

Master
30/01

Mémoire pour l'obtention du diplôme de
Master en Biochimie appliquée



Présenté par

M^{elle} BENSABEUR SLIMANE Fatima zohra

Evaluation de l'efficacité antimicrobienne (Concentration Minimale Inhibitrice et Concentration Minimale Bactéricide) de quatre conservateurs :
Diazolidinyl urée, Imidazolidinyl urée, Germaben II et le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium

Devant les membres du jury :

Président	Mr ZIANI Chawki
Promoteur	Mr BOUCHERIT Kebir
Examinatrices :	Mme SARI Lamia
	Mme BOUCHERIT Zahia

Année Universitaire 2008-2009

Résumé

Les conservateurs constituent un thème récurrent d'interrogations et de débats. Présents dans les aliments, les produits cosmétiques ou les médicaments, les conservateurs sont omniprésents.

Ces conservateurs jouent un rôle essentiel dans la conservation des produits cosmétiques en empêchant les proliférations microbiennes.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'efficacité antimicrobienne (Concentration Minimale Inhibitrice et Concentration Minimale Bactéricide) de quatre conservateurs : Diazolidinyl urée, Imidazolidinyl urée, bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium et Germaben II vis-à-vis trois souches bactériennes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et une levure *Candida albicans*.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de ces quatre conservateurs se fait par deux méthodes :

- Méthode de diffusions des disques sur milieu solide permettant de donner des résultats préliminaires d'activité antimicrobienne
- Méthode de micro dilutions sur milieu liquide permettant de donner directement la Concentration Minimale Inhibitrice et la Concentration Minimale Bactéricide de ces produits

Ces quatre conservateurs ont une activité antimicrobienne et antifongique avec des concentrations minimale inhibitrices respectant les normes d'utilisations de ces conservateurs dans les produits cosmétiques.

Remerciement

Nous remercions Dieu pour tout ses bienfaits sur nous, c'est bien grâce a lui que nous avons pu réaliser ce travail :

Nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance vont à notre promoteur Ms BOUCHERIT K. ; maitre de conférences à la faculté des sciences département de biologie (université de TLEMCEM), pour la confiance qu'il nous a accordée et d'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de ce mémoire.

Nous tenons à remercier :

Mr ZIANI CH., qui nous fait le grand honneur de présider ce jury.

Mme SARI L., d'avoir accepter de juger ce travail.

Mme BOUCHERIT Z., pour l'honneur qu'elle nous a fait d'accepter de prendre connaissance et d'examiner ce travail.

Nous adressons nos vifs remerciements à tout le personnel du laboratoire antibiotiques, antifongiques, physico-chimie, synthèse et activité biologique Ms RAHMOUN et Melle DOUNIA.

Nos sincères remerciements vont aux étudiants du magistère MOHAMED, DJAMILA et surtout Ms HALLA pour leurs aides.

Nous remercions également tous ceux et celles qui nous ont apporté leur aide et leur soutien de près ou de loin.

Dédicace

Grâce à la volonté divinée d'Allah notre Dieu le tout puissant et bienveillant qui nous a permis d'achever et de présenter ce modeste travail que je dédie :

À la lumière de mes yeux et le bonheur de mon existence : ma mère, la source d'amour et d'affections qui me soutient dans toutes les conditions, que Dieu la protège.

À celui plus cher à mon cœur qui m'a soutenu toujours dans mes études pour son sacrifice et son encouragement incessant tout ma vie, mon père que Dieu le protège.

À la jumelle de mon âme, ma sœur AMINA et à mes petites anges mes sœurs AMEL et SABRINA.

À mon futur partenaire; mon fiancé Mr MOULI qui ma toujours soutenu et éclairci ma vision pour avancer.

À toute la famille surtout ma grande mère qui ma soutenue par ses prières, et mes oncles qui sont toujours présent à mes côtés pour m'encourager et donner la force de continuer sur mon chemin.

À tout mes amis surtout NBI, KARIM, FATIMA et tous les étudiants du master biochimie appliqué 2009.

FATIMA. Z

La liste des abréviations

ATCC	American Type Culture Collection
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
CMB	Concentration Minimal Bactéricide
D.O	Densité Optique
EUCAST	European Committe for Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
GN	Gélose nutritive
h	heur
qsp	Quantité suffisante pour
DL ₅₀	dose létale de 50% de la population
µg/ml	Microgram par milliliter
min	minute
mm	millimeter
ml	milliliter
mg/ml	milligram par milliliter
nm	nanomètre
TSB	Bouillon Trypticase Soja
UFC	Unité Formant Colonies

La liste des tableaux

Tableau n°1	Produits allergènes les plus fréquents aux Etats-Unis (2003-2004).	p13
Tableau n°2	résultats des diamètres des zones d'inhibition en (mm) vis-à-vis la souche d' <i>Escherichia coli</i> .	p27
Tableau n°3	résultats des diamètres des zones d'inhibition en (mm) vis-à-vis la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	p29
Tableau n°4	résultats des diamètres des zones d'inhibition en (mm) vis-à-vis la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> .	p31
Tableau n°5	résultats des CMI et CMB en (mg/ml) vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> .	p33
Tableau n°6	résultats des CMI et CMB (mg/ml) vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	p35
Tableau n°7	résultats des CMI et CMB (mg/ml) vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .	p37
Tableau n°8	Comparaison des CMI et CMB du cétyl triméthyl ammonium bromide en mg/ml dans le Bouillon Trypticase Soja (TSB) et le bouillon Mueller Hinton (MH).	p38
Tableau n°9	la CMI et CMB (mg/ml) de Diazolidinyl urée.	p38
Tableau n°10	la CMI et CMB (mg/ml) de Imidazolidinyl urée.	p39
Tableau n°11	résultats des diamètres des zones d'inhibition en (mm) vis-à-vis <i>Candida albicans</i> .	p40
Tableau n°12	résultats des CMI et CMB en (mg/ml) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> .	p41
Tableau n°13	les CMI et CMB des dérivés de parabène en mg/ml.	p44
Tableau n°14	Les rapports CMB/CMI des produits testés.	p45

La liste des figures

Figure n°1	Structure du Diazolidinyl urée.	p12
Figure n°2	la réaction de formation de Diazolidinyl urée.	p12
Figure n°3	Structure chimique d'Imidazolidinyl urée.	p14
Figure n°4	la réaction de formation d'Imidazolidinyl urée.	p15
Figure n°5	Structure chimique de N cétyl NNN triméthyl ammonium bromide.	p16
Figure n°6	Structure chimique de propylène glycol.	p17
Figure n°7	Structure chimique de propylparabène.	p18
Figure n°8	Structure chimique de Méthylparabène.	p18
Figure n°9	la pré-culture de la souche <i>Escherichia coli</i> .	p23
Figure n°10	les zones d'inhibitions de l'Imidazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> .	p28
Figure n°11	les zones d'inhibitions de Diazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> .	p28
Figure n°12	les zones d'inhibitions de Germaben II à différentes concentrations vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> .	p28
Figure n°13	les zones d'inhibitions de l'Imidazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	p30
Figure n°14	les zones d'inhibitions de Diazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	p30
Figure n°15	les zones d'inhibitions de Germaben II à différentes concentrations vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	p30
Figure n°16	les zones d'inhibitions de l'Imidazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .	p32
Figure n°17	les zones d'inhibitions de Diazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .	p32
Figure n°18	résultats des CMI des produits sur microplaque vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> .	p34
Figure n°19	résultats des CMI des produits sur microplaque vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> .	p36
Figure n°20	les structures chimiques de l'Imidazolidinyl urée et de Diazolidinyl urée	p43

Sommaire

I/ INTRODUCTION.....	P1
III/ PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	p3
1/ GENERALITES SUR LES CONSERVATEURS.....	p3
1.1/ Produit cosmétique.....	p3
1.2/ Définition des conservateurs en cosmétologie.....	p4
1.3/ Mécanisme d'action des conservateurs.....	p4
1.4/ Qualités requises d'un conservateur.....	p5
1.5/ Principaux conservateurs utilisés dans les cosmétiques.....	p6
2/ LES CONSERVATEURS ETUDIES.....	p11
Présentation chimique	
2.1/ Diazolidinyl urée.....	p11
2.2/ Imidazolidinyl urée.....	p14
2.3/ N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium bromide.....	p16
2.4/ Germaben II.....	p17
3/ PROBLEMATIQUE.....	p19
III/ MATERIEL ET METHODES.....	p20
1/ MATERIEL.....	p20
1.1/ Les produits testés.....	p20
1.2/ Les souches utilisées.....	p20
1.3/ Les milieux des cultures.....	p21
2/ Méthodes.....	p22
2.1/ Activité antibactérienne.....	p22
2.1.1/ Méthode de diffusion des disques sur milieu solide.....	p22
2.1.2/ Méthode de micro dilution sur milieu liquide.....	p24
2.2/ Activité antifongique.....	p25
IV/ RESULTATS ET DISCUSSION.....	p26
1/ Activité antibactérienne.....	p26
1.1/ La méthode de diffusion des disques sur milieu solide.....	p26

1.2/ La méthode de micro dilution sur milieu liquide.....	p33
2/ Activité antifongique.....	P39
2.2/ La méthode de diffusion des disques sur milieu solide.....	P39
2.2/ La méthode de micro dilution sur milieu liquide.....	p40
VI/ DISCUSSION GENERALE.....	p42
VII/ CONCLUSION ET PRESPECTIVES.....	p46
Les références bibliographiques.....	p48
Les annexes	

I/ INTRODUCTION

Les conservateurs constituent un thème récurrent d'interrogations et de débats. Présents dans les aliments, les produits cosmétiques ou les médicaments, les conservateurs sont omniprésents.

Actuellement, les conservateurs constituent une part indispensable des produits que nous consommons. Ceci est dû en partie à la demande croissante des consommateurs en faveur d'un choix plus vaste et de produits pratiques à utiliser, ainsi qu'aux normes de sécurité élevées.

On entend par produit cosmétique toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaire, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes, ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles (PERINN, 2007).

Les conservateurs jouent un rôle essentiel dans la conservation des produits cosmétiques en empêchant les proliférations microbiennes. Les produits présentant les risques les plus élevés de contamination microbienne sont les préparations aqueuses, telles que les solutions, les suspensions et les émulsions.

Les conservateurs sont employés à faible dose en fonction de dispositions légales très strictes.

Les bactéries sont les agents contaminants les plus fréquemment rencontrés dans les produits cosmétiques. Les champignons inférieurs (moisissures, levure) sont moins fréquents.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont les plus souvent isolées des produits cosmétiques avant leur utilisation par le consommateur : cette fréquence s'explique par l'origine hydrique de ces germes. Viennent ensuite les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, puis les bactéries du genre *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* (MARTINI, SEILLER, 1999).

III/ PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

1/ GENERALITES SUR LES CONSERVATEURS:

Notre mode de vie nous incite à utiliser de plus en plus de produits cosmétiques.

Tout au long de l'histoire, les cosmétiques employés dépendaient des périodes, des modes et des matières premières disponibles.

Cependant, l'industrie de ces produits de beauté a des points faibles dans la conservation. Le problème des crèmes est la contamination par des microorganismes. Le problème des huiles est le rancissement.

Les cosmétiques, c'est beaucoup de rêve et de marketing, un principe actif, et tout un monde d'agents conservateurs.

1.1/ Produits cosmétiques :

Généralement, un produit cosmétique est une substance qui n'a aucun effet thérapeutique. Il est défini comme « un article prévu pour être appliqué sur le corps humain, pour le nettoyer, l'embellir, favoriser l'attraction, où le changement de l'aspect se fait sans changement de la structure ou la fonction du corps » (Kenneth, MICHAEL, 2008).

Pour préserver ce produit cosmétique de toute altération physico-chimique et microbienne, des additifs technologiques, naturels ou artificiels sont ajoutés, ces additifs sont étant plusieurs familles :

- conservateurs antimicrobiens : parabènes ou esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, acide sorbique, éthanol, 2-phénoxyéthanol, formol, Triclosan, ammonium quaternaires....
- conservateurs antioxydants : Tocophérol ou vitamine E, huiles essentielles, palmitate d'ascorbyle, gallates...
- stabilisant de viscosité, émulsifiant ...

En ce qui nous concerne, nous allons nous intéresser aux conservateurs antimicrobiens.

1.2/ Définition des conservateurs en cosmétologie :

Selon la Directive Européenne n° 76/768/CEE du 27 juillet 1976 modifiée, les agents conservateurs sont des substances ajoutées comme ingrédients à des produits cosmétiques principalement pour inhiber le développement de microorganismes dans ces produits.

On peut noter cependant que certains ingrédients non classés parmi les conservateurs peuvent posséder des propriétés antimicrobiennes et peuvent de ce fait, contribuer à la conservation des cosmétiques. C'est le cas de nombreuses huiles essentielles et de quelques alcools. (**Journal Officiel de la République Française, 2001**)

1.3/ Mécanisme d'action des conservateurs :

On distingue deux mécanismes d'action suivant le type de conservateur antimicrobien utilisé :

Les conservateurs bactéricides tuent directement les bactéries : c'est une action dite irréversible.

Les conservateurs bactériostatiques inhibent la multiplication des bactéries : c'est une action dite réversible car ils ne tuent pas les microorganismes (**MUSSARD, 2006**).

Dans tous les cas, le conservateur doit agir sur les microorganismes ; tout en préservant les cellules humaines, cette différence de toxicité vis-à-vis de ces deux types de cellules s'explique par leur différence de structure.

Les conservateurs agissent sur les microorganismes de façon différente selon le conservateur considéré, à un niveau bien déterminé de la structure ou du métabolisme du microorganisme appelé site d'action ou cible du conservateur.

L'action peut se situer au niveau de la paroi bactérienne, des membranes au niveau ribosomal sur la synthèse des protéines ou au niveau des acides nucléiques et des enzymes associées (**MARTINI, SEILLER, 1999**).

Ainsi, le formaldéhyde et ses dérivés agissent en formant des ponts méthylène entre les acides aminés constitutifs des protéines membranaires, ce qui déstabilise de manière irréversible les membranes.

Le chlorure de benzéthonium ainsi que les alcools altèrent la membrane des microorganismes en solubilisant les lipides membranaires.

Les acides organiques, eux, déséquilibrent le gradient osmotique à travers la membrane cytoplasmique (DUNN, LUTZ, 2003).

Les mélanges de conservateurs présentent de nombreux avantages comme la possibilité de diminuer la concentration de chaque élément et par la même les éventuels effets secondaires, et augmenter l'efficacité par synergie.

1.4/ Qualités requises d'un conservateur :

Aucun conservateur ne remplit tous les critères d'un système idéal, en pratique on utilise des associations des conservateurs, si le conservateur idéal existait il devrait présenter les critères suivants :

Innocuité :

Le conservateur doit être dénué de tout effet toxique, irritant, sensibilisant au niveau de la peau ou des membranes muqueuses à la concentration utilisée pour la conservation. En pratique les conservateurs les plus efficaces sont souvent les plus toxiques.

Spectre d'activité :

Le conservateur doit présenter un large spectre d'activité à une concentration la plus faible possible.

Solubilité dans l'eau :

Les microorganismes se multiplient en phase aqueuse. Il est donc important que le conservateur se maintienne à concentration efficace dans la phase hydrophile du produit ; d'où l'importance de la solubilité du conservateur dans l'eau.

pH de formulation :

Le conservateur devrait être actif sur toute la gamme du pH de la vie du microorganisme qui va du 1.5 à 11. Mais dont la majorité des préparations cosmétiques, est proche de la neutralité, ce qui permet la meilleure tolérance cutanée (MARTINI, SEILLER, 1999).

Propriétés physiques :

Le conservateur idéal devrait être incolore, inodore et insipide dans le produit final ; on outre, il doit être facile à utiliser et incorporer.

Volatilité :

Les conservateurs devraient être non volatils pour éviter une perte d'activité.

Compatibilité :

Il faut considérer la compatibilité du conservateur avec le processus de fabrication ainsi qu'avec les matériaux de conditionnement.

Stabilité :

Idéalement, le conservateur devrait être hautement stable vis-à-vis de la température, l'air, l'humidité, la lumière, l'eau, le pH..., pour que les conservateurs confèrent ainsi une grande flexibilité d'utilisation dans des procédés de fabrication divers (MUSSARD, 2006).

Efficacité à long terme :

Les conservateurs doivent présenter une activité constante dans le temps, pas dégradable et ne produisent pas des métabolites modifiant les caractéristiques du produit.

Le coût :

Un conservateur doit être rentable et à une base commerciale peu onéreuse (KNOWLTON, PEANCES, 1993).

1.5/ Principaux conservateurs utilisés dans les cosmétiques :

Les conservateurs, molécules très actives, peuvent être sensibilisantes, c'est à dire déclenchent des réactions allergiques. Le taux de sensibilisation varie en fonction de la fréquence de leur utilisation (RASTOGI, 2000).

Le kathon®CG :

C'est un mélange de 5-chloro-2-méthyl-isothiazolinone et de 2-méthylisothiazolinone. Conservateur à large spectre, il est sur le marché depuis 1975. Son emploi est autorisé dans la plupart des pays.

Excellent conservateur anti-bactérien (les bactéries Gram+et Gram-), antifongique, il a été de ce fait trop largement utilisé dans les produits cosmétiques et a été déterminé vers les années 1990, des sensibilisations fréquentes (de 4 à 10% selon les pays européens) qui ont justifié une limitation de son emploi (**FDA, 1996**).

L'Euxyl®K400 :

Ce conservateur est un mélange de deux composés chimiques très différents : le phénoxyéthanol (80%) et le méthyldibromoglutaronitrile (20%). Il était utilisé dans les crèmes de soin, laits, shampooings, gels, mousse de bains et certains produits solaires.

Ce conservateur peut provoquer des eczéma très aigus, notamment du visage (**MUSSARD, 2006**).

Les Parabens :

Sur la base de l'analyse des données de la littérature et des données de pharmacovigilance, il apparaît que les parabens sont peu toxiques et bien tolérés, bien que des réactions allergiques puissent survenir chez certaines personnes (**GAZIN, 2004**).

En 1985 une étude a montré que l'incidence de sensibilité aux cosmétiques contenant des parabens, chez les patients présentant des dermatites, était de 19 sujets sur 713, soit 2,7% (**ADAMS, MAIBACH, 1985**).

Le formaldéhyde et ses dérivés :

Le formaldéhyde et ses dérivés, actifs contre de nombreux microorganismes, sont après les parabens, les conservateurs les plus employés en cosmétique.

o Le formaldéhyde :

Il semble que l'innocuité du formaldéhyde soit actuellement remise en cause. Il est de moins en moins utilisé en cosmétologie où il peut être à la fois irritant et

sensibilisant. Fortement volatil, ses vapeurs sont source d'irritation pour les muqueuses.

Sa présence à faible concentration dans les shampooings et savons entraîne peu d'intolérance du fait du temps de pose court et du rinçage. Par contre, au niveau des ongles où il est utilisé dans les durcisseurs, il peut provoquer des troubles digestifs et des diarrhées (**PONS-GUIRAUD, VIGAN, 2003**).

D'après certaines études, il serait cancérigène chez le rat (**MUSSARD, 2006**).

Une allergie croisée avec un ou plusieurs conservateurs libérateurs de formol peut conforter le diagnostic positif d'allergie au formol (**PONS-GUIRAUD, VIGAN, 2003**), (**ANDERSON, 1995**).

Le formaldéhyde, en plus de son action allergisante. Il est classé comme cancérigène par l'OMS (depuis juillet 2004) (**PERINN, 2007**).

Dans la directive européenne 76/768/CEE modifiée, il est spécifié que tous les produits contenant du formol doivent porter obligatoirement sur l'étiquetage la mention « contient du formaldéhyde » dans la mesure où la concentration en formol du produit fini dépasse 0,05%. La concentration maximale autorisée en formaldéhyde et paraformaldéhyde est de 0,2% dans les cosmétiques, excepté pour les produits destinés à l'hygiène buccale où elle est de 0,1%. Le formaldéhyde et le paraformaldéhyde sont interdits dans les aérosols du fait de leur toxicité pulmonaire.

- Les dérivés du formaldéhyde :

Les aspects négatifs du formol évoqués précédemment ont poussé la recherche en direction d'autres aldéhydes qui en solution aqueuse libéreront la molécule de formaldéhyde. On peut citer comme libérateurs de formol le quaternium15, l'Imidazolidinyl urée, la Diazolidinyl urée, le bronopol, la DiMéthylol DiMéthyl hydantoïne.

Ces « précurseurs » ont l'avantage de provoquer une moindre irritation, présentent une toxicité plus faible, et offrent une plus grande compatibilité avec les autres ingrédients (**MUSSARD, 2006**).

* Le quaternium15 est un ammonium quaternaire bactéricide, et de façon moindre, antifongique. Il est très utilisé en cosmétologie, notamment dans les shampooings, lotion, crèmes et produits d'usage capillaire « colorants en particulier ». La fréquence de sensibilisation est faible et donc à l'origine de peu de dermatites de contact, la

localisation palpébrale étant la plus fréquente. Il n'existe pas forcément d'allergie croisée ou concomitante avec les autres libérateurs de formol.

* L'imidazolidinyl urée est souvent associé aux parabens dans les produits cosmétiques, notamment les lotions hydratantes, les fards à paupières, les gels capillaires. Il peut être allergisant par lui-même ou éventuellement par la libération de formol, la fréquence est cependant assez faible. On observe en général des réactions croisées avec le Diazolidinyl urée (**PONS-GUIRAUD, VIGAN, 2003**).

* Le diazolidinyl urée est souvent associé aux parabens ou à d'autres conservateurs actifs vis-à-vis des champignons. Son pouvoir allergisant semble supérieur à celui de l'imidazolidinyl urée. La sensibilisation peut être due à la fois à la molécule elle-même ou au formol libéré.

* Le bronopol (bromo-2-nitro-2-propan-1,3-diol) est un faible libérateur de formol. Actif essentiellement vis-à-vis des bactéries, il est toujours employé avec d'autres conservateurs et est responsable de très peu de dermatites de contact. Il est employé essentiellement dans les fonds de teint, les produits de maquillage et les produits capillaires. Par voie systémique, il peut provoquer des troubles digestifs et des diarrhées (**PONS-GUIRAUD, VIGAN, 2003**).

Sachant qu'un rouge à lèvres constitue un système anhydre, il y a peu de chance que les microorganismes s'y développent. Cependant, pendant l'utilisation, le produit est régulièrement mis en contact avec la bouche et de ce fait, est soumis à la contamination par les bactéries ou moisissures. Il est courant d'ajouter un conservateur lipophile dans les rouges à lèvres. Ainsi, le butylparaben est parfois utilisé, mais son efficacité contre les microorganismes de surface est limitée, tellement sa lipophilie est importante. C'est pourquoi on lui préfère le bronopol, qui présente une efficacité supérieure, car il agit aussi sur la surface supérieure aqueuse du fait de sa moindre lipophilie (**KNOWLTON, PEANCES, 1993**).

* La DiMéthylol DiMéthyl hydantoïne utilisée dans les cosmétiques, elle semble être sensibilisante dans 1% des cas. Elle peut provoquer des chéilites (**MUSSARD, 2006**).

Les phénols :

Ils sont utilisés en cosmétique depuis le XIX^{ème} siècle. Le taux d'incorporation de ces composés hydrosolubles est inférieur à 2%.

De nombreux phénols, notamment le chloroxylénol et le thymol, sont actifs contre les bactéries et les champignons. Le phénoxyéthanol, qui est un éther de glycol, est l'un des phénols les plus utilisés dans les produits de soin, et est plus particulièrement actif contre les Gram-.

Les tensioactifs quaternaires :

Certains sont antimicrobiens. En raison de leur très bonne solubilité dans l'eau, ils sont destinés à être placés en phase aqueuse. Le chlorure de benzethonium est antibactérien, particulièrement sur les Gram+.

Il est irritant et peut également être sensibilisant. Il peut être à l'origine d'un bronchospasme. Par voie ophtalmique, il entraîne un risque d'altération des lentilles de contact (**PONS-GUIRAUD, VIGAN, 2003**).

Le Chlorure de benzethonium est actif contre les algues et les champignons.

Les alcools :

Les alcools tel que l'éthanol, le chlorobutanol, les alcools dichlorobenzylrique, benzylique, phénylique sont communément employés en raison de leurs propriétés antimicrobiennes. Leurs propriétés dépendent de leurs concentrations. Bien qu'il s'agisse d'un diol, le propylène glycol est rattaché à ce groupe.

L'éthanol et le propylène glycol sont efficaces à une concentration supérieure à 15%. En revanche, l'alcool benzylique et le chlorobutanol sont actifs à des concentrations très nettement inférieures (respectivement 1 à 3%, et 0,5%).

Utilisé comme antiseptique dans la parfumerie et les produits de coiffure, l'alcool benzylique peut provoquer une réaction allergique, immédiate ou retardée, notamment chez les sujets sensibilisés au baume du Pérou, en raison d'une réaction croisée (le baume du Pérou est d'ailleurs désormais interdit en cosmétologie). L'alcool benzylique est contre indiqué chez les enfants de moins de 3 ans (**MUSSARD, 2006**).

Les composés organiques :

De nombreux composés organiques sont antimicrobiens, tels que les acides benzoïque et sorbique, le benzoate de sodium et le sorbate de potassium.

L'acide benzoïque et benzoate peuvent causer par voie topique de faibles irritations de la peau, des yeux et des muqueuses (en outre, ils peuvent augmenter le risque de jaunisse chez le nouveau-né par voie parentale).

L'acide sorbique est irritant pour les yeux et la peau mais peu sensibilisant. Il peut cependant provoquer une urticaire de contact (**PONS-GUIRAUD, VIGAN, 2003**).

2/ LES CONSERVATEURS ETUDIÉS

Notre travail a porté sur quatre conservateurs : Le Diazolidinyl urée, l'Imidazolidinyl urée, le bromure de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium et le Germaben II.

Ces conservateurs sont ajoutés comme substances antimicrobiennes dans de nombreux produits cosmétiques comme les produits de soins de la peau, les shampooings, les bains moussants.....

Nous allons présenter ces conservateurs dans leur ensemble, nous ferons leur description tout en évaluant leurs avantages, leurs inconvénients et leur toxicité.

Présentation chimique**2.1/ Le Diazolidinyl urée (Germall II):**

Le Diazolidinyl urée est un conservateur antimicrobien très actif contre les bactéries gram positives et gram négatives surtout contre le *Pseudomonas*, les levures et les moisissures. Il est utilisé dans de nombreux produits pharmaceutiques et cosmétiques comme produits de soins de la peau, shampooings, bains moussants, lingettes pour bébés ainsi que des détergents ménagers (**ROBERT et coll., 1997**). Il est commercialisé sous le nom de Germall II.

Nom chimique :

N-[1,3-bis (hydroxyméthyl)-2,5-dioxo-4-imidazolidinyl]- N,N' - bis(hydroxyméthyl)-urée (**PERRET, HAPPLE, 1988**).

Structure chimique :

Le diazolidinyl urée est une poudre blanche, fine, très soluble dans l'eau, formé d'un hétérocycle d'imidazolidinyl urée, libéré 4 groupements de formaldéhyde. (KNOWLTON, PEANCES, 1993).

Le diazolidinyl urée est un produit stable avec une compatibilité avec les composants ioniques, non ioniques et protéiques. (GEIS PHILIP, 2006).



Figure n°1: Structure du Diazolidinyl urée

Formule brute : $C_8H_{14}N_4O_7$

Masse molaire : 278,22 g/mole

Synthèse

Le diazolidinyl urée est produit par réaction chimique de l'allantoïne avec le formaldéhyde, en présence de solution d'hydroxyde de sodium et de chaleur. Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé avec de l'acide chlorhydrique suivi d'évaporation (KANTOR et coll., 1985).

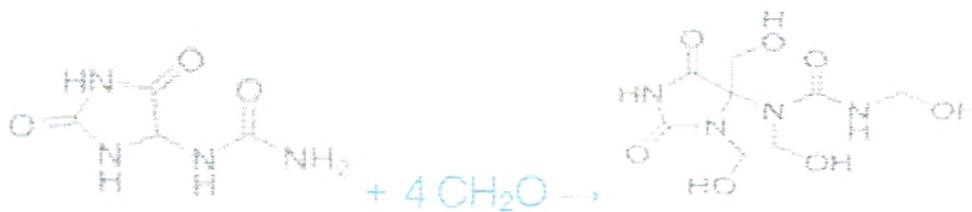


Figure n°2: la réaction de formation de Diazolidinyl urée

Toxicité

Certaines personnes présentent des allergies de contact à l'imidazolidinyl urée. Ces personnes sont souvent allergiques au diazolidinyl urée. Ce dernier est classé aux Etats-Unis parmi les 20 produits les plus allergènes (tableau01).

Le diazolidinyl urée a récemment été classé par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) comme substance cancérigène pour l'homme.

Ce conservateur est utilisé dans les produits cosmétiques à des faibles concentrations (0,1% à 0,3%) afin de minimiser leur toxicité et leur pouvoir allergène (Robert et coll., 1997) et de 0,1% à 0,5% 0 la combinaison avec les parabens (GEIS PHILIP, 2006).

Le diazolidinyl urée provoque une toxicité cutané LD₅₀ est de 2.57 g/kg pour le rat, et une toxicité oral aigu LD₅₀ >2.0 g/kg pour le lapin (GEIS PHILIP, 2006).

Tableau n°1: Produits allergènes les plus fréquents aux Etats-Unis (2003-2004)
(DONALD, 2008)

Allergènes	Nombre de Patients testés	Pourcentages de réactions positives
sulfate de Nickel	5129	18,7
sulfate de Néomycine	5137	10,6
Baumier du pérou (Myroxylon pr)	5140	10,6
Fragrance mix ^e	5140	9,1
Quaternium-15	5139	8,9
Thiosulfate d'or et de sodium	5106	8,7
Formaldehyde	5142	8,7
Cobalt	5141	8,4
Bacitracine	5143	7,9
Methyldibromoglutaronitrite/phenoxythanol	5140	6,1
Para-phenylenediamine	5136	4,7
Thiuram mix ^d	5141	4,6
Potassium dichromate	5142	4,3
Carba mix ^e	5142	4,0
Diazolidinyl urée	5139	3,5
Propylene glycol	5143	3,3
Imidazolidinyl urée	5139	2,9
Rosin (colophony)	5143	2,8
Tixocortol-21-pivalate	5142	2,7
Ethylene diamine dihydrochloride	5143	2,4
2-bromo-2-nitropane-1,3-diol	5140	2,3

2.2/ Imidazolidinyl urée (Germall 115) :

Largement utilisé dans les cosmétiques, l'imidazolidinyl urée est plus actif contre les bactéries gram négatives que les champignons et est souvent combiné avec les parabens pour fournir un système de conservation à large spectre (BLOCK, 1993).

En raison de sa forte solubilité dans l'eau, l'imidazolidinyl urée peut être incorporé dans pratiquement tous les produits cosmétiques à base d'eau (CARIANT, 2002).

Il est commercialisé sous différents noms : Germall 115, Biopure 100, Euxyl K 200. (GEIS PHILIP, 2006).

Nom chimique

N, N'-méthylène bis [N'-[3-(hydroxyméthyl)-2,5-dioxo-4-imidazolidinyl] Urée.

Structure chimique

Imidazolidinyl urée est une poudre blanche, stable, à une température $>160^{\circ}\text{C}$ se dénature en libérant le formaldéhyde (une molécule d'imidazolidinyl libère deux molécules de formaldéhyde). (GEIS PHILIP, 2006).



Figure n°3: Structure chimique d'Imidazolidinyl urée

Formule brute: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_8$

Masse molaire : **388,29 g/Mole**

Synthèse

L'imidazolidinyl l'urée est produit par mélange de l'allantoïne et du formaldéhyde. Dans ce processus, l'allantoïne, le formaldéhyde, en présence de l'hydroxyde de sodium, sont portés à reflux pendant une heure. La solution obtenue est condensée par l'ajout de l'acide acétique et devient un liquide visqueux, puis ensuite séchée à 7°C pour avoir le produit final.

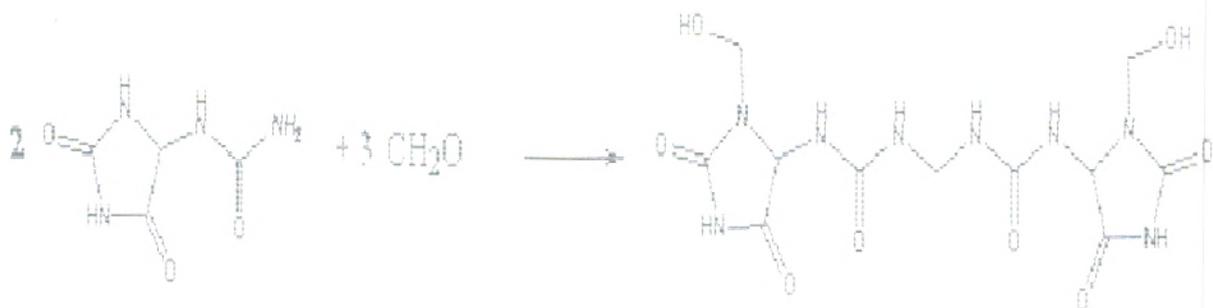


Figure n°4: la réaction de formation d'imidazolidinyl urée

Toxicité

L'imidazolidinyl urée libère une petite quantité de formaldéhyde et par conséquent pose peu de risque de formaldéhyde à des sujets sensibles. Des allergies de contact de l'imidazolidinyl urée se produisent de temps en temps (**DOOMS-GOOSSENS et coll., 1986**), mais ces doses létale reste les même que le diazolidinyl urée pour une toxicité cutané aigu LD_{50} , 2.57 g/kg pour le rat et une toxicité oral aigu LD_{50} >2 g/kg pour le lapin (**GEIS PHILIP, 2006**).

Une étude britannique menée entre 1982-1993 a montré que sur 5167 patients atteints de dermatite de contact, la fréquence de l'allergie à l'imidazolidinyl urée était de 0,99%. En outre, le visage et les mains ont été les sites de l'allergie des patients respectivement 69% et 19% (**JACOBS et coll., 1995**).

Leur utilisation dans les produits cosmétiques est limitée de 0,1% à 0,6% (**NCI, 2004**), à la combinaison avec d'autre conservateur l'intervalle d'utilisation est diminué, devient de 0,1% à 0,5% (**GEIS PHILIP, 2006**).

2.3/ bromide N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium :

le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium est un antimicrobien. En solution, ce composé est utilisé comme antiseptique pour désinfecter la peau et stériliser les instruments chirurgicaux (DWIVIDI et coll., 2006).

Structure chimique :



Figure n°5 : Structure chimique de bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium

Formule brute: $C_{19}H_{42}NBr$

Masse molaire: 364.087 g/mole

Synthèse :

Le bromure cetyl-triméthyl ammonium est préparé par l'interaction du bromure cétylique ($C_{16}H_{33}Br$) et la triméthylamine (C_3H_9N) (DWIVIDI et coll., 2006).

Solubilité :

Il est soluble dans l'alcool, le chloroforme, et l'éthylène glycol, mais légèrement insoluble dans l'éther, l'éther de pétrole, l'acétone, l'éther acétique, le benzène, et le glycérol (HOOPERHEIDE, 1944).

2.4/ Germaben II:

Germaben II est un conservateur anti-microbien à large spectre, pour les produits de soin tels que shampooings, lotions, crèmes, laits pour le corps , très efficace contre les bactéries et les levures, et n'a pas besoin d'être associé à d'autres conservateurs. C'est un liquide clair et visqueux soluble dans les émulsions d'huile/eau et des formules aqueuses jusqu'à un niveau de 1,0%. Il contient du propylène glycol (56%), diazolidinyl urée (30%), méthylparabène (11%) et propylparaben (3%).

C'est un liquide incolore avec une légère odeur. L'odeur n'est pas répréhensible.

Le propylène glycol (propan-1,2-diol) appelé aussi 1,2-propanediol, 1,2-dihydroxypropane, méthyl glycol, et triméthyl glycol est un produit chimique utilisé principalement comme additif alimentaire et considéré comme généralement non toxique

Structure chimique : (CHRISTOPHE, LEPOITTEVIN, 2007)



Figure n°6 : Structure chimique de propylène glycol

Formule brute: $C_3H_8O_2$

Masse molaire : **76.074 g/mole**

Les parabènes sont des esters (de méthyle, d'éthyle, de propyle, de butyle), ce groupe de préservatifs a été employé pour plus de 60 ans et largement dans les produits cosmétiques.

III/ MATERIEL ET METHODES :

Ce travail a été effectué au laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.

1/ MATERIEL :

1.1/ Les produits testés :

Quatre conservateurs de synthèse ont fait l'objet de l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique à savoir : le Diazolidinyl urée; l'Imidazolidinyl urée; le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium et le Germaben II.

1.2/ Les souches utilisées :

Les souches des bactéries qui ont fait l'objet des tests antimicrobiens ont été fournies par l'équipe de microbiologie du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen. Les bactéries utilisées sont des souches de références :

Deux souches à gram négative :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.

Une souche à gram positive :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Après obtention des souches, un repiquage mensuel a été pratiqué.

L'évaluation de l'activité antifongique des conservateurs a été réalisée vis-à-vis de la levure de référence *Candida albicans* ATCC 10321. Cette souche a été fournie par l'équipe de microbiologie du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen. Le maintien de la souche est réalisé par repiquage successif sur gélose sabouraud et par conservation à 4°C.

1.3/ Les milieux des cultures :

La culture des souches bactériennes est menée sur un bouillon nutritif de composition suivante :

- Peptone.....15 g/l
- Chloride de sodium6 g/l
- Extrait de levure.....3 g/l
- Glucose D (+).....1g/l
- Eau distilléeqsp 1L
- Le pH = $(7,2 \pm 0,2)$ à 37°C

L'ensemble est suite stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15min.

La culture de la levure est menée sur un milieu sabouraud liquide de composition suivante :

- Glucose..... 20 g/l
- Peptone.....10 g/l
- Extrait de levure.....3 g/l
- Eau distilléeqsp 1L
- Le pH = $(5,6 \pm 0,2)$ à 37°C.

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

2/ METHODES :

Deux techniques ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos produits :

- La technique de diffusion des disques sur milieu solide.
- La technique des micro-dilutions sur milieu liquide.

2.1/ Activité antibactérienne :

2.1.1/ Méthode de diffusion des disques sur milieu solide :

C'est une technique qualitative, basée sur les propriétés diffusives des produits sur le milieu gélosé.

Le milieu de culture utilisé pour l'évaluation de l'activité antibactérienne est la gélose Mueller Hinton, qui est considéré comme un milieu de référence pour les tests antibactériens du fait qu'il contient tous les éléments requis pour une bonne croissance des bactéries. **(NCCLS, 2006)**

La préparation du milieu a été réalisée selon les instructions du fabricant (voir annexe 1).

Les étapes de la réalisation de cette technique sont comme suit :

Une série de disques en papier filtre Whatman n°3 de 6 mm de diamètre **(AWADH ALI et coll., 2001)** a été préparée et stérilisée à 121°C pendant 15 minutes. Ces mêmes disques ont été imprégnés par 10µl de différentes concentrations des produits à tester **(ELGORASHI et VAN STADEN, 2004)**.

Pour cela, une série de dilutions de chaque produit est préparée: 16% (0,16g/ml), 8% (0,08g/ml), 4% (0,04g/ml), 2% (0,02g/ml), 1% (0,01g/ml), 0,5 % (0,005g/ml), 0,25 % (0,0025g/ml), 0,125% (0,00125g/ml).

La préparation de l'inoculum est réalisée à partir d'une pré-culture de 18-24 h sur milieu gélosé (figure n°9). 4 ou 5 colonies de 1mm de diamètre d'une culture pure ont été suspendues dans un bouillon nutritif ; en suite, la suspension est ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre à ce qui correspond à une Densité Optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625nm, le 0,5McFarland est équivalent à 10^8 UFC/ml **(NCCLS, 2006)**.

L'inoculum ainsi préparé est ensuite dilué au 1/100^{ème} dans l'eau physiologique. La densité finale des colonies obtenues est équivalente à 10⁶ UFC/ ml pour la technique de diffusion des disques sur milieu solide (SCHWALBE et coll., 2007).



Figure n°9 : la pré-culture de la souche d'*Escherichia coli*

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à partir de l'inoculum préparé précédemment (10⁶UFC/ml). En suite, à l'aide d'une pince, les disques imprégnés par les produits à tester sont transférés dans les boîtes inoculées. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

La mesure des zones d'inhibition, est réalisée en prenant la moyenne de trois mesures de diamètre différentes. L'activité antimicrobienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm, et selon le diamètre de la zone d'inhibition on a :

Une très forte activité; le diamètre est ≥ 30 mm

Une forte activité ; le diamètre est d'ordre 21-29mm

Une activité moyenne ; le diamètre est d'ordre 16-20mm

Une faible activité ; le diamètre est d'ordre 11-15mm

Une très faible activité ; le diamètre est ≤ 10 mm (MALA et coll., 2008; PAERK et coll., 2006).

2.1.2/ Méthode de micro dilution sur milieu liquide :

A la différence de la méthode de diffusion, la méthode de dilution est une technique quantitative qui permet d'évaluer la concentration minimale des nos produits, capable d'inhiber la croissance bactérienne (CMI) et puis de déduire la concentration minimale bactéricide(CMB). C'est une méthode qui permet la mise en contact entre les produits à tester et les souches bactériennes utilisées.

La préparation de l'inoculum se fait de la même manière que celle de la première méthode.

La préparation de la microplaque est réalisée de la manière suivante:

- Une série de dilutions à partir d'une concentration mère de 50mg/ml, est préparée directement dans une microplaque stérile toute en respectant les conditions d'aseptise.

Ensuite, chaque puits est inoculé avec une quantité de 0,1 ml de l'inoculum préparé précédemment. La concentration de l'inoculum finale est réduite à $5 \cdot 10^5$ UFC/ml. La microplaque est couverte est incubée à 37°C pendant 24h (SCHWALBE et coll., 2007).

- La Gentamycine a été utilisée comme antibiotique de référence (TIWARI et coll., 2006).
- Les puits contrôles ont été remplis par 0,2 ml de bouillon seul pour le contrôle négatif et 0,2 ml de l'inoculum pour le contrôle positif.

La lecture est effectuée à l'œil nu, la CMI est la plus faible concentration auquel aucun trouble visuel n'est observé.

La détermination de la CMB se fait à partir des résultats des microplaques, par l'ensemencement sur GN, de 50µl de 5 puits, deux fois supérieur et deux fois inférieur au puits de la CMI. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24h (SCHWALBE et coll., 2007).

La lecture est effectuée à l'œil nu, la CMB est la plus faible concentration de la substance testée auquel le nombre des colonies est inférieur à 0,1%.

2.2/ Activité antifongique:

L'évaluation de l'activité antifongique vis-à-vis de la levure *Candida albicans* par la méthode des diffusions est réalisée de la même manière que celle décrite pour les bactéries sauf que le milieu de culture utilisé est le Mueller Hinton additionné de 2% de glucose et de 0,5µg/ml de bleu de méthylène à un pH de 7,2 à 7,4 (SCHWALBE et coll., 2007).

L'inoculum est préparé par la suspension dans l'eau physiologique de 4 ou 5 colonies de 1mm de diamètre d'une pré-culture de la levure, ensuite la suspension est ajustée par dénombrement sur la cellule de Thoma à l'aide d'un microscope photonique. L'inoculum ajusté est d'ordre de $1-5 \cdot 10^5$ UFC/ml.

L'évaluation de l'activité antifongique de nos produits vis-à-vis de *Candida albicans* par la méthode des micro-dilutions, est réalisée en suivant les mêmes étapes que celles décrites pour les bactéries. Le milieu de culture utilisé dans ce cas est le bouillon RPMI qui est considéré comme milieu type pour les tests vis-à-vis de *Candida albicans*.

Dans cette méthode, des dilutions à partir de l'inoculum de $1-5 \cdot 10^5$ UFC/ml ont été réalisées afin d'obtenir un inoculum de l'ordre de $1-5 \cdot 10^3$ UFC/ml. Ce dernier sera réduit à une concentration finale de $5-25 \cdot 10^2$ UFC/ml lors de l'inoculation des puits (SCHWALBE et coll., 2007).

La micro plaque est incubée à 30°C pendant 24h, la lecture se fait de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

IV/ RESULTATS ET DISCUSSION:

Le choix des souches d'études dépend du but spécifique de notre travail; qui est l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de nos produits vis-à-vis de différentes classes de micro-organismes pathogènes, et ce afin de comprendre la réaction de nos produits vis-à-vis d'une large gamme des souches disponibles. Ce qui nous amène à choisir une souche à gram positive (*Staphylococcus aureus*) deux souches à gram négatives (*Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*) et une levure (*Candida albicans*).

En plus ces mêmes souches ont servi comme modèles de référence dans plusieurs études d'évaluation antimicrobienne de nombreux produits (AHMAD et coll., 2006, AHMAD et BEG, 2001).

1/ ACTIVITE ANTIBACTERIENNE :

1.1/ La méthode de diffusion des disques sur milieu solide:

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à étudier l'activité antibactérienne de nos produits par la méthode de diffusion des disques sur le milieu solide qui est une technique qualitative qui nous révèle la présence ou l'absence de l'activité antibactérienne vis-à-vis les souches utilisées.

Les résultats des tests préliminaires, représentés dans les tableaux n° 2, 3, 4 ; montrent que les quatre produits : l'imidazolidinyl urée ; diazolidinyl urée ; germaben II et le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium montrent une activité antibactérienne vis-à-vis des trois souches de bactéries : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ; et que les diamètres des zones d'inhibitions sont en corrélation avec les concentrations des produits dans les disques.

Les résultats obtenus vis-à-vis de la souche *Escherichia coli* (tableau n°2, figures n° 10, 11,12), révèlent que les meilleurs résultats à des activités fort et moyennes, sont obtenus avec les produits diazolidinyl urée (21,5 mm) et le imidazolidinyl urée (20,0 mm); et ce la à la concentration de 160mg/ml. Cependant les produits germaben II et le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium révèlent à la même concentration une faible et pas d'activité respectivement.

L'imidazolidinyl urée et le diazolidinyl urée sont les produits les plus intéressants par rapport au deux autres produits et ceci vis-à-vis de la souche *Escherichia coli* ; étant donné que l'activité antibactérienne se maintient jusqu'à la concentration de 5 mg/ml (6,5mm) et 10 mg/ml (8,5mm) respectivement.

Le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium est le produit qui n'a révélé aucune activité vis-à-vis de la souche *Escherichia coli*.

Tableau n°2 : résultats des diamètres des zones d'inhibitions en (mm) vis-à-vis d'*Escherichia coli*

Concentrations par disque	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben II	Le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium
160 mg/ml	20,0	21,5	12,5	6
80 mg/ml	19,5	21,0	11,5	6
40 mg/ml	16,0	16,0	6,5	6
20 mg/ml	13,0	11,0	6	6
10 mg/ml	10,0	8,5	6	6
5 mg/ml	6,5	6	6	6
2,5 mg/ml	6	6	6	6
1,25 mg/ml	6	6	6	6



Figure n°10 : les zones d'inhibitions de l'Imidazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis d'*Escherichia coli*



Figure n°11 : les zones d'inhibitions de Diazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis d'*Escherichia coli*



Figure n°12 : les zones d'inhibitions de Germaben II à différentes concentrations vis-à-vis d'*Escherichia coli*

Les résultats des zones d'inhibitions vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa* présentés dans le tableau n°3 (figures n° 13, 14) montrent que les quatre produits : imidazolidinyl urée ; diazolidinyl urée ; germaben II; bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium ont une activité antibactérienne sur cette souche.

L'imidazolidinyl urée et le diazolidinyl présentent l'activité antimicrobienne la plus élevée à la concentration de 160mg/ml, avec une activité antimicrobienne moyenne, vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, à la concentration de 5mg/ml, l'imidazolidinyl urée présente toujours la meilleure activité (zone d'inhibition de l'ordre de 7,5 mm) ; Cependant les autres produits, à la même concentration de 5mg/ml, ne révèlent aucune activité antibactérienne.

Le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium montre avec le Germaben II les plus faibles activités vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau n°3 : résultats des diamètres des zones d'inhibitions en (mm) vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

concentrations par disque	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben II	Le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium
160 mg/ml	16,0	17,0	11,5	9,5
80 mg/ml	15,5	16,0	11,0	8,0
40 mg/ml	14,0	15,0	8,5	7,5
20 mg/ml	12,5	12,0	7,5	6,5
10 mg/ml	9,0	9,0	6	6
5 mg/ml	7,5	6	6	6
2,5 mg/ml	6	6	6	6
1,25 mg/ml	6	6	6	6



Figure n°13 : les zones d'inhibitions de l'Imidazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*



Figure n°14 : les zones d'inhibitions de Diazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*



Figure n°15 : les zones d'inhibitions de Germaben II à différentes concentrations vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats (tableau n°4 ; figure n°16,17) de l'évaluation de l'activité des quatre produits vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* montrent que les meilleures zones d'inhibition ont été obtenues avec les produits : diazolidinyl urée (38,0 mm) et imidazolidinyl urée (34,0 mm) à la concentration de 160mg/ml avec une activité antibactérienne très forte.

On remarque aussi qu'à la concentration de 10mg/ml imidazolidinyl urée et diazolidinyl urée ne montrent aucune activité antibactérienne.

Le produit de bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium montre une activité moyenne (13.5 mm) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* à la concentration de 160mg/ml. Cette activité diminue légèrement dans l'intervalle de concentration 160-1,25 mg/ml.

Tableau n°4 : résultats des diamètres des zones d'inhibitions en (mm) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Concentrations par disque	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben II	Le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium
160 mg/ml	34,0	38,0	17,0	13,5
80 mg/ml	24,0	29,0	15,0	12,0
40 mg/ml	19,5	17,5	6,5	11,0
20 mg/ml	10,0	9,0	6	11,0
10 mg/ml	6	6	6	10,0
5 mg/ml	6	6	6	10,0
2,5 mg/ml	6	6	6	10,0
1,25 mg/ml	6	6	6	8,5



Figure n°16 : les zones d'inhibitions de l'Imidazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*



Figure n°17 : les zones d'inhibitions de Diazolidinyl urée à différentes concentrations vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Les testes de l'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des disques nous a montré que tous les produits testés ont une activité antibactérienne vis-à-vis des trois souches de bactéries utilisées, à l'exception de bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium, qui même à la concentration de 160mg/ml ne présente aucune activité vis-à-vis d'*Escherichia coli*.

Les produits les plus actifs sur les trois souches de bactéries sont l'imidazolidinyl urée et le diazolidinyl urée. Ces résultats sont proches les uns aux autres ; par contre le germaben II et le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium ont montré des faibles activités comparativement avec les deux autres produits précédents.

1.2/ La méthode de micro dilution sur milieu liquide :

Dans cette partie du travail, les produits : l'imidazolidinyl urée, diazolidinyl urée, germaben II et le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium ont été étudiés par la méthode de micro-dilution sur milieu liquide TSB afin de connaître les CMI et CMB de ces produits vis-à-vis des souches : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Les résultats de l'étude de la CMI et CMB des quatre produits testés vis-à-vis d'*Escherichia coli*, présentés dans le tableau n°5 (figure n°18), montrent que la meilleur CMI a été obtenue avec le produit le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium suivie de l'imidazolidinyl urée, le diazolidinyl urée et en fin le germaben. Le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium a montré une CMI plus basse que celle de l'antibiotique de référence : la gentamycine, alors que les autres produits : l'imidazolidinyl urée, le diazolidinyl urée et le germaben ont montré des CMI plus élevées que celle de la gentamycine.

Les résultats du tableau n°5 montrent aussi une concordance entre la CMI et la CMB des deux produits : l'imidazolidinyl urée et le diazolidinyl urée. Ce qui nous fait penser que ces deux produits ont un niveau identique d'activité antibactérienne vis-à-vis d'*Escherichia coli*.

Les plus basses CMI ont été obtenues avec le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium qui est de l'ordre de 0,0061mg/ml. Ceci nous ramène à dire que le N cetyl triméthyl ammonium bromide est le produit le plus actif vis-à-vis d'*Escherichia coli*.

Tableau n° 5 : résultats des CMI et CMB en (mg/ml) vis-à-vis d'*Escherichia coli*

Les concentrations	Gentamicine	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben II	Le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium
CMI (mg/ml)	0,01	1,562	1,562	3,125	0,0061
CMB (mg/ml)	0,01	1,562	1,562	3,125	0,0122

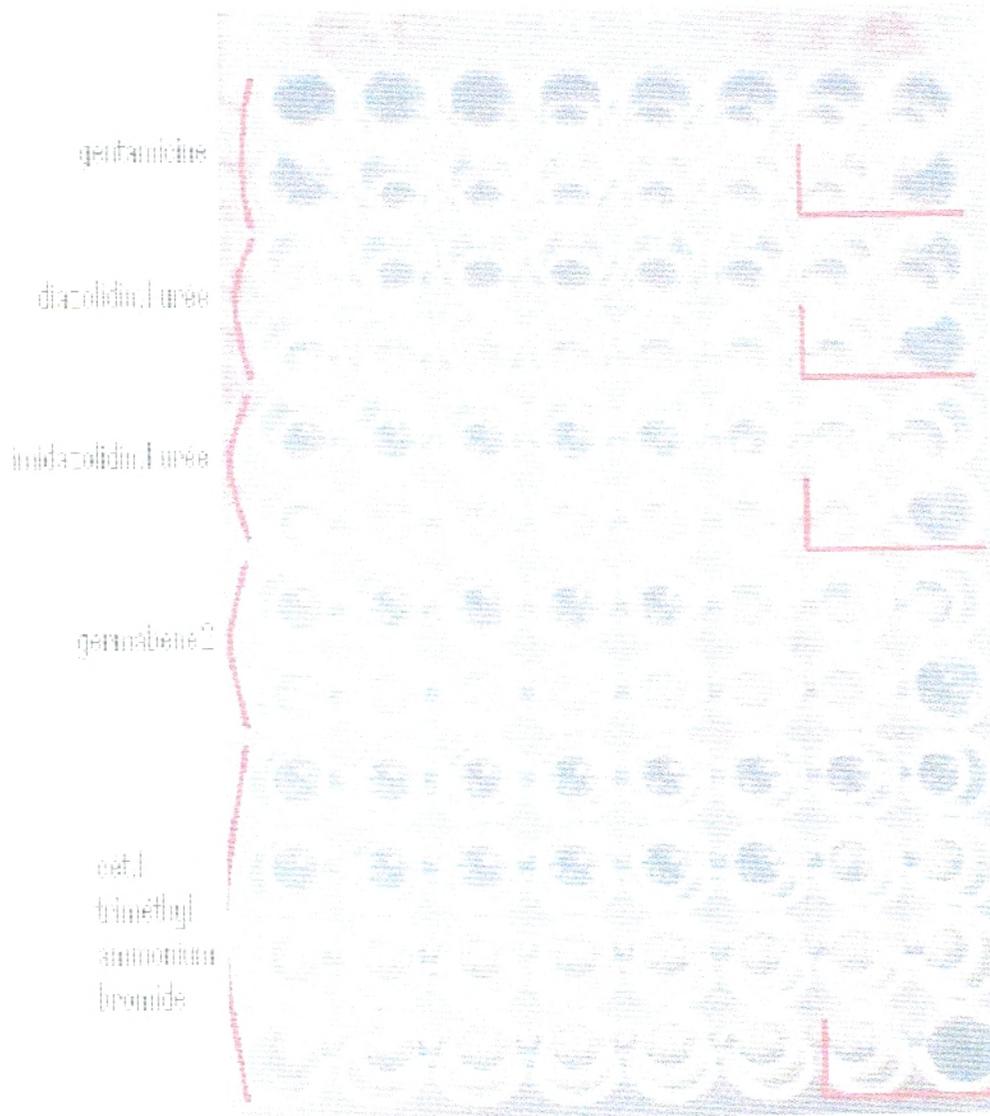


Figure n°18 : résultats des CMI des produits vis-à-vis
d' *Escherichia coli*

Les résultats des CMI et CMB de nos quatre produits vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* (tableau n°6, figure n°19) montrent que l'imidazolidinyl urée, diazolidinyl urée, germaben II et le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium ont une activité antibactérienne moins forte que celle de la gentamicine vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats de la CMI et de la CMB par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide est en accord avec les résultats de la méthode de diffusion des disques sur milieu solide où l'imidazolidinyl urée et le diazolidinyl urée sont les plus actifs (CMI et CMB = 1,562 mg/ ml), par contre le germaben II et le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium sont les moins actif.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* a montré la résistance la plus forte vis-à-vis du produit, le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium.

Tableau n° 6: résultats des CMI et CMB en (mg/ml) vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

Les concentrations	Gentamicine	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben II	Le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium
CMI (mg/ml)	0,0012	1,562	1,562	6,25	3,125
CMB (mg/ml)	0,0012	1,562	1,562	6,25	6, 25

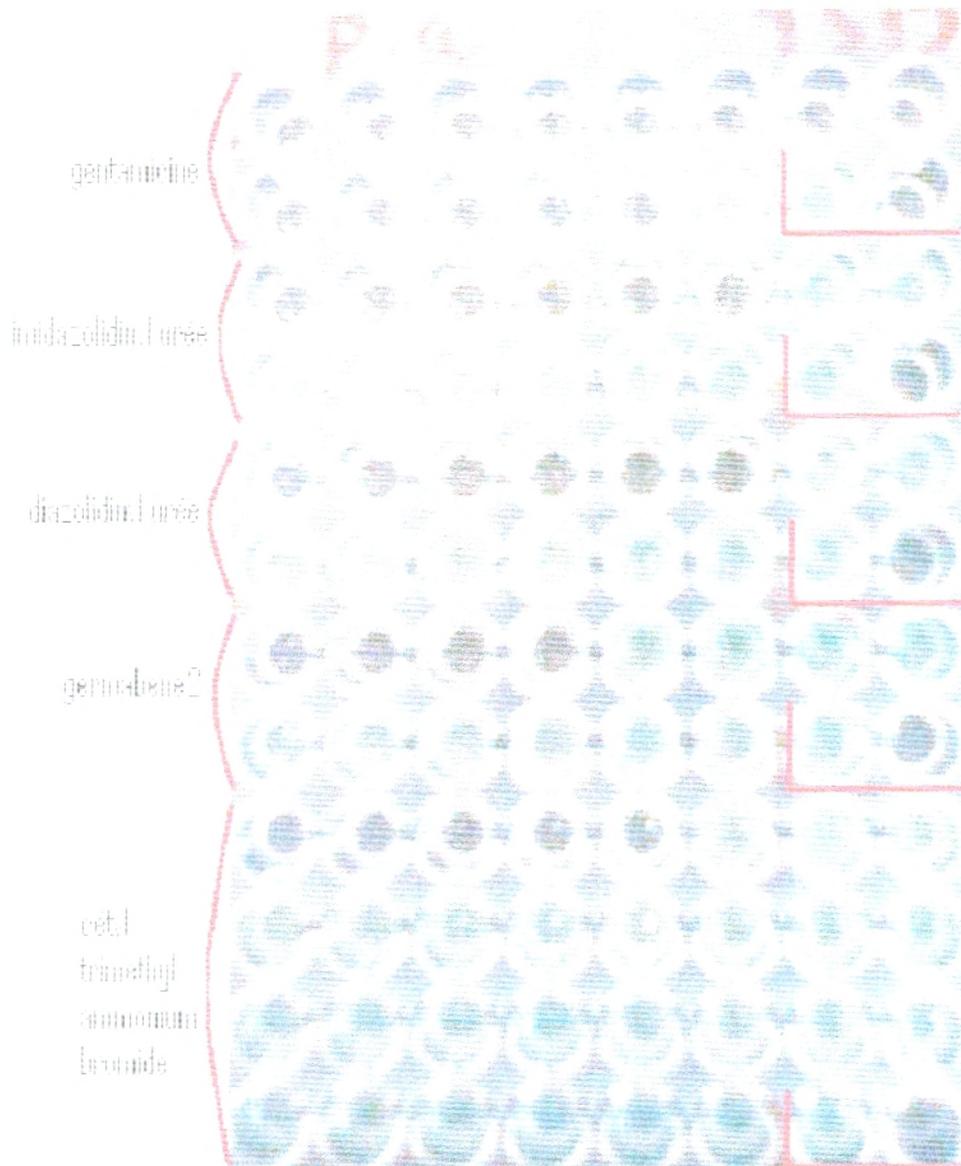


Figure n°19 : résultats des CMI des produits vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

De même, nos résultats des CMI des produits diazolidinyl urée et l'imidazolidinyl urée vis-à-vis d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* (tableaux n° 9, 10) sont en accord avec les résultats obtenus par **GEIS PHILIP, 2006**.

Par contre, les résultats obtenus vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* sont écartés que celles obtenus par **GEIS PHILIP, 2006** et ceci pour les deux produits : le diazolidinyl urée et l'imidazolidinyl urée.

Tableau n° 8: Comparaison des CMI et CMB du bromide cétyl triméthyl ammonium en mg/ml dans le Bouillon Trypticase Soja (TSB) et le bouillon Mueller Hinton (MH).

Les souches		Les milieux des cultures		
		TSB (Nos résultats)	TSB (NICOLETTI et coll., 1993)	MH (NICOLETTI et coll., 1993)
<i>Escherichia coli</i>	CMI	0,0061	0,016	0,016
	CMB	0,0122	0,016	0,016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMI	3,125	>1,024	0,512
	CMB	6,25		>1,024
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMI	-	0,128	0,128
	CMB	-	0,256	0,128

Tableau n°9 : la CMI et CMB (mg/ ml) de Diazolidinyl urée.

Inoculum (10 ⁵ UFC/ml)	CMI	CMI	CMB
	(Nos résultats)	(GEIS PHILIP, 2006)	(GEIS PHILIP, 2006)
<i>Escherichia coli</i>	1,562	1	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,562	1	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,562	0,25	1

Tableau n°10 : la CMI et CMB (mg/ ml) de Imidazolidinyl urée.

Inoculum (10^6 UFC/ml)	CMI (Nos résultats)	CMI (GEIS PHILIP, 2006)	CMB (GEIS PHILIP, 2006)
<i>Escherichia coli</i>	1,562	2	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,562	2	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,02	1	2

2/ ACTIVITE ANTIFONGIQUE :

2.1/ la méthode de diffusion des disques sur milieu solide:

Les tests préliminaires de l'évaluation de l'activité antifongique des quatre produits : l'imidazolidinyl urée, diazolidinyl urée, germaben II et le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium vis-à-vis de la levure *Candida albicans*, ont été réalisés par la méthode de diffusion des disques milieu solide. Le milieu de culture utilisé est la gélose Mueller Hinton additionnée de 2% de glucose et de 0,5% de bleu de méthylène (SCHWALBE et coll., 2007).

Les résultats (tableau n°11) montrent une absence d'activité des trois produits : imidazolidinyl urée, diazolidinyl urée, germaben II et que seul le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium qui révèle une moyenne activité antifongique (13,5 mm) vis-à-vis de la levure *Candida albicans*, et ce à la concentration de 160mg/ml, mais reste actif même à des basse concentrations a 5mg/ml on a une zone d'inhibition de 7mm.

Tableau n°11 : résultats des diamètres des zones d'inhibitions (mm) vis-à-vis de *Candida albicans*.

Concentrations par disque	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben II	le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium
160 mg/ml	6	8,5	6	13,5
80 mg/ml	6	6	6	11,0
40 mg/ml	6	6	6	10,0
20 mg/ml	6	6	6	9,5
10 mg/ml	6	6	6	8,0
5 mg/ml	6	6	6	7,0
2,5 mg/ml	6	6	6	6
1,25 mg/ml	6	6	6	6

2.2/ la méthode de micro dilution sur milieu liquide :

Les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique par la méthode de micro dilution sur milieu liquide (tableau n°12) montrent que des quatre produits testés, la meilleure CMI (0,00019mg/ml) a été obtenue avec le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium. Cependant, les produits : imidazolidinyl urée, diazolidinyl urée et le germaben II montrent des CMI très rapprochées (3,125-1,562 mg/ml) et beaucoup plus élevées que celles obtenues avec le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium.

Ainsi, d'après l'étude réalisée par **NICOLETTI et coll., 1993**, la CMI du produit bromide N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium vis-à-vis de la souche *Candida albicans* était de l'ordre de 0,032 mg/ ml.

Selon **GEIS PHILIP, 2006**, les CMI des produits : l'imidazolidinyl urée et le diazolidinyl urée vis-à-vis de *Candida albicans* sont égale à 8 mg/ ml.

Toutefois, ces résultats ne peuvent pas être comparés avec nos résultats en raison de la forte concentration de l'inoculum utilisés dans ces études (10^6 UFC/ml).

En plus, les quatre produits ont révélé des valeurs des CMI identiques à celles des CMB.

Tableau n° 12: résultats des CMI et CMB en (mg/ml) vis-à-vis de *Candida albicans*.

Concentrations	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben II	le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium
CMI (mg/ml)	3,125	3,125	3,125	0,00019
CMB (mg/ml)	3,125	3,125	3,125	0,00019

VI/ DISCUSSION GENERALE :

L'usage des agents conservateurs d'origine synthétique dans les produits cosmétiques est une procédure importante pour le maintien de la qualité microbiologique ainsi que chimique des produits cosmétiques.

L'objectif de notre travail est l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des quatre conservateurs: imidazolidinyl urée, diazolidinyl urée, germaben II, le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium. Ces produits sont utilisés comme des agents conservateurs en produits cosmétiques.

Dans un premier temps nous avons évalué l'activité antibactérienne de ces produits vis-à-vis de trois souches de bactéries : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Dans un deuxième temps ces mêmes produits ont été testés vis-à-vis de la levure *C. albicans*. Deux techniques ont été utilisées dans nos tests : la méthode de diffusion des disques qui est une technique qui nous révèle des résultats préliminaires et la méthode des dilutions qui est une méthode quantitative qui nous donne les valeurs exactes des concentrations minimales inhibitrices ou bactéricides.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne sur le milieu liquide a montré des résultats plus fiables que ceux obtenus sur le milieu solide, à cause du contact direct des conservateurs avec les souches et la grande solubilité de ces produits dans les milieux aqueux ; ceci explique l'utilisation de ces conservateurs dans des produits cosmétiques liquide comme les lotions.

Nous avons remarqué que les résultats obtenus avec l'imidazolidinyl urée et de diazolidinyl urée sont très rapprochés. Ceci peut être expliqué par l'analogie structurale entre ces deux produits (figure n°20).



Figure n°20 : les structures chimiques de l'imidazolidinyl urée et de Diazolidinyl urée

La souche la plus sensible rencontrée dans cette étude était *Staphylococcus aureus* alors que la souche la moins sensible était *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui est en accord avec la bibliographie qui précise que les souches bactériennes à gram négatif sont plus résistantes par rapport aux souches à gram positif (AHMAD et BEG, 2001).

Le germaben II est un produit largement utilisé en cosmétologie, c'est un composé de plusieurs conservateurs :

- propylène glycol (56%), c'est un aditif avec une toxicité nulle.
- diazolidinyl urée (30%) un conservateur avec une toxicité plus élevée que les parabens.
- méthylparaben (11%) et propylparaben (3%) conservateurs peu toxiques et bien tolérés, ces dérivés du paraben ont une activité plus élevée que l'diazolidinyl urée (tableau n° 9, 13)

Le complexe de ces produits (germaben II) a pour but de diminuer la toxicité et de conserver l'activité antimicrobienne de ces composants. Cependant, nous avons remarqué une diminution de l'activité du complexe germaben II par rapport aux produits : diazolidinyl urée, méthylparaben et le propylparaben seuls. Cette diminution est remarqué par comparaison des résultats des CMI et CMB du germaben II (tableaux n°5, 6 et 7) avec les résultats du CMI et CMB des diazolidinyl urée, méthylparaben et le propylparaben (tableaux n°9 et 13). Cette comparaison révèle que la CMI et la CMB du complexe germaben II est toujours inférieure à la CMI et la CMB de chaque composant seul.

**Tableau n°13 : les CMI et CMB des dérivés de paraben en mg/ml
(GEIS PHILIP A., 2006)**

Inoculum (10 ⁹ UFC/ml)	CMI					CMB				
	Methyl	Ethyl	Propyl	Butyl	Benzyl	Methyl	Ethyl	Propyl	Butyl	Benzyl
<i>Escherichia coli</i>	1	0,600	0,300	0,150	0,160	1,250	1,250	0,360	0,160	0,125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,800	0,800	4,400	0,175	0,160	1,250	6,625	0,625	0,160	0,175
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,800	0,500	0,150	0,120	0,120	1,250	0,625	0,180	0,160	0,050
<i>Candida albicans</i>	1	0,800	0,250	0,125	0,250	5	2,500	0,625	0,625	0,100

Le rapport de la CMB/CMI permet de déterminer le mode d'action de ces produits de telle sorte que :

CMB/CMI \leq 4 : produit est bactéricide

CMB/CMI $>$ 4 : produit est bactériostatique

Les résultats du rapport CMB/CMI (tableau n° 14) nous permettent de conclure que les quatre produits testés présentent un mode d'action bactéricide particulièrement l'imidazolidinyl urée, diazolidinyl urée et germaben II. Ces derniers produits sont considérés comme étant moins actifs par rapport au produits le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium, et ceci vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et la levure *Candida.albicans*.

Le tableau n°14 montre aussi que les quatre produits ont un mode d'action fongicide vis-à-vis de la levure *Candida albicans*.

On remarque aussi que le bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium présente une activité fongicide plus intéressante que l'activité bactéricide.

Tableau n° 14: Les rapports CMB/CMI des produits testés

Les souches	Imidazolidinyl urée	Diazolidinyl urée	Germaben II	le bromide de N- cétyle N,N,N triméthyl ammonium
<i>Escherichia coli</i>	01	01	01	02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	01	01	01	02
<i>Staphylococcus aureus</i>	01	01	01	-
<i>Candida albicans</i>	01	01	01	01

VI/ CONCLUSION ET PERSPECTIVES:

Actuellement les conservateurs constituent une part indispensable des produits que nous consommons, afin d'éviter la prolifération microbienne.

Notre étude consiste à évaluer l'efficacité antimicrobienne (Concentration Minimale Inhibitrice et Concentration Minimale Bactéricide) de quatre conservateurs : Diazolidinyl urée, Imidazolinidinyl urée, le Bromide de N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium et le Germaben II vis-à-vis des trois souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et une levure *Candida albicans*.

Dans l'industrie cosmétologique, ces produits conservateurs sont utilisés à des concentrations très basses en raison de leurs pouvoir allergisant qui fait d'eux des produits à risques; Ainsi, commercialement l'intervalle des doses des ces produits est comme suit :

- l'Imidazolidinyl urée est entre 0,1%- 0,6% (**National Cancer Institute (NCI), 2004**) ;
- le Diazolidinyl urée est entre 0,1%- 0,3% (**Robert et coll., 1997**) ;
- les parabènes (les constituants de Germaben II) est entre 0,1%- 0,8% (**Blanco et coll., 2007**).

De ce fait, les CMI obtenues dans notre travail figurent dans l'intervalle des normes internationales, et il est recommandé d'utiliser les produits imidazolidinyl urée, diazolidinyl urée et germaben II aux doses suivantes :

Imidazolidinyl urée : 0,02-1,56 mg/ ml (0,002% - 0,156%)

Diazolidinyl urée : 1,56 mg/ ml (0,156%)

Germaben II : 3,12- 6,25 mg/ ml (0,312% - 0,625%)

Afin d'élargir cette étude, nous souhaitons dans nos perspectives étudier :

- L'activité antimicrobienne de différents complexes de ces produits conservateurs afin de déterminer les effets synergiques ou antagonistes de ces produits et de générer un complexe plus efficace et moins toxique.
- L'activité antimicrobienne vis-à-vis d'une large gamme de souches microbiennes pathogènes et résistantes.
- La cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* de ces conservateurs : Diazolidinyl urée, Imidazolidinyl urée, Bromide N-cétyl N,N,N triméthyl ammonium et Germaben II.

LES ANNEXES

Annexe I : milieux de culture

Mueller Hinton Agar :

Hydrolysats de caséine	17,5g/l
Agar	15g/l
Infusion solides de bœuf	4g/l
Strache	1,5g/l
Eau distillé	qsp 1l
pH=7,4 ± 0,2	

Mueller Hinton Agar Gélosé :

Hydrolysats de caséine	17,5g/l
Agar	15g/l
Infusion solides de bœuf	4g/l
Strache	1,5g/l
Glucose	0,02g/l
Bleu de méthylène	0,5.10 ⁻³ g/l
Eau distillé	qsp 1l
pH=7,4 ± 0,2	

TSB (Bouillon Trypticase Soja) :

Peptone de caséine	17g/l
Chlorure de sodium	5g/l
Peptone de farine de soja	3g/l
D(+) glucose	2,5g/l
Phosphate dipotassique	2,5g/l
pH=7,3 ± 0,2	

Sabouraud Gélosé :

Agar	20g/l
Glucose	20g/l
Peptone	10g/l
Extrait de levure	3g/l
Eau distillé	qsp 1l
pH=5,6 ± 0,2	

RPMI 1640 Medium :

L-Arginine (free base)	200 mg/L
L-Asparagine	50 mg/L
L-Aspartic acid	20 mg/L
L-Cystine.2HCl	65.2 mg/L
L-Glutamic acid	10 mg/L
Glycine	10 mg/L
L-Histidine (free base)	15 mg/L
L-Hydroxyproline	20 mg/L
L-Isoleucine	50 mg/L
L-Leucine	50 mg/L
L-Lysine.HCl	40 mg/L
L-Methionine	15 mg/L
L-Phenylalanine	15 mg/L
L-Proline	20 mg/L
L-Serine	30 mg/L
L-Threonine	20 mg/L
L-Tryptophan	5 mg/L
L-Tyrosine.2Na	28.83 mg/L
L-Valine	20 mg/L
Biotin	0.2 mg/L
D-Pantothenic	0.25 mg/L
Choline chloride	3 mg/L
Folic acid	1 mg/L
Myo-inositol	35 mg/L
Niacinamide	1 mg/L
PABA ³ (Para amino benzoic acid)	1 mg/L
Pyridoxine HCl	1 mg/L
Riboflavin	0.2 mg/L
Thiamine HCl	1 mg/L
Vitamin B12	0.005 mg/L
Calcium nitrate×H ₂ O	100 mg/L
Potassium chloride	400 mg/L
Magnesium sulfate (anhydrous)	48.84 mg/L
Sodium chloride	6.000 mg/L
Sodiumphosphate,dibasic (anhydrous)	800 mg/L
D-Glucose	2,000 mg/L
Glutathione, reduced	1 mg/L
Phenol red Na	5.3 mg/L
pH=7,4 ± 0,2	