

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE D'UN GEL BUCCAL : LE KLIRICH

Auteur :

Corinne BENOLIEL, Docteur en pharmacie, experte microbiologiste, dirigeante INSTITUT SCIENTIS

Autres auteurs :

Nicolas BERTOLINO, Master en Chimie et Génie Chimique, Responsable R & D, ITENA CLINICAL

Raphaël DUGUE, Expert microbiologiste, dirigeant LABORATOIRE MIDAC

Pauline FERREIRA-THERET, Experte microbiologiste, INSTITUT SCIENTIS

Blandine GUTTON, Ingénieur chimiste, formatrice, INSTITUT SCIENTIS

Laurent HADDAD, Docteur en médecine dentaire / Paris V. Diplôme en chirurgie buccale et maxillo-faciale de l'Hôpital Saint-Louis. Membre de l'American Dental Implant Association.

Audeline RATH-LAVIALLE, Docteur en pharmacie, Consultant, CABINET WHITE-TILLET

Yves TILLET, Docteur en pharmacie, CEO/CSO, CABINET WHITE-TILLET

Date : 18 avril 2016

RESUME

La cavité buccale peut être le siège de multiples affections : plaque dentaire, saignements, inflammations, maladies parodontales telles que les gingivites, parodontites et autres abcès, aphtes buccaux et autres ulcérations buccales.

L'étiologie de ces affections est principalement d'origine bactérienne (*Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ...), fongique (*Candida albicans*...) ou virale (*Herpes Simplex*...).

L'efficacité antimicrobienne *in vitro* du gel buccal dénommé KLIRICH a été démontrée sur ces microorganismes d'intérêt et fait l'objet principal de cette publication.

Le KLIRICH est un dispositif médical de classe I dont l'efficacité et la tolérance clinique ont été démontrées chez des patients présentant une gingivite inflammatoire avec symptômes associés ou non. Les résultats de la présente étude indiquent que KLIRICH possède également des propriétés antimicrobiennes sur des microorganismes d'intérêt dans l'inflammation gingivale, ce qui, potentiellement, positionne de surcroît le produit en traitement préventif...

INTRODUCTION

La bouche est un milieu humide, siège d'un écosystème complexe essentiellement constitué de microorganismes commensaux (bactéries, mycoplasmes, protozoaires, virus).

La cavité buccale est accessible à différents types de microorganismes (manuportés ou issus des poussières et de l'eau). La flore buccale est donc extrêmement variée en quantité et qualité, mais les microorganismes prédominants restent les bactéries.

Cette cavité naturelle constitue une des parties les plus colonisées de l'organisme humain.

L'abondance et la virulence varient selon les individus, leur état général et leurs conditions locales.

Les surfaces des lèvres, des joues, du palais, de la langue, des gencives et des dents sont couvertes d'un film très hydrophile composé de mucines qui favorise considérablement l'adhérence bactérienne.

La problématique est que les espèces commensales peuvent devenir pathogènes à la suite de différentes modifications et notamment d'un déséquilibre de l'écosystème buccal.

La gingivite, maladie parodontale qui se caractérise par une inflammation de la gencive, associée ou non à des saignements, a été l'un des points d'intérêts de ce travail. Elle est principalement due à la présence de plaque dentaire (pellicule collante composée principalement de bactéries mais aussi de protéines salivaires, de sucres et d'acides qui s'accumule sur les dents). Après s'être multipliés, les microorganismes pathogènes produisent des toxines qui intensifient la maladie et les symptômes associés.

Cette inflammation buccale est fréquente et peut s'aggraver en une maladie systémique chronique.

A la suite d'une étude de marché préliminaire, il a été constaté qu'il n'existe à ce jour aucune solution réellement efficace et satisfaisante pour le soin des états inflammatoires de la cavité buccale. Aussi, aucune formulation n'est susceptible de réellement adhérer à la muqueuse atteinte pour la soulager, mais également pour apaiser la sphère buccale après une intervention de soins dentaires.

Afin de répondre à ce besoin médical non satisfait, un produit a été développé et breveté (publication EP 2954902 A1), l'invention portant la dénomination « KLIRICH ». Ce gel bucco-dentaire, réglementairement classé comme dispositif médical de classe I, dont l'efficacité et la tolérance, par application en massages gingivaux, ont été statistiquement et cliniquement démontrées dans l'inflammation due aux pathologies parodontales au cours d'un essai clinique prospectif randomisé versus placebo

Compte tenu de l'étiologie infectieuse fréquente des pathologies en cause, il était intéressant d'étudier l'efficacité antimicrobienne *in vitro* de ce gel. Une étude a donc été menée sur les microorganismes d'intérêt buccal suivants : *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida albicans*, *Herpes Simplex*.

PRESENTATION DU PRODUIT

Composition et présentation



Le KLIRICH est un gel composé de substances pléiotropes assurant une bioadhésivité optimale du gel en milieu buccal aqueux. Le gel protège ainsi la muqueuse gingivale, l'imprègne par massage, et diminue ainsi la douleur et l'inflammation selon ce que démontrent les résultats de l'étude clinique randomisée précitée. L'objet principal de cette publication est de démontrer les propriétés antimicrobiennes du gel sur des microorganismes d'intérêt dans l'inflammation des pathologies gingivales inflammatoires.

Propriétés

Le KLIRICH est un gel efficace sur les cavités buccales inflammées des adultes (gingivites ou symptômes associés du type saignement, récessions gingivales, poches parodontales). Une activité antimicrobienne existe et a été démontrée *in vitro* sur des souches intervenant dans ces diverses pathologies mais aussi de façon sous-jacente *in vivo* sur une population clinique cible atteinte de gingivites.

Matériel et méthodes

Méthodes normatives :

Les méthodes d'essais permettant d'évaluer l'efficacité antimicrobienne du KLIRICH se rapportent aux antiseptiques et désinfectants chimiques et sont des normes européennes.

Les essais utilisent des souches standardisées en collection censées représenter l'ensemble du monde microbien, par classes de microorganismes et permettent de démontrer l'activité antimicrobienne potentielle des produits en suspension ou sur des supports.

L'objectif était donc de mettre en évidence l'efficacité antimicrobienne du KLIRICH contre des pathogènes de la sphère buccale selon la méthodologie des normes ISO 11930⁽¹⁾ - Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique, EN 13727⁽²⁾ - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine, EN 13624⁽³⁾ - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide en médecine, EN 14561⁽⁴⁾ - Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité bactéricide pour instruments utilisés en médecine humaine, EN 14562⁽⁵⁾ - Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide pour instruments utilisés en médecine humaine et EN 14476⁽⁶⁾ - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide dans le domaine médical - Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Conditions expérimentales :

Du fait de la salivation, le gel a une faible durée de vie dans la bouche, après application.

Afin de se rapprocher au maximum des conditions d'utilisation réelles du produit, les essais ont été réalisés en observant un temps de contact très court (de 30 à 60 secondes).

Par ailleurs, une substance interférente contenant 3mL/L d'érythrocytes de mouton destinée à simuler les saignements de la cavité buccale lors d'une gingivite a été mise en place.

L'ensemble des essais *in vitro* a été effectué sur le produit non complètement gélifié pour des questions de faisabilité technique.

Souchothèque et milieux de culture :

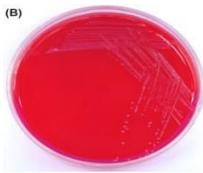
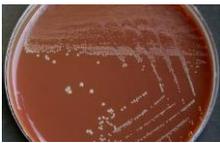
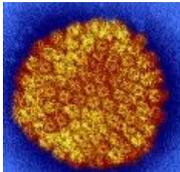
La flore d'une poche parodontale se caractérise par une forte proportion de microorganismes anaérobies (90%) dont la majorité est constituée de bactéries Gram négatif.

L'étude a porté sur différentes souches microbiennes pouvant interférer au niveau de la cavité buccale en cas d'infections parodontales ⁽¹⁴⁾. Ces microorganismes proviennent de cultures cellulaires de l'American Type Culture Collection (ATCC) et de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

Le virus de l'Herpes a également été testé, les essais ont été effectués sur la souche *Herpes simplex* type 1, cultivée sur cellules VERO.

Caractéristiques des différentes souches testées :

Souches et numéro de collection	Caractéristiques et conditions de culture	Pathologies associées
<i>Porphyromonas gingivalis</i> DSM 20709 	<ul style="list-style-type: none">- bacille Gram -, mobile, anaérobie- parodontopathogène- gélose Columbia au sang de mouton (5%) à 37°C	Maladies parodontales Abscesses parodontaux
<i>Prevotella melaninogenica</i> DSM 7089 	<ul style="list-style-type: none">- cocobacille Gram -, non mobile, anaérobie- pathogène buccal en association avec d'autres microorganismes- gélose Columbia au sang de mouton (5%) à 37°C	Maladies parodontales Abscesses parodontaux (Rôle important dans la pathogenèse de la maladie)
<i>Streptococcus mutans</i> DSM 20523 	<ul style="list-style-type: none">- coque Gram +, non mobile, aérobie- flore commensale de la cavité buccale- gélose TSA à 37°C	Plaque dentaire, caries Fragilisation des gencives et de l'émail dentaire (Tendance à produire un biofilm polysaccharidique)
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556 	<ul style="list-style-type: none">- coque Gram +, non mobile, anaérobie facultative- pathogène buccal- gélose Columbia ou TSA au sang de mouton (5%) atmosphère 5% de CO₂ à 37°C	Apparition de caries et fragilisation des gencives

<p><i>Actinomyces naeslundii</i> DSM 43013</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - bacille à Gram positif, immobiles, anaérobie - pathogène buccal - gélose Columbia au sang de mouton (10%) à 37°C 	<p>Plaque dentaire Maladies parodontales</p>
<p><i>Actinomyces israelii</i> DSM 43420</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - bacille à Gram positif, immobiles, anaérobie - pathogène buccal - gélose Columbia au sang de mouton (10%) à 37°C 	<p>Plaque dentaire Maladies parodontales</p>
<p><i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> DS 8324</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - bacille gram-négatif, anaérobie facultatif - gélose Columbia au sang de mouton (10%) à 37°C 	<p>Maladies parodontales</p>
<p><i>Candida albicans</i> DSM 1386</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - levure aérobie - microorganisme commensal saprophyte - gélose MEA à 30°C 	<p>Candidose (communément appelée « muguet buccal »)</p>
<p><i>Herpes virus type 1</i> ATCC VR-260</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - virus enveloppé à ADN - culture sur cellules VERO, atmosphère 5% de CO₂ à 37°C 	<p>Herpès buccal</p>

Composition des milieux de culture (bouillon et gélose) :

TSB

	Grammes/litre
Digestion pancréatique de caséine	17,0
Peptone de soja	3,00
Chlorure de sodium	5,00
Glucose	2,50
Phosphate dipotassique	2,50
Eau distillée	Qsp 1L

MEA (pH = 5.4)

	Grammes/litre
Extrait de MALT	30,0
Peptone de soja	3,00
Agar-agar	15,0

TSA (pH = 7.3)

	Grammes/litre
Tryptone	15,0
Peptone de soja	3,00
Chlorure de sodium	5,00
Agar-agar	15,0

Columbia au sang (pH = 7.3)

	Grammes/litre
Peptone de caséine	10,0
Peptone de viande	5,00
Peptone de cœur	3,00
Extrait de levure	5,00
Amidon de maïs	1,00
Chlorure de sodium	5,00
Agar-agar	13,5
Sang de mouton défibriné	50 ml
Eau purifiée	Qsp 1L

Mise en collection :

Les bactéries et levures sont réceptionnées sous forme de lyophilisats. Lors de leur mise en culture, elles sont réhydratées en conditions stériles dans du bouillon nutritif puis ensemencées sur gélose.

Des identifications macroscopique (aspect des colonies, tests oxydase et catalase) et microscopique (morphologie, coloration de Gram) sont réalisées afin d'en contrôler la pureté et l'identité.

Une solution cryoprotectrice permet de les conserver au congélateur à -70°C.

Solution cryoprotectrice

	Grammes/litre
Extrait de viande	3,00
Peptone	5,00
Glycérol	150,0
Eau purifiée	Qsp 1L

Certains microorganismes nécessitent des atmosphères spécifiques pour leur culture.

Pour *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, une incubation en jarre avec des sachets spécifiques est nécessaire à l'obtention anaérobie complète. Pour *S. sanguinis* et le virus *Herpes simplex* type 1, une atmosphère modifiée à 5% de CO₂ est réalisée pour son incubation.

Culture mère :

Les cultures mères de *S. mutans* sont ensemencées sur géloses TSA inclinées et incubées à 37°C pendant 24h. Pour *S.sanguinis*, *P. gingivalis* et *P. melaninogenica*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, les étalements sont réalisés sur géloses Columbia au sang de mouton (5% ou 10%) et la durée d'incubation est de 48 à 72h en jarre.

Le protocole pour la levure *C. albicans* est semblable mais l'incubation se fait à 30°C pendant 48h sur géloses MEA. Après incubation chaque culture mère (R0) est conservée au réfrigérateur à 4°C.

Culture de travail

La culture de travail est préparée en prélevant à l'anse un échantillon de la culture mère pour inoculer un nouveau milieu de culture stérile (subculture R1). Après incubation, le R1 est ensuite repiqué pour obtenir la culture de travail R2. La culture R2 est celle à utiliser pour les essais. Il est à noter qu'une subculture R3 peut être réalisée à partir de la culture R2 si besoin mais aucun repiquage supplémentaire ne doit être préparé après celui-ci. Pour obtenir la concentration cellulaire nécessaire aux essais, une gamme étalon est réalisée. Pour cela, des suspensions de concentrations différentes sont préparées à partir de repiquages R2 et de tryptone sel (TS). Les densités optiques (DO) correspondantes sont lues au spectrophotomètre à 620nm, puis une numération sur boîtes est effectuée. Ainsi chaque absorbance est reliée à une concentration de micro-organismes en Unité Formant Colonie par millilitre (UFC/ml).

Lors d'un essai, l'inoculum est ajusté avec du tryptone sel (TS) jusqu'à obtention d'une DO correspondant à une concentration cellulaire requise.

Diluant TS (pH = 7.5)

	Grammes/litre
Tryptone, digestat pancréatique de caséine	1,00
Chlorure de sodium	8,50

Descriptif des normes effectuées

➤ Protection antimicrobienne : Norme internationale ISO 11930

La norme ISO 11930⁽¹⁾ communément appelée challenge test, permet l'« *Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique* ». Classiquement, cinq souches sont testées : les trois bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ; le champignon filamenteux *Aspergillus brasiliensis* (anciennement *Aspergillus niger*) et la levure *C. albicans*.

Le principe de ce test est de mettre en contact une suspension calibrée de micro-organismes (à 1×10^7 à 1×10^8 UFC/ml pour les bactéries et 1×10^6 à 1×10^7 UFC/ml pour la levure et la moisissure) avec le produit à tester. Les échantillons inoculés sont conservés à l'obscurité à température ambiante.

Après 7, 14 et 28 jours de contact, des échantillons de produit inoculés par chaque micro-organisme sont prélevés puis neutralisés avant d'être ensemencés sur des milieux de culture adaptés. Une réduction logarithmique est calculée pour chaque souche et comparée aux exigences demandées.

La norme stipule qu'une réduction logarithmique supérieure ou égale à 3 pour les bactéries, supérieure ou égale à 1 pour la levure et la moisissure correspondent à une bonne conservation du produit cosmétique.

De plus aucune augmentation de cellules microbienne ne doit apparaître après 14 et 28 jours.

En parallèle de l'inoculation des produits à T0, deux témoins sont effectués. Un premier témoin de neutralisation va permettre de vérifier que le neutralisant utilisé est efficace pour arrêter l'activité antimicrobienne du produit testé, et un second témoin de non toxicité permet de s'assurer que ce neutralisant n'impacte pas la survie des micro-organismes.

➤ *Evaluation de l'efficacité antimicrobienne : Normes Européennes*

Les normes de phase 1 permettent d'évaluer l'activité de base indépendamment de l'utilisation du produit : qualification de l'activité antimicrobienne.

Les normes de phase 2 reprennent la méthodologie de la phase 1 en intégrant une substance interférente (SI) pour simuler l'état de la surface à désinfecter en conditions réelles. Deux substances interférentes peuvent être utilisées : la condition de propreté correspond à une surface qui a fait l'objet d'un nettoyage avant désinfection tandis que la condition de saleté correspond à une surface qui doit être désinfectée en présence de salissures.

Ces normes de la phase 2 sont sous divisées en deux étapes, une étape 1 testant le produit en suspension et une étape 2 permettant de tester le produit sur une surface représentative (acier inoxydable, polycarbonate, silicone...).

Normes EN 13624 et EN 13727

Le principe des normes EN 13624⁽²⁾ et EN 13727⁽³⁾ est de mettre en contact le produit à tester avec une suspension de micro-organismes calibrée. Dans le cas du gel buccal une substance interférente (SI) constituée de TS et d'érythrocytes est ajoutée. Cette SI permet de simuler un saignement des muqueuses buccales survenant fréquemment lors des infections, afin de se rapprocher au maximum des conditions d'utilisation réelles.

Après le temps de contact défini, une partie de ce mélange est transféré dans du neutralisant pour arrêter l'activité antimicrobienne du produit testé à la fin du temps de contact. A la suite de la neutralisation, un ensemencement en double est effectué sur un milieu gélosé adéquat au microorganisme testé. Les résultats sont dénombrés après la durée d'incubation nécessaire.

Ces normes peuvent être effectuées selon deux méthodes différentes : dilution neutralisation ou filtration sur membrane. Cette dernière méthode est utilisée lorsqu'aucun neutralisant efficace n'est trouvé. La filtration sur membrane permet d'éliminer le produit à la fin du temps de contact en retenant les micro-organismes, car le diamètre des pores est de 0,45µm. Ainsi le produit est éliminé par écoulement, ce qui remplace l'étape de neutralisation du produit.

Normes EN 14561 et 14562

Pour tester l'activité antimicrobienne du produit sur supports en milieu médical les normes EN 14561⁽⁴⁾ et EN 14562⁽⁵⁾ ont été utilisées.

Ces essais consistent à inoculer un mélange d'une suspension microbienne et d'une substance interférente (érythrocytes et TS), sur une surface d'essai (verre ou acier inoxydable 316 L sont les supports indiqués). Cette surface est ensuite séchée à l'étuve à 37°C au maximum 60 minutes. Après séchage, le support est immergé dans le produit à tester durant un temps de contact défini. Après une étape de neutralisation, des ensemencements sont effectués en double sur des boîtes de Pétri.

Dans toutes les normes présentées précédemment, trois témoins sont effectués en parallèle afin de valider les essais. Le premier permet de vérifier la survie des micro-organismes dans les conditions expérimentales de l'essai. Le deuxième permet de s'assurer que le neutralisant n'a pas d'effet létal sur le micro-organisme testé.

Le troisième témoin permet de valider que le neutralisant utilisé dans l'essai permet l'inhibition de l'activité antimicrobienne potentielle contenue dans le produit.

Pour tous ces contrôles, le nombre de survivants est dénombré sur boîtes. Les dénombrements doivent être égaux ou supérieurs à 50% du dénombrement de la suspension de validation pour considérer que les essais à proprement parler peuvent être exploités.

Dans les essais sur supports un témoin supplémentaire est effectué. Le témoin eau est un témoin de récupération qui permet de contrôler que le séchage des supports n'a pas une influence significative sur la survie des inocula. Ils doivent être visuellement secs pour simuler au mieux l'adhésion des micro-organismes à la surface mais pas trop non plus pour que seul le produit testé soit évalué. Le séchage ne doit pas être léthal.

Norme EN 14476

Tout comme les normes EN 13624⁽²⁾ et EN 13727⁽³⁾, le principe de la norme EN 14476⁽⁶⁾ est de mettre en contact un échantillon de produit à tester avec une suspension calibrée, ici de virus. Dans le cas du gel buccal une substance interférente (SI) constituée de TS et d'érythrocytes est ajoutée. Cette SI permet de simuler un saignement des muqueuses buccales survenant fréquemment lors des infections, afin de se rapprocher au maximum des conditions d'utilisation réelles.

Après le temps de contact défini, une partie de ce mélange est transféré dans du diluant à froid pour arrêter l'activité viricide du produit testé puis ce nouveau mélange est transféré dans des cultures cellulaires. Les essais d'infectivité ont été effectués grâce au titrage par effet cytopathique (méthode des cellules en suspension).

Après incubation, les titres infectieux sont calculés selon Spearman et Kärber et sont évalués.

La réduction de l'infectivité du virus est calculée et correspond à la différence des titres du virus (témoin viral), exprimés en Ig, avant et après le traitement avec le produit.

Validation des essais

Lors de la réalisation des tests sur un produit antiseptique ou désinfectant, un temps de contact correspond au temps d'action du produit revendiqué par le fabricant.

Lors des essais hors virucidie, une solution de neutralisants est utilisée pour stopper l'activité antimicrobienne au temps préalablement défini et vérifier l'activité antimicrobienne proprement dite du produit.

Neutralisant

La neutralisation peut s'effectuer par dilution neutralisation ou par filtration sur membrane.

Les normes européennes recommandent différents neutralisants selon les substances actives présentes dans le produit à tester. Un neutralisant polyvalent (à base de saponine, polysorbate 80 et lécithine) est utilisé en première intention pour tout type de produit.

En cas d'échec, un second neutralisant spécifique peut être employé (D/E neutralizing broth (39g/l)) connu pour neutraliser les agents antimicrobiens tels que les composés d'ammonium quaternaires, les amines gras et les composés amphotères.

Afin de parvenir à neutraliser le KLIRICH, il a fallu introduire deux substances supplémentaires: le dodécylbenzènesulphonate de sodium (NaDBS) et le thiosulfate de sodium.

Liquide de rinçage

Lors des essais en filtration sur membrane, le produit passe à travers la membrane en nitrocellulose (pores de diamètre 0,45µm) ce qui permet la neutralisation du produit. Cette méthode nécessite un liquide pour rincer la membrane. Le liquide de rinçage recommandé dans les normes contient du tryptone, du chlorure de

sodium ainsi que du polysorbate. Dans cette étude, il a été complété avec 1% de NaDBS afin de permettre un rinçage des membranes plus efficace.

Composition des neutralisants et liquide de rinçage :

Neutralisant polyvalent

	Grammes/litre
Saponine	30,0
Polysorbate 80	30,0
Lécithine de soja	3,00
Thiosulfate de sodium	5,00
L-histidine	1,00
Eau déminéralisée	Qsp 1L

Neutralisant spécifique (pH = 7.6)

	Grammes/litre
Tryptone	5,00
Extrait de levure	2,50
Bisulfite de sodium	2,50
Glucose	10,0
Lécithine de soja	7,00
Polysorbate 80	5,00
Thioglycolate de sodium	1,00
Thiosulfate de sodium	6,00
Pourpre de bromocrésol	0,02

Neutralisant spécifique + 1à 5% de NaDBS

	Grammes/litre
Tryptone	5,00
Extrait de levure	2,50
Bisulfite de sodium	2,50
Glucose	10,0
Lécithine de soja	7,00
Polysorbate 80	5,00
Thioglycolate de sodium	1,00
Thiosulfate de sodium	6,00
Pourpre de bromocrésol	0,02
Dodecylbenzenesulphonate de sodium	1,00 pour 1% à 5,00 pour 5%

Neutralisant spécifique + 10 à 20g/l de thiosulfate de sodium

	Grammes/litre
Tryptone	5,00
Extrait de levure	2,50
Bisulfite de sodium	2,50
Glucose	10,0
Lécithine de soja	7,00
Polysorbate 80	5,00
Thioglycolate de sodium	10,0 à 20,0
Thiosulfate de sodium	6,00
Pourpre de bromocrésol	0,02

Liquide de rinçage

	Grammes/litre
Chlorure de sodium	5,00
Tryptone	2,50
Dodecylbenzenesulphonate de sodium	1,00 pour 1% - 2,00 pour 2%
Polysorbate 80	5,00

A l'exception de *P. melaninogenica*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pour lesquelles il a fallu effectuer une filtration sur membrane, toutes les souches testées ont suivi la méthode de dilution neutralisation.

Résultats

Challenge Test

Le produit KLIRICH étant un soin destiné à être mis au contact de consommateurs (ou patients), une conservation optimisée lui est nécessaire afin de garantir sa sécurité microbiologique.

Le challenge test ISO 11930 réalisé sur le gel buccal a permis de mettre en évidence que le produit est protégé contre toute contamination extérieure qui pourrait survenir lors de son utilisation.

Dans cet essai les échantillons de produit sont inoculés à hauteur de 10^6 UCF/ml. Ce test a été effectué avec le neutralisant polyvalent. Pour toutes les souches hormis *S. aureus*, le neutralisant polyvalent s'est révélé suffisamment efficace pour inhiber l'activité antimicrobienne du gel buccal. Pour *S. aureus* même l'utilisation du neutralisant spécifique n'a pas permis la validation de neutralisation requise. La norme ISO 11930 stipule que dans ce cas, le système conservateur est considéré comme suffisamment protecteur pour le produit vis-à-vis de l'agent pathogène en question.

Conformément à la norme ISO 11930, le KLIRICH est considéré comme sûr et correctement conservé selon le critère A (*Rapport SCIENTIS 080-1REA14*).

Taux de réduction logarithmique ($R_x = \lg N_0 - \lg N_x$) requis ^a								
Micro-organismes	Bactéries			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>	
Temps de prélèvement	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
Critères A	≥3	≥3 et PA ^b	≥3 et PA	≥1	≥1 et PA	≥1 et PA	≥0 ^c	≥1
Critères B	Non réalisé	≥3	≥3 et PA	Non réalisé	≥1	≥1 et PA	≥0	≥0 et PA

^a Dans cet essai, une plage d'écart de 0,5 log est acceptable (voir 5.7).
^b PA: pas d'augmentation du nombre de micro-organismes par rapport au temps de contact précédent.
^c $R_x = 0$ lorsque $\lg N_0 = \lg N_x$ (pas d'augmentation par rapport au nombre initial).

Le challenge test réalisé sur la formulation définitive du KLIRICH a permis de justifier une protection antimicrobienne conforme aux exigences de la norme ISO 11930, la conservation du KLIRICH est donc assurée.

Essais d'efficacité

L'étude de l'efficacité antimicrobienne du KLIRICH a été effectuée sans gomme xanthane ou sans gomme xanthane ni hyaluronate de sodium (dénueée d'activité antimicrobienne) car ces matières premières entraînent une gélification complexifiant la manipulation.

Afin de prendre en compte la courte durée de vie du produit au sein de la cavité buccale après application, les temps de contact arbitrairement fixés lors des essais sont de 30, 45 et/ou 60 secondes.

Candida albicans

Des essais sur supports ont été menés selon la méthodologie de la norme EN 14562⁽⁵⁾.

<i>Candida albicans</i>	Concentration testée	Réduction logarithmique
Temps de contact : 60 secondes	100%	3,02

Les résultats (*Rapport SCIENTIS 019-1REA15*) mettent en évidence une réduction logarithmique supérieure à 3, ce qui correspond à une réduction de la charge de micro-organismes de 99,90% par rapport à l'inoculum initial.

Dans les conditions de l'essai, le gel buccal possède donc une activité levuricide sur *C. albicans*, responsable des candidoses buccales.

Streptococcus mutans

Des essais en suspension ont été menés selon la méthodologie de la norme EN 13727⁽³⁾ en filtration sur membrane, le liquide de rinçage a été additionné de 2% de NaDBS afin d'améliorer la neutralisation du produit.

Il a été vérifié que cette substance n'était pas toxique pour le microorganisme testé.

Après le temps de contact défini, le produit est filtré sur des membranes en nitrocellulose de porosité 0,45µm. Ainsi le produit testé s'écoule à travers la membrane, ce qui permet d'arrêter son contact avec la charge microbienne potentiellement survivante qui va rester à la surface de la membrane pour pouvoir être dénombrée.

Un liquide de rinçage est nécessaire afin de nettoyer les membranes avant de les placer sur géloses. Le premier essai est en réalité un screening pour lequel seuls les témoins de neutralisation et de toxicité ont été réalisés. Les résultats ont mis en évidence une absence de neutralisation du gel bucco-dentaire.

<i>Streptococcus mutans</i>	Concentration testée	Réduction logarithmique
Temps de contact : 60 secondes	100%	> 3,06
Temps de contact : 30 secondes	100%	> 3,05

Les résultats (*Rapports SCIENTIS 050-1REA15 et 051-1REA15*) permettent de conclure que le gel possède une activité bactéricide dès 30 secondes (réduction de plus de 99,90% de la charge microbienne initiale) vis-à-vis de la souche *S. mutans*, responsable de l'apparition des caries dentaires.

Prevotella melaninogenica

Des essais selon la norme EN 13727⁽³⁾ en filtration sur membrane ont été menés.

<i>Prevotella melaninogenica</i>	Concentration testée	Réduction logarithmique
Temps de contact : 60 secondes	100%	> 4.25
Temps de contact : 30 secondes	100%	> 4.22

Les résultats (*Rapports MIDAC RE 15251-3*) permettent de conclure que le gel possède une activité bactéricide dès 30 secondes (réduction de plus de 99,99% de la charge microbienne initiale) vis-à-vis de la souche *P. melaninogenica*.

Porphyromonas gingivalis

Des essais selon la norme EN 13727⁽³⁾ en filtration sur membrane ont été menés 3 fois sur le même lot d'un KLIRICH.

	Concentration testée	Réduction logarithmique
Temps de contact : 30 secondes	100%	> 5.50
	100%	> 5.32
	100%	> 5.36

Les résultats (*Rapports SCIENTIS 165-1REA14, 165-2REA14 et 165-3REA14*) permettent de conclure que le gel possède une activité bactéricide en 30 secondes (réduction de plus de 99,999% de la charge microbienne initiale) vis-à-vis de la souche *P. gingivalis*.

Streptococcus sanguinis

Des essais selon la norme EN 13727⁽³⁾ en filtration sur membrane ont été menés 3 fois sur le même lot d'un KLIRICH sans hyaluronate de sodium.

<i>Streptococcus sanguinis</i>	Concentration testée	Réduction logarithmique
Temps de contact : 30 secondes	100%	> 5.24
	100%	> 5.19
	100%	> 5.04

Les résultats (*Rapports SCIENTIS 166-1REA14, 166-2REA14 et 166-3REA14*) permettent de conclure que le gel possède une activité bactéricide en 30 secondes (réduction de plus de 99,999% de la charge microbienne initiale) vis-à-vis de la souche *S. sanguinis*.

Actinomyces naeslundii

Des essais selon la norme EN 13727⁽³⁾ en filtration sur membrane ont été menés.

<i>Actinomyces naeslundii</i>	Concentration testée	Réduction logarithmique
Temps de contact : 60 secondes	100%	> 5,37
Temps de contact : 30 secondes	100%	> 5,37

Les résultats (*Rapports MIDAC RE 16191-1*) permettent de conclure que le gel possède une activité bactéricide dès 30 secondes (réduction de plus de 99,999% de la charge microbienne initiale) vis-à-vis de la souche *Actinomyces naeslundii*.

Actinomyces israelii

Des essais selon la norme EN 13727⁽³⁾ en filtration sur membrane ont été menés.

<i>Actinomyces israelii</i>	Concentration testée	Réduction logarithmique
Temps de contact : 60 secondes	100%	> 5,07
Temps de contact : 30 secondes	100%	> 4,71

Les résultats (*Rapports MIDAC RE 16191-3*) permettent de conclure que le gel possède une activité bactéricide dès 30 secondes (réduction de plus de 99,998% de la charge microbienne initiale) vis-à-vis de la souche *Actinomyces israelii*.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Des essais selon la norme EN 13727⁽³⁾ en filtration sur membrane ont été menés.

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Concentration testée	Réduction logarithmique
Temps de contact : 60 secondes	100%	> 5,38
Temps de contact : 30 secondes	100%	> 5,38

Les résultats (*Rapports MIDAC RE 162014-1*) permettent de conclure que le gel possède une activité bactéricide dès 30 secondes (réduction de plus de 99,999% de la charge microbienne initiale) vis-à-vis de la souche *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Herpes simplex type 1

La recherche d'une activité virucide potentielle du KLIRICH a été ciblée sur la souche *Herpes simplex* de type 1, correspondant à l'herpès le plus répandu : l'herpès buccal.

Aucun traitement médical ne permet d'éliminer de manière définitive le virus *Herpès simplex* type 1 du corps. Néanmoins, l'objectif était ici de prouver que le KLIRICH est une solution pour réduire les symptômes et soulager les douleurs relatives.

Compte tenu de l'activité bactéricide/levuricide démontrée et du mode d'emploi du KLIRICH, trois temps de contact ont été testés : 30, 45 et 60 secondes.

<i>Herpes simplex virus 1</i>	Concentration testée	Réduction logarithmique
Temps de contact : 45 secondes	100%	> 4.25
	100%	> 4.125

Les essais ont finalement permis de conclure que le KLIRICH possède une activité virucide spécifique dès 45 secondes contre la souche *Herpès simplex* type 1 correspondant à une réduction de plus de 99,99% de la charge virale initiale (*Rapport APEX BIOSOLUTIONS 114V09-2014-01*).

Discussion

Plusieurs difficultés ont été rencontrées lors de la mise en évidence de cette efficacité antimicrobienne.

Premièrement, la mise en culture des microorganismes de la sphère buccale précités, non habituellement testés, en présence d'une quantité raisonnée de substance interférente (sang), n'a pas été facile et il a fallu développer des conditions de culture spécifiques, particulièrement pour les souches *P. melaninogenica*, *P. gingivalis* et *S. sanguinis*.

Deuxièmement la neutralisation de l'activité antimicrobienne des produits testés à l'issue du temps de contact a dû être mise au point. En effet, la complexité de la formule a nécessité de formuler des neutralisants adaptés permettant de valider les résultats observés lors des essais (sans neutralisation, l'efficacité antimicrobienne en un temps de contact donné n'est pas justifiée)

Troisièmement, pour des raisons de faisabilité technique *in vitro*, le KLIRICH a été testé non viscosé, sans gomme xanthane. Pour les souches *P. gingivalis* et *S. sanguinis* en revanche, le KLIRICH testé ne contenait ni gomme xanthane ni hyaluronate de sodium. L'hypothèse évoquée est liée à l'encombrement stérique de la molécule qui interférait avec la neutralisation du produit.

Conclusion / Synthèse des résultats obtenus

Dans les conditions des études réalisées, le KLIRICH détruit 99.9% à 99.999% des microorganismes testés.

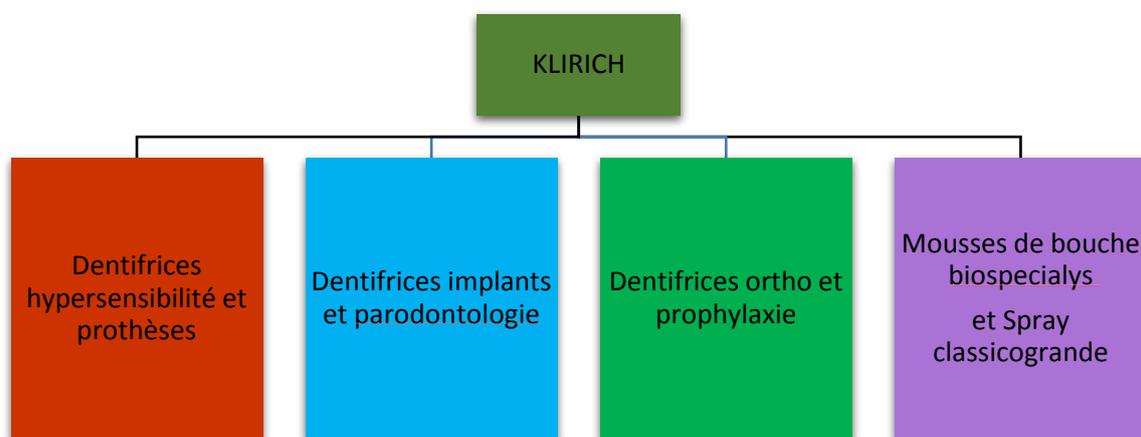
Souche	Temps de contact	Concentration testée	Réduction logarithmique
<i>Candida albicans</i>	60 secondes	100%	3,02
<i>Streptococcus mutans</i>	30 secondes	100%	> 3,05
	60 secondes	100%	> 3,06
<i>Prevotella melaninogenica</i>	30 secondes	100%	> 4.22
	60 secondes	100%	> 4.25
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	30 secondes	100%	> 5.50
		100%	> 5.32
		100%	> 5.36
<i>Streptococcus sanguinis</i>	30 secondes	100%	> 5.24
		100%	> 5.19
		100%	> 5.04
<i>Actinomyces naeslundii</i>	60 secondes	100%	> 5,37
	30 secondes	100%	> 5,37
<i>Actinomyces israelii</i>	60 secondes	100%	> 5,07
	30 secondes	100%	> 4,71
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	60 secondes	100%	> 5,38
	30 secondes	100%	> 5,38
<i>Herpes simplex virus 1</i>	45 secondes	100%	> 4.25
		100%	> 4.125

APPLICATION COLATERALE DU KLIRICH

En raison des propriétés décrites précédemment, le KLIRICH a été introduit dans une gamme de produits buccodentaires cosmétiques (dentifrices et bains de bouche).

Il représente ainsi le produit de soin de la gamme SPECIALYS. Différents segments ont été définis :

- ✓ Implants : Eviter la péri-implantite
- ✓ Ortho : Nettoyer l'intérieur des bagues orthodontologiques
- ✓ Prothèse : Lutter contre l'halitose et les microorganismes opportunistes buccaux
- ✓ Prophylaxie : Gommer, lisser et protéger l'émail
- ✓ Parodontologie : Prévenir et agir sur les saignements
- ✓ Hypersensibilité : Prévenir et agir sur la sensibilité thermique



Pourcentage de KLIRICH en fonction des différents segments

CONCLUSION GENERALE

Neuf microorganismes pathogènes en lien avec la cavité buccale ont été testés *in vitro* : *C. albicans*, *S. mutans*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *S. sanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Herpes simplex virus* type 1.

Dans les conditions des études réalisées, le KLIRICH détruit 99.9% à 99.999% des microorganismes testés.

Une étude clinique a été menée en parallèle démontrant l'activité du produit sur les gingivites.

Le KLIRICH, produit de traitement breveté (publication EP 2954902 A1) a par ailleurs été incorporé dans l'ensemble d'une gamme de soins dentaires destinés à être prescrite par des professionnels de l'art dentaire.

REFERENCES

- ⁽¹⁾ AFNOR (2012) Norme internationale ISO 11930 : Evaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique, Indice de classement : T75-600
- ⁽²⁾ AFNOR (2013) Norme européenne EN 13624 - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide en médecine, Indice de classement : T 72-600
- ⁽³⁾ AFNOR (2013) Norme européenne EN 13727 - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine, Indice de classement : T 72-175
- ⁽⁴⁾ AFNOR (2007) Norme européenne EN 14561 - Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité bactéricide pour instruments utilisés en médecine humaine, Indice de classement : T72-602
- ⁽⁵⁾ AFNOR (2006) Norme européenne EN 14562 - Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité levuricide pour instruments utilisés en médecine humaine, Indice de classement : T72-206
- ⁽⁶⁾ AFNOR (2015) Norme européenne EN 14476 - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide dans le domaine médical, Indice de classement : T 72-185
- ⁽⁷⁾ Allen DR, Davies R, Bradshaw B, Ellwood R, Simone AJ, Robinson R, Mukerjee C, Petrone ME, Chaknis P, Volpe AR, Proskin HM. (1998) Efficacy of a mouthrinse containing 0.05% cetylpyridinium chloride for the control of plaque and gingivitis: a 6-month clinical study in adults. Howard University College of Dentistry, Washington, DC, USA.
- ⁽⁸⁾ A. Scheie (1989) Modes of action of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine, in *Dent Res* 1989; 68:1609-1616. Cat 2
- ⁽⁹⁾ C. Michel, S. Brousse, J. Luc, C. Roques (2005) In vitro comparison of the bactericidal and fungicidal mouthwash activity in conditions similar to their use , in *Rev Odont Stomat* 2005 ;34 :193-203. Laboratoire de bactériologie, virologie et microbiologie industrielle, Fonderephar ; UFR des sciences pharmaceutiques de Toulouse.
- ⁽¹⁰⁾ F.A Pitten, A. Kramer (2001) Efficacy of chlorure de cétylpyridinium used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneim. Forsch*, in *Drug Res* 2001;51:588-595. Cat 1
- ⁽¹¹⁾ J. Donabed, T. Rodrigues, T. Shaver, J. Howarth (2013) Novel Quat test method for successful application of cetylpyridinium chloride (CPC). In *Envirotech* July 29, 2013.
- ⁽¹²⁾ J. Hegde, K. BAshtetty, Krishnakumar, U. Gulati (2012) Quantity of sodium thisulfate required to neutralize various concentrations of sodium hypochlorite. In *Asian Journal of pharmaceutical and health sciences*, Jul-Sep 2012, Vol 2.
- ⁽¹³⁾ J.M.Tanzer, Y.Reid, W.Reid (1972) Method for preclinical evaluation of antiplaque agents, in *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol.1, May 1972, p.376-380.
- ⁽¹⁴⁾ J.van Houte, D.B. Green (1974) Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization of teeth in humans. In *infect Immun*. Apr 9(4): 624-630.
- ⁽¹⁵⁾ C. Roques, DR. S. Pecastaings, C. Michel (2012) Bain de bouche associant digluconate de chlorhexidine et chlorure de cétylpyridinium : démonstration in vitro de ses avantages en termes de propriétés antimicrobiennes et de contrôle de plaque, dans *Rev Odont Stomat* 2012; 41:174-189. Laboratoire de bactériologie, virologie et microbiologie industrielle ; UFR des sciences pharmaceutiques de Toulouse.
- ⁽¹⁶⁾ S. Mankodi, K.Bauroth, J.J.Witt, S.Bsoul (2005) A 6-months clinical to study the effects of cetylpyridinium chloride mouthrinse on gingivitis and plaque, In *AM J Dent* 2005; 18: 9A-14A.
- ⁽¹⁷⁾ S. Sheen, M.Eisenburger, M.Addy (2003) Effect of toothpaste on the plaque inhibitory properties of a chlorure de cétylpyridinium mouth rinse, in *J Clin Periodont* 2003;30:255-260. Cat 1.
-

ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius

AFNOR : Association Française de NORmalisation

ATCC: American Type Culture Collection

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CPC : Chlorure de cétalpyridinium

DO : Densité optique

DM : Dispositif médical

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires)

ISO : International Organization for Standardization (Organisation Internationale de Normalisation)

Log : logarithme décimal

mL : Millilitre

MEA: Malt Extract Agar (gélose à l'extrait de malt)

NaDBS : Dodecylbenzenesulphonate de sodium

NB : nombre

PDA: Potato Dextrose Agar (gélose dextrosée à la pomme de terre)

R0, R1 et R2: Repiquage 0, repiquage 1 et repiquage 2

SI : Substance interférente

SUBCULTURE : culture obtenue après un isolement ou une culture précédente.

T0 : temps zéro

TS: Tryptone Sel

TSA: Trypticase Soy Agar (gélose trypticase soja)

TSB: Tryptic Soy Broth (bouillon tryptone soja)

UFC: Unité Formant Colonie