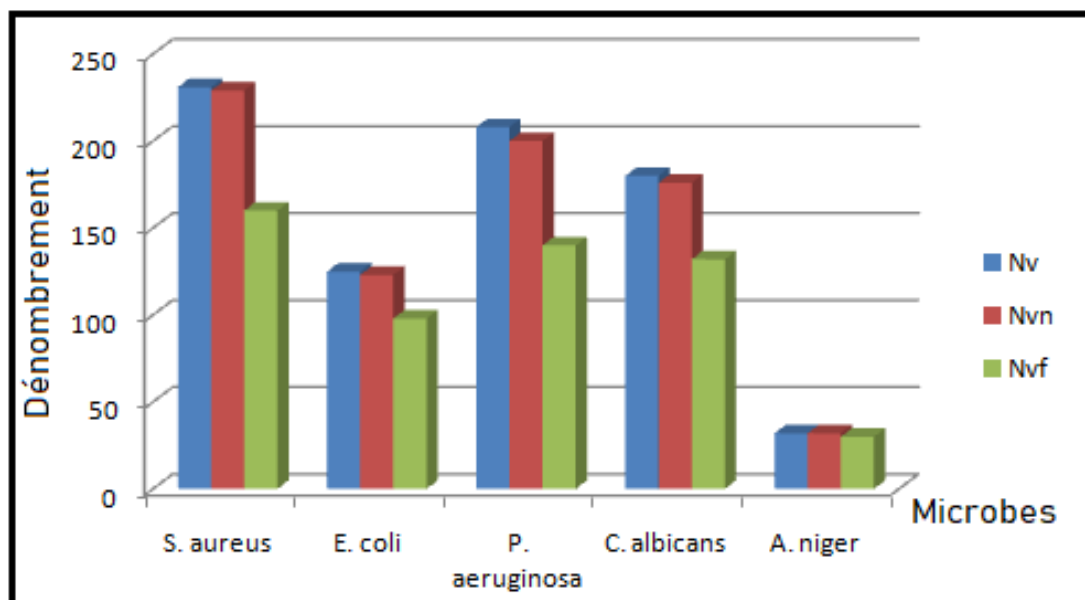
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
$N$	$0,26 \times 10^8$	$0,14 \times 10^8$	$0,23 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$0,37 \times 10^6$

##### 3-1-2. Dénombrement de la population microbienne pour le test de l'efficacité du neutralisant

D'après le **Tableau 7** et la **Figure 2**, nous remarquons que la règle [ $N_{vf} \geq 0,5N_{vn}$  et  $N_{vn}$  est proche de  $N_v$ ] a été respectée. De ce fait, nous pouvons déduire que le milieu neutralisant utilisé est capable d'éliminer toute activité antimicrobienne résiduelle dans la formulation sans être toxique pour les micro-organismes de l'essai, ainsi, son efficacité est démontrée.

**Tableau 7 : Résultats du dénombrement de  $N_v$ ,  $N_{vn}$ , et  $N_{vf}$  (UFC)**

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
$N_v$	231	125	208	180	32
$N_{vn}$	229	123	200	176	32
$N_{vf}$	160	98	140	132	30



**Figure 2 : Diagramme des résultats du dénombrement de  $N_v$ ,  $N_{vn}$ , et  $N_{vf}$  pour les différents microbes**

### 3-2. Résultats de l'efficacité de la protection antimicrobienne du produit et interprétation

#### 3-2-1. Dénombrement de la population microbienne pour le test de la protection antimicrobienne de la formulation

Après  $j_0$ ,  $N_x$ , le nombre de micro-organismes survivants dans la formulation contaminée, en unités formant colonies par millilitre, n'augmentait pas, au contraire, il régressait (**Tableau 8**).

**Tableau 8 : Résultats du dénombrement des microbes (UFC) en fonction du temps**

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
$N_0 \text{ à } j_0$	$0,26 \times 10^6$	$0,14 \times 10^6$	$0,23 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	$0,37 \times 10^4$
$N_2 \text{ à } j_2$	<1	<1	<1	—	—
$N_7 \text{ à } j_7$	<1	<1	<1	—	—
$N_{14} \text{ à } j_{14}$	—	—	—	<1	34
$N_{28} \text{ à } j_{28}$	<1	<1	<1	<1	7

#### 3-2-2. Calcul de la réduction logarithmique & interprétation des résultats

##### 3-2-2-1. *Staphylococcus aureus*

Les taux de réduction, exprimés en logarithmes, obtenus à chaque temps de prélèvement correspondent aux critères A. L'HE de *thymus satureioides C.* est efficace sur *S. aureus* (**Tableau 9**).

**Tableau 9 : Bulletin de résultats de l'efficacité du conservateur contre *S. aureus***

	Résultats (UFC)	Réduction logarithmique	Norme	Conformité
$J_0$	$0,26 \times 10^6$			
$J_2$	< 1	5	2	✓
$J_7$	< 1	5	3	✓
$J_{28}$	< 1	5	NI	✓
Conclusion	Conservateur efficace contre <i>S. aureus</i>			

##### 3-2-2-2. *Escherichia coli*

Les taux de réduction, exprimés en logarithmes, obtenus à chaque temps de prélèvement correspondent aux critères A. L'HE de *thymus satureioides C.* est efficace sur *E. coli* (**Tableau 10**).

**Tableau 10 : Bulletin de résultats de l'efficacité du conservateur contre *E. coli***

	Résultats (UFC)	Réduction logarithmique	Norme	Conformité
$J_0$	$0,14 \times 10^6$			
$J_2$	< 1	5	2	✓
$J_7$	< 1	5	3	✓
$J_{28}$	< 1	5	NI	✓
Conclusion	Conservateur efficace contre <i>E. coli</i>			

##### 3-2-2-3. *Pseudomonas aeruginosa*

Les taux de réduction, exprimés en logarithmes, obtenus à chaque temps de prélèvement correspondent aux critères A. L'HE de *thymus satureioides C.* est efficace sur *P. aeruginosa* (**Tableau 11**).

**Tableau 11 : Bulletin de résultats de l'efficacité du conservateur contre *P. aeruginosa***

	Résultats (UFC)	Réduction logarithmique	Norme	Conformité
J <sub>0</sub>	0,23 × 10 <sup>6</sup>			
J <sub>2</sub>	< 1	5	2	✓
J <sub>7</sub>	< 1	5	3	✓
J <sub>28</sub>	< 1	5	NI	✓
Conclusion	Conservateur efficace contre <i>P. aeruginosa</i>			

**3-2-2-4. *Candida albicans***

Les taux de réduction, exprimés en logarithmes, obtenus à chaque temps de prélèvement correspondent aux critères A. l'HE de *thymus satureioides C.* est efficace sur *C. albicans* (**Tableau 12**).

**Tableau 12 : Bulletin de résultats de l'efficacité du conservateur contre *C. albicans***

	Résultats (UFC)	Réduction logarithmique	Norme	Conformité
J <sub>0</sub>	2 × 10 <sup>5</sup>			
J <sub>14</sub>	< 1	5	2	✓
J <sub>28</sub>	< 1	5	NI	✓
Conclusion	Conservateur efficace contre <i>C. albicans</i>			

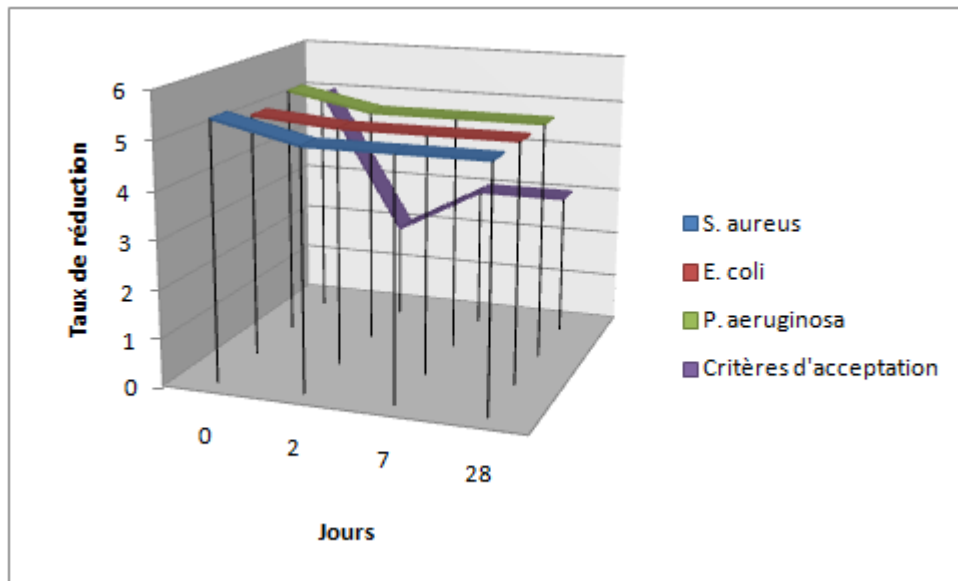
**3-2-2-5. *Aspergillus niger***

Les taux de réduction, exprimés en logarithmes, obtenus à chaque temps de prélèvement correspondent aux critères A. l'HE de *thymus satureioides C.* est efficace sur *A. niger* (**Tableau 13**).

**Tableau 13 : Bulletin de résultats de l'efficacité du conservateur contre *A. niger***

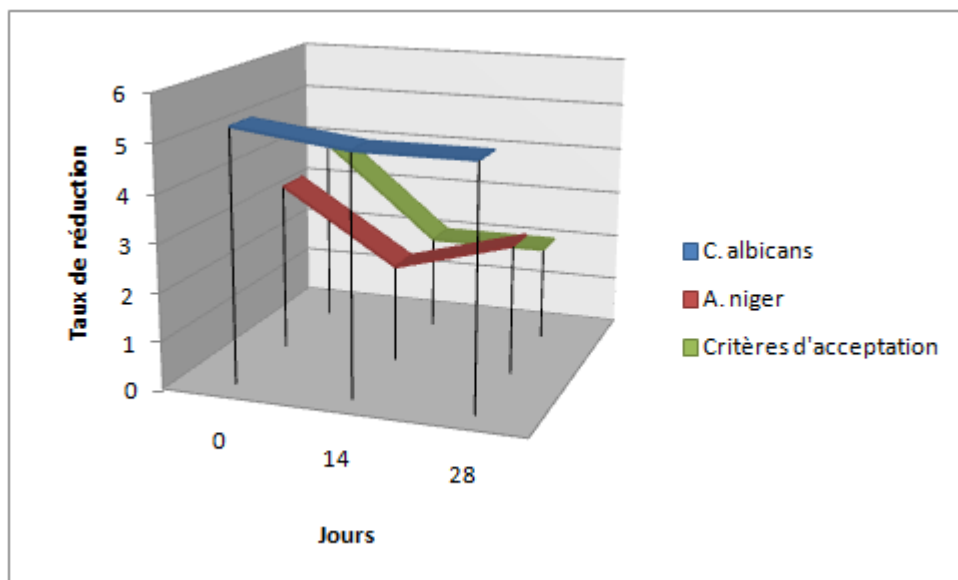
	Résultats (UFC)	Réduction logarithmique	Norme	Conformité
J <sub>0</sub>	0,37 × 10 <sup>4</sup>			
J <sub>14</sub>	34	2,04	2	✓
J <sub>28</sub>	7	2,72	NI	✓
Conclusion	Conservateur efficace contre <i>A. niger</i>			

En somme, les résultats obtenus pour les bactéries montrent que les taux de réduction des inoculums initiaux ont été au-dessus de ce qui a été exigé par les critères d'acceptation A (**Figure 3**).



**Figure 3 :** Taux de réduction des bactéries relatif aux critères d'acceptation A en fonction du temps

Ces résultats concordent avec ceux qui ont été rapportés par les publications relativement à l'activité antimicrobienne de l'HE de *thymus satureioides C.* via les techniques de l'aromatogramme, la CMI et la CMB. Aussi, même si le *P. aeruginosa* était souvent la souche la plus résistante [11] du côté des bactéries, cette souche n'a pas pu résister à l'action bactéricide du conservateur testé d'autant plus le milieu était probablement stressant et pauvre en éléments nutritives assimilable. Idem pour les champignons, sauf que l'*A. niger* a montré plutôt une certaine résistance. Toutefois, le taux de réduction de ce champignon selon les critères A était acceptable (**Figure 4**).



**Figure 4 :** Taux de réduction des champignons relatif aux critères d'acceptation A en fonction du temps

Nous pouvons constater que l'action sporicide du conservateur nécessite un peu de temps car une éradication totale et rapide des spores est difficile. Il est évident aujourd'hui que cette souche est la moins sensible [22].

## 4. Conclusion

Les résultats ont montré que l'HE de *thymus satureioides* C. a raison de 0,1 % réduit l'inoculum bactérien et fongique et que la formulation satisfait aux exigences A de l'essai d'efficacité de la conservation antimicrobienne de la Pharmacopée européenne, avec une conservation importante pendant une période de 28 jours. La formulation est donc protégée vis-à-vis toute prolifération microbienne susceptible de présenter un risque potentiel pour l'utilisateur. Le risque microbiologique est considéré comme acceptable. L'HE a pu remplir parfaitement sa fonction tant que conservateur antimicrobien naturel valide sans être soutenue par des moyens supplémentaires. Notre étude indique que, dans les conditions du test, l'HE de *thymus satureioides* C. a une activité antimicrobienne et pourrait être considérée comme un conservateur alternatif pour les formulations pharma-cosmétiques. Cependant, l'utilisation de l'HE telle qu'elle est n'est pas idéale, ni du point de vue économique, ni pratique. En effet, le caractère hydrophobe de l'HE, outre sa dégradation facile en présence de lumière, d'air et de températures élevées rend difficile son incorporation. Encore, notre conservateur naturel a démontré sa validité pour une forme galénique bien déterminée, tout changement de cette forme, des ingrédients, du processus de fabrication, etc., peut impacter son efficacité. En d'autres termes, l'essai doit se refaire au cas par cas ainsi que l'évaluation permanente des risques. Finalement, s'agissant de produit biologiquement actif, notre conservateur malgré naturel peut induire probablement chez quelques individus des effets toxiques, irritants ou sensibilisants. Une remise en question de sa sécurité s'avère souhaitable.

## Remerciements

*Les auteurs sont reconnaissants à la direction de THERAPIA LABORATOIRES pour l'accès au service recherche & développement et la formulation de la solution pour bain de bouche.*

## Références

- [1] - X. CHEN, D. A. SULLIVAN, A. G. SULLIVAN, W. R. KAM and Y. LIU, Toxicity of cosmetic preservatives on human ocular surface and adnexal cells. *Experimental Eye Research* 170, (2018) 188 - 197, doi:10.1016/j.exer.2018.02.020
- [2] - *Journal officiel de l'Union européenne*. Règlement (UE) No 1004/2014 de la commission du 18 septembre 2014 modifiant l'annexe V du règlement (CE) no 1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques, (2014)
- [3] - G. J. E. NYCHAS and C. C. TASSOU, Preservatives | Traditional Preservatives - Oils and Spices. *Encyclopedia of Food Microbiology*, (2014) 113 - 118; doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00258
- [4] - A. KERDUDO, P. BURGER, F. MERCK, A. DINGAS, Y. ROLLAND, T. MICHEL and X. FERNANDEZ, Development of a natural ingredient - Natural preservative : A case study. *Comptes Rendus Chimie*, 19 (9) (2016) 1077 - 1089; doi:10.1016/j.crci.2016.06.004
- [5] - M. YUSUF, Natural Antimicrobial Agents for Food Biopreservation. *Food Packaging and Preservation*, (2018) 409 - 438, doi:10.1016/b978-0-12-811516-9.00012-9
- [6] - S. BARBERIS, H. G. QUIROGA, C. BARCIA, J. M. TALIA and N. DEBATTISTA, Natural Food Preservatives Against Microorganisms. *Food Safety and Preservation*, (2018) 621 - 658; doi:10.1016/b978-0-12-814956-0.00020-2
- [7] - T. SANDLE, Antibiotics and preservatives. *Pharmaceutical Microbiology*, (2016) 171 - 183; doi:10.1016/b978-0-08-100022-9.00014-1

- [8] - M. R. S. FERREIRA, F. R. LOURENÇO, M. T. OHARA, N. A. BOU-CHACRA and T. J. A. PINTO, An innovative challenge test for solid cosmetics using freeze-dried microorganisms and electrical methods. *Journal of Microbiological Methods*, 106 (2014) 104 - 109; doi:10.1016/j.mimet.2014.08.009
- [9] - ISO 11930:2019. Cosmétiques - Microbiologie - Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique, (2019)
- [10] - A. Kasrati, C. Alaoui Jamali, M. Fadli, K. Bekkouche, L. Hassani, H. Wohlmuth, D. Leach, and A. Abbad, Antioxidative activity and synergistic effect of *Thymus saturejoides* Coss. essential oils with cefixime against selected food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products*, 61 (2014) 338 - 344
- [11] - L. MAYAUD, A. CARRICAJÓ, A. ZHIRI and G. AUBERT, Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Journal compilation The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 47 (2008) 167 - 173
- [12] - M. OUSSALAH, S. CAILLET, L. SAUCIER and M. LACROIX, Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria : *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18 (2007) 414 - 420
- [13] - L. EL BOUZIDI, C. ALAOUI JAMALI, K. BEKKOUCHE, L. HASSANI, H. WOHLMUTH, D. LEACH and A. ABBAD, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Industrial Crops and Products*, 43 (2013) 450 - 456
- [14] - H. BOUBAKER, H. KARIM, A. EL HAMDAOUI, F. MSANDA, D. LEACH, I. BOMBARDA, P. VANLOOT, A. ABBAD, E. H. BOUDYACH and A. AIT BEN AOUMAR, Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products*, 86 (2016) 95 - 101
- [15] - M. AIT-SIDI-BRAHIM, M. MARKOUK and M. LARHSINI, Moroccan Medicinal Plants as Antiinfective and Antioxidant Agents. *New Look to Phytomedicine*, (2019) 91 - 142 ; Available at <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00005-7>
- [16] - J. PUSCHMANN, M. E. HERBIG and C. C. MÜLLER-GOYMANN, Correlation of antimicrobial effects of phenoxyethanol with its free concentration in the water phase of o/w-emulsion gels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 131 (2018) 152 - 161; doi:10.1016/j.ejpb.2018.08.007
- [17] - A. OMAR and P. NADWORNÝ, *Review : Antimicrobial efficacy validation using in vitro and in vivo testing methods*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 112 (2017) 61 - 68; doi:10.1016/j.addr.2016.09.003
- [18] - J. VARGA, S. KOCSUBE, B. TOTH, J. C. FRISVAD, G. PERRONE, A. SUSCA, M. MEIJER and R. A. SAMSON, *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 57 (8) (2007) 1925 - 1932 ; doi:10.1099/ijs.0.65021-0
- [19] - Pharmacopée européenne 6.6. Efficacité de la conservation antimicrobienne, (2008). 01/2008:50103
- [20] - A. K. JAISWAL and S. JAISWAL, Modelling the effects of natural antimicrobials as food preservatives. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, (2015) 259 - 284; doi:10.1016/b978-1-78242-034-7.00012-8
- [21] - I. MANOU, L. BOUILLARD, M. J. DEVLEESCHOUWER and A. O. BAREL, Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (1998) 368 - 376
- [22] - J. PASQUET, Y. CHEVALIER, E. COUVAL, D. BOUVIER and M. A. BOLZINGER, Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients. *International Journal of Pharmaceutics*, 479 (1) (2015) 88 - 95; doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.031