

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.

Intérêt - démontré in vitro - d'un bain de bouche associant chlorhexidine et chlorure de cétylpyridinium.

PHARMACOLOGIE

Mots clés :

Chlorhexidine
Chlorure de cétylpyridinium
Contrôle de plaque

Keywords:

Chlorhexidine
Cetylpyridinium chloride
Plaque control

Mouthrinse combining chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride: demonstration of the *in vitro* benefit considering antimicrobial and plaque control properties.

In vitro interest of a chlorhexidine and cetylpyridinium chloride mouthrinse.

PR. CHRISTINE ROQUES*, **, DR. SOPHIE PECASTAINGS, CAROLE MICHEL***

*FONDEREPHAR - Faculté de Pharmacie - 35, chemin des Maraîchers - 31062 Toulouse cedex 9 - France.

**Laboratoire de Génie Chimique - UMR 5503 - Université Paul Sabatier - Faculté de Pharmacie - 35, chemin des Maraîchers 31062 - Toulouse cedex 9 - France.

RÉSUMÉ

La présente étude avait pour objet de démontrer *in vitro* l'intérêt d'un bain de bouche (EludrilCARE®) associant les deux agents antiseptiques cationiques suivants : le digluconate de chlorhexidine et le chlorure de cétylpyridinium. Dans un premier temps, l'activité antimicrobienne de ces substances considérées isolément ou associées, a été testée selon la norme européenne NF EN 1040. Ces substances s'avèrent plus efficaces associées, ce qui indique une interaction positive entre elles. Cet effet a été testé sur les principales espèces bactériennes impliquées dans les maladies parodontales. La dernière étape consiste à démontrer l'efficacité de ce bain de bouche sur des biofilms jeunes et matures basés sur le modèle de biofilm « Guggenheim » ; elle révèle par rapport au groupe contrôle une réduction significative des populations bactériennes viables.

ABSTRACT

The present study demonstrates the *in vitro* interest of combining two cationic antiseptic agents : chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride in a mouthrinse formulation (EludrilCARE®). In a first step the antimicrobial activity of the products alone or associated was checked according to European Standard NF EN 1040. When combined, the two products are more efficient than tested alone, underlying a positive interaction. This effect was controlled on the main bacterial species implicated in periodontal diseases. In a last step, the plaque control efficiency of the mouthrinse was demonstrated using the "Guggenheim" model, on young and mature biofilms with significant reduction of the viable bacterial populations when compared to the control.

Introduction

La plaque dentaire est un biofilm multi-espèces auquel sont associés divers polymères bactériens mais aussi des minéraux. Son évolution, qui s'accompagne d'une réaction inflammatoire, peut entraîner des maladies parodontales sévères. Considéré comme un facteur clé pour l'hygiène orale, le contrôle de plaque peut être réalisé de différentes manières dont surtout celles faisant appel à une élimination mécanique (Wilkins 2004) mais aussi celles utilisant des agents chimiques ayant la capacité de désintégrer le biofilm et de réduire la flore concernée (Paraskevas et Vand Der Weijden, 2006 ; Barnett 2003 ; Barnett 2006). Les molécules actives les plus utilisées pour les bains de bouche sont des antiseptiques tensio-actifs (agents cationiques dont, tout particulièrement les bis-biguanides et les ammoniums quaternaires).

De par son efficacité clinique et microbiologique, la chlorhexidine (CHX) fait figure de *gold standard* pour l'antiseptie orale (Gjerme et coll., 1970 ; Lang et Brex, 1986 ; Addy et coll., 1991a ; Franco Neto et coll., 2008). Son activité antibactérienne est dose-dépendante (Segreto et coll., 1986 ; Jenkis et coll., 1994), 0,20 % étant le seuil au-delà duquel une meilleure efficacité ne peut être attendue. Ce composé antimicrobien présente cependant l'inconvénient d'entraîner des colorations dentaires et de la langue, ainsi qu'une perturbation du goût (Zanatta et coll., 2010) ; ces effets secondaires, eux aussi dose-dépendants, sont plus prononcés aux concentrations supérieures à 0,10 % (Addy et coll., 1991b).

Pour limiter ces effets de façon à permettre une utilisation de la CHX sur de longues périodes, une nouvelle formulation de bain de bouche caractérisée par une concentration de cette substance de seulement 0,05 %, est proposée (EludrilCARE, Pierre Fabre Oral Care).

Afin de compenser la probable perte d'efficacité clinique en résultant, ce nouveau bain de bouche contient, en plus de la CHX, un autre agent antimicrobien compatible avec la CHX : le chlorure de cétalpyridinium (CPC) – un ammonium quaternaire de la catégorie des tensio-actifs cationiques moyennement efficace en tant qu'agent anti-plaque mais induisant une destruction rapide de bactéries à Gram positif et de levures (Schroeder et coll., 1962 ; Pitten et Kramer, 2001).

Une formulation de bain de bouche (sans alcool) présentant une telle combinaison de substances peut être considérée comme produit de maintenance post-thérapeutique idéal pour le contrôle de plaque quotidien limitant l'apparition d'effets secondaires (Santos et coll., 2004 ; Quyrinen et coll., 2005).

Introduction

Dental plaque is a multispecies growing biofilm associated with various bacterial polymers, but also minerals. Its evolution is associated with a gingival inflammation and may lead to more drastic periodontal diseases. Taking into account that plaque control is considered as the key factor for oral hygiene, it can be achieved by various ways including mechanical removal (Wilkins 2004) but also application of chemical agents able to disrupt the biofilm and to reduce the considered flora (Paraskevas and Vand Der Weijden, 2006; Barnett 2003; Barnett 2006). The most frequent active molecules used in mouthrinses are antiseptic with associated tensioactive properties i.e. cationic agents and especially bisbiguanides and quaternary ammonium compounds.

Chlorhexidine (CHX) is considered the gold standard for oral antiseptics due to its superior clinical and microbiological effects (Gjerme et al., 1970; Lang and Brex, 1986; Addy et al., 1991a; Franco Neto et al., 2008). This antibacterial activity of CHX is dosage dependent (Segreto et al., 1986; Jenkis et al., 1994), with a threshold of 0.20% as the level over which no further benefits can be expected. The downside of this antimicrobial compound is the appearance of undesirable side effects, mainly tooth and tongue staining and taste disturbance (Zanatta et al., 2010). These side effects are also dosage dependent, being accentuated at concentrations above 0.10% (Addy et al., 1991b).

In order to reduce these side effects for long-term use of CHX, a reduction in the concentration of CHX (0.05%) is proposed in a new mouthwash formulation (EludrilCARE, Pierre Fabre Oral Care).

To compensate the likely decrease in clinical efficacy, the proposed mouthwash has been formulated with the addition of another antimicrobial agent, compatible with CHX: Cetylpyridinium Chloride (CPC). CPC is a quaternary ammonium compound, included in the group of cationic surface-active agents, that has demonstrated a moderate degree of efficacy as an antiplaque agent and able to induce rapid killing of Gram positive bacteria and yeasts (Schroeder et al., 1962; Pitten et Kramer, 2001).

Regarding this combination, an alcohol-free mouthwash formulation can be considered as an ideal hygiene tool for daily plaque control, generating less side effects (Santos et al., 2004; Quyrinen et al., 2005).

La présente étude avait pour objet :

- 1 - d'évaluer l'intérêt bactéricide de cette nouvelle formulation par rapport à l'activité bactéricide de chacun de ses deux composés,
- 2 - de définir son efficacité bactéricide sur les principales espèces bactériennes impliquées dans les maladies parodontales et,
- 3 - de démontrer, en utilisant le modèle de biofilm validé « Guggenheim », son efficacité *in vitro* (détachement et activité bactéricide) pour le contrôle de plaque (Guggenheim et coll., 2001).

Matériel et méthodes

Solutions soumises aux essais

Les compositions des solutions testées – à base de digluconate de chlorhexidine (CHX) et/ou de chlorure de cétalpyridinium (CPC) en tant que principes actifs – et les tests réalisés figurent au **tableau I**. Ces solutions présentaient toutes la même composition en termes d'excipients.

The aim of the present study is to:

- 1 - evaluate the bactericidal interest of the new formulation compared to the activity of the two compounds alone,
- 2 - define its bactericidal efficiency against the main species implicated in periodontal diseases and finally,
- 3 - demonstrate its *in vitro* efficacy (removal and bactericidal activities) on plaque control in a model of biofilm adapted from the validated model of "Guggenheim" (Guggenheim et al., 2001).

Materials and methods

Solutions under assay

All tested solutions are presented in the **table I**, considering the composition in defined active compounds i.e. chlorhexidine digluconate (CHX) and cetylpyridinium chloride (CPC) and the tests performed. The composition in terms of excipients is identical for all solutions.

TABLEAU I - TABLE I

Les solutions testées dans le cadre de cet essai.
Solutions tested according to the assay.

	CHX (%) (pds/vol) CHX (%) (W/V)	CPC (%) (pds/vol) CPC (%) (W/V)	ÉVALUATION DE L'INTERACTION INTERACTION EVALUATION	ACTIVITÉ BACTÉRICIDE BACTERICIDAL ACTIVITY	ACTIVITÉ SUR LES BIOFILMS ACTIVITY ON BIOFILMS
Solution A	0,05		+		
Solution B	0,1		+		
Solution C		0,05	+		
Solution D		0,1	+		
Vérum - Verum	0,05	0,05	+	+	+

Bactéries testées

Les souches de référence proviennent de la Collection de l'Institut Pasteur (Paris). Leur liste, les tests effectués et les milieux de culture employés, figurent au **tableau II**. Les suspensions ont été préparées, juste avant chaque test, dans une solution tryptone-sel (Biomérieux), à une concentration de 2.10^8 bactéries/mL pour chacune des souches.

Tested bacteria

Reference strains were obtained from Institut Pasteur Collection (Paris, France) and **table II** shows a listing of strains, tests performed and culture media used. Suspensions were freshly prepared in tryptone sel (Biomérieux) before each assay at about 2.10^8 bacteria/ml for all strains.

TABLEAU II - TABLE II

Les souches de référence testées dans le cadre de cet essai et les milieux de culture utilisés pour le dénombrement des UFC.
Reference strains tested according to the assay and conditions of CFU numeration.

	ÉVALUATION DE L'INTERACTION INTERACTION EVALUATION	ACTIVITÉ BACTÉRICIDE BACTERICIDAL ACTIVITY	ACTIVITÉ SUR LES BIOFILMS ACTIVITY ON BIOFILMS	MILIEU DE CULTURE POUR LE DÉNOMBREMENT DES UFC MEDIA FOR NUMERATION
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	+	+		TS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	+	+		TS
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> CIP 52106T		+		COS, CO ₂
<i>Streptococcus mutans</i> CIP 103220T		+		SCH, anaerobiosis
<i>Porphyromonas gingivalis</i> AIP 103683		+		
<i>Actinomyces naeslundii</i> CIP 103128T		+	+	COS, CO ₂
<i>Fusobacterium nucleatum</i> CIP 101130T		+	+	SCH, anaerobiosis

TS : Trypcase Soja Agar (Biomérieux, Crapone, France) - COS : gélose Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton (Biomérieux) - SCH : gélose de Schaedler (Biomérieux) - Anaerobiosis : anaérobiose - CO₂ : 5 % de CO₂.

TS: trypcase soy agar (Biomérieux, Crapone, France) - COS: Columbia agar + 5% sheep blood (Biomérieux) - SCH: Schaedler agar (Biomérieux) - CO₂: 5% CO₂.

Évaluation de l'interaction bactéricide et de l'efficacité bactéricide sur des souches parodontopathogènes

Les essais ont été effectués selon la norme européenne NF EN 1040 (avril 2006) intitulée « Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et désinfectants chimiques » (norme correspondant à des essais de phase 1). En bref, 8 mL de chaque concentration préalablement définie pour chacune des solutions à tester ont été mis en contact avec 1 mL d'eau pour préparations injectables (EPPI) et 1 mL de suspension-test.

Les mélanges ont ensuite été homogénéisés et maintenus à 20°C pendant les temps de contact spécifiés. Pour l'évaluation de l'interaction bactéricide, un temps de contact de 3 minutes a été testé pour toutes les solutions, aux concentrations 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % et 40 % (vol/vol), afin de pouvoir définir le niveau d'activité de façon satisfaisante. Pour l'évaluation de l'activité bactéricide du bain de bouche (verum), des temps de contact de 1,3 et 5 minutes ont été testés, aux concentrations 80 %, 40 % et 1 % (vol/vol).

Puis 1 mL a été incorporé à la solution neutralisante (thiosulfate de sodium 0,5 %, Tween 80 10 %, lécithine 2 %, saponine 2 % qsp bouillon trypcase soja) pour une durée de 10 minutes, à 20° C – seule exception : *P. gingivalis*, pour lequel le contact avec la solution a été interrompu par filtration (filtration de 1 mL sur membrane en nitrocellulose de porosité 0,45 µm).

Une fois le temps de neutralisation écoulé, 1mL de

Bactericidal interaction evaluation and bactericidal activity against periopathogenic strains

Assays were performed according to the European Standard NF EN 1040 (April 2006) concerning “Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemicals disinfectants and antiseptics – test method and requirements (phase 1)”. Briefly, 8mL of the defined concentrations of solutions under assay were kept in contact with 1mL of water for injections and 1mL of test suspension.

Mixtures were homogenized and kept at 20°C during specified contact times. For interaction evaluation, a 3 minutes contact time was tested with all solutions at concentrations of 1%, 5%, 10%, 15%, 20% and 40% (V/V) to well define the activity level. For bactericidal activity of the mouthwash (verum) 1, 3 and 5 minutes of contact were tested at 80%, 40% and 1% (V/V).

Then, 1mL was transferred to the neutralizing solution (tween 80 10%, lecithin 2%, saponin 2%, natruim thiosulfate 0.5% qsp trypcase soy broth) for 10 min at 20°C, except for *P. gingivalis* for which the solution contact was stopped using the filtration method (filtration of 1 mL on 0.45µm nitrocellulose membrane).

After neutralisation time, 1mL of solution was incorporated in agar medium. After incubation, colonies were numerated and results were compared with control

solution a été incorporé au milieu de culture (agar). Puis, après incubation, les colonies ont été dénombrées et les résultats comparés avec ceux de l'inoculum témoin pour déterminer la réduction logarithmique. Les essais ont été validés selon la norme, en contrôlant l'innocuité du neutralisant et l'efficacité de la neutralisation/filtration. Selon la norme européenne NF EN 1040 (avril 2006), une concentration est considérée comme bactéricide dès lors que la réduction logarithmique est ≥ 5 . Les essais de bactéricidie doivent être effectués sur au moins trois concentrations, dont une active et une inactive. Chaque test a été effectué deux fois.

Activité sur les biofilms

Préparation des biofilms

Les biofilms ont été réalisés selon le modèle de biofilm « zurichoïse » (Guggenheim et coll., 2001), avec culture en batch des quatre espèces suivantes : *Streptococcus oralis* CIP 102922T, *Actinomyces naeslundii* CIP 103128T, *Veillonella* sp. AIP 4468 et *Fusobacterium nucleatum* CIP 101130T. Ces souches sont entretenues sur gélose Columbia additionnée de sang de mouton (Biomérieux), les souches ont été conservées en anaérobiose à $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

Les disques d'hydroxy-apatite (HA) de 11,8 mm de diamètre et 2,5 mm d'épaisseur provenant du Laboratoire de Physico-chimie des Phosphates (ENSIACET, Toulouse, France) ont été stérilisés à 121°C pendant 15 minutes. Des échantillons de salive prélevés par salivette® ont été immédiatement filtrés – avant pooling – sur des membranes $0,45 \mu\text{m}$.

Avant chaque expérimentation, des disques de HA sont introduits dans les puits d'une microplaque stérile en comportant 24. Ces disques sont conditionnés par de la salive poolée pour une durée de 4 heures (Guggenheim et coll., 2001 ; Shapiro et coll., 2002 ; Thurnheer et coll., 2003) puis recouverts de 1,6 mL de milieux constitués de 50 % de salive et 50 % de milieu universel modifié (mFUM) [67 mmol tampon Sørensen/litre (pH final : 7,2) contenant du glucose à 0,3 % (pds/vol.)] (Gmür et Guggenheim, 1983). Les puits sont ensuite inoculés avec des suspensions mixtes (200 μl) présentant des volumes bactériens équivalents pour chaque micro-organisme (suspensions contenant environ 10^8 bactéries/mL). Les microplaques sont incubées en anaérobiose à $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Le biofilm mature a été obtenu par transfert de l'HA dans de nouvelles microplaques – après 12 heures d'incubation – et immergé dans 1,8 mL constitué de 50 % de salive et 50 % mFUM contenant du glucose à 0,15 % (pds/vol) et du sucrose à 0,15 % (pds/vol). S'en est suivi une nouvelle incubation, de 56 h.

inoculum to obtain logarithmic reduction. Validations of assays were performed according to the standard, considering the innocuity of the neutralizer and the efficiency of the neutralization or filtration method. According to the European Standard NF EN 1040 (April 2006), a bactericidal concentration is defined for a log reduction ≥ 5 . In the same time, bactericidal assays had to be performed with at least 3 concentrations including one active concentration and one non active. All tests were performed twice.

Activity on biofilms

Preparation of biofilms

Biofilms were established according to the Zürich biofilm model (Guggenheim et al., 2001). The model is based on a batch culture approach combining four species: *Streptococcus oralis* CIP 102922T, *Actinomyces naeslundii* CIP 103128T, *Veillonella* sp. AIP 4468 and *Fusobacterium nucleatum* CIP 101130T. Strains were maintained at $37 \pm 2^\circ\text{C}$ under anaerobic conditions on Columbia agar plates with sheep blood cells (Biomérieux).

Hydroxyapatite discs (HA) (11,8mm in diameter, depth 2,5mm) were obtained from the Laboratory of phosphate physical chemistry (ENSIACET, Toulouse, France). They were sterilized at 121°C during 15 minutes.

Saliva samples were collected on salivette® and immediately filtered on $0.45 \mu\text{m}$ membranes before pooling.

Before each experiment, HA were put into wells of a 24 wells sterile microplate. They were coated with pooled saliva for 4 hrs (Guggenheim et al., 2001; Shapiro et al., 2002; Thurnheer et al., 2003) and covered with 1.6 ml of 50% saliva-50% modified universal fluid medium (mFUM) (67 mmol of Sørensen buffer/liter (final pH, 7.2) and 0.3% (wt/vol) glucose) (Gmür and Guggenheim, 1983).

Wells were then inoculated with mixed bacterial suspensions (200 μl) prepared from equal volumes of the various species (suspensions at about 10^8 bacteria/ml) and incubated anaerobically at $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

A mature biofilm was obtained by transferring HA to new plates after 12 hrs of incubation and immersed in 1.8 ml of 50% saliva- 50% mFUM containing 0.15% (wt/vol) glucose and 0.15% (wt/vol) sucrose and further incubated for 56 hrs.

Exposition des biofilms aux agents antimicrobiens

Les biofilms jeune et mature ont été immergés 1 minute dans 1 mL du bain de bouche à étudier et ce, à 4 et 6 heures pour le biofilm jeune, et à 74 et 78 heures pour le biofilm mature. Ils ont ensuite été soigneusement rincés par triple trempage des disques dans 2 mL de solution saline physiologique. Une solution stérile à 0,9 % de NaCl a servi de contrôle négatif. Après la dernière exposition aux agents antimicrobiens, les bactéries non adhérentes ont été éliminées par deux rinçages avec 2 mL de solution NaCl à 9 % stérile.

Dénombrement des bactéries adhérentes cultivables

Les biofilms ont été récoltés par grattage avec une spatule stérile, dans 5 mL de solution saline physiologique. Les suspensions bactériennes correspondantes ont été homogénéisées puis diluées (raison 10). Cent microlitres de chaque dilution ont ensuite été étalés sur gélose Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton. Les boîtes ont alors été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 72 à 96 heures puis le nombre d'unités formant colonie (UFC) a été déterminé pour chaque espèce bactérienne, en examinant les morphologies macroscopique et microscopique.

Microscopie confocale à balayage laser

Concernant l'évaluation morphologique, les échantillons ont été marqués au Syto9® et/ou à l'iodure de propidium afin de permettre la caractérisation de la population bactérienne viable et non viable. Les épaisseurs de biofilm ont été exprimées en valeurs moyennes (μm).

Analyse statistique

Chaque test a été effectué deux fois. Les valeurs d'UFC ont subi une transformation logarithmique afin de correspondre à une distribution normale. Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes \pm écart-type. L'analyse statistique a été effectuée en recourant au test t de Student pour la comparaison intergroupe. A été défini comme seuil de significativité statistique : $p < 0,05$.

Résultats

Évaluation de l'interaction bactéricide

Cet essai a été réalisé sur les souches obligatoires spécifiées dans la norme NF EN 1040, c'est-à-dire : *S. aureus* CIP 4.83 et *P. aeruginosa* CIP 103467. Afin de déterminer avec une précision optimale le niveau d'activité, différentes concentrations de chaque solution ont été testées, en appliquant un temps de contact de 3 minutes.

Exposure of biofilms to antimicrobials

Early and mature biofilms were immersed in 1 ml of the studied mouthwash solution for 1 min at 4 and 6 hrs for early biofilm and at 74 and 78 hrs for mature biofilm, and then rinsed gently by dipping the discs 3 times in 2 ml of physiological saline.

Sterile 0.9% NaCl solution was used as negative control. After the last exposure, non adherent bacteria were removed by two rinsings with 2 ml of sterile 0.9% NaCl solution.

Numeration of adherent cultivable bacteria

Biofilms were harvested by scraping with a sterile blade in physiological saline (5 ml). Bacterial suspensions were homogenized and serially diluted (10 fold). One hundred microlitres of each dilution were then plated onto Columbia agar supplemented with 5% sheep blood cells. Plates were incubated anaerobically at 37°C for 72 to 96 hrs, and the number of colony-forming units (CFUs) was determined for each species considering the macroscopic and microscopic morphologies.

Confocal Laser Scanning Microscopy

For morphological evaluation, specimens were stained with Syto9® and/or propidium iodide to characterize the total bacterial population and the dead part. Biofilm thickness was presented as mean values (μm).

Statistical Analysis

Assays were performed twice. Total CFUs were log transformed to fit a normal distribution and results were expressed as mean values \pm Standard Deviation. Statistical analysis was performed with the t-test for intergroup comparison. Statistical significance was set at the $p < 0.05$ level.

Results

Bactericidal interaction evaluation

This assay was performed on the obligatory strains indicated in the NF EN 1040 standard: *S. aureus* CIP 4.83 and *P. aeruginosa* CIP 103467. In an attempt to precise the level of activity, various concentrations of each solution under assay were tested, for a contact time of 3 minutes.

Les réductions logarithmiques observées pour les différentes solutions testées sont présentées dans les **tableau III** (*S. aureus*) et **tableau IV** (*P. aeruginosa*).

The logarithmic reductions observed for each condition are presented in the **tables III and IV** for respectively (*S. aureus*) and (*P. aeruginosa*).

TABLEAU III - TABLE III

Réductions logarithmiques observées pour *S. aureus* CIP 4.83 après 3 minutes d'exposition à chaque dilution des solutions testées.
Logarithmic reductions observed for *S. aureus* CIP 4.83 after a 3 minutes exposure to each dilution of solutions.

	40 %	20 %	15 %	10 %	5 %	1 %
Solution A (CHX à 0,05 %) - 0.05% CHX	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Solution B (CHX à 0,1 %) - 0.1 CHX	≥ 5	≥ 5	≥ 5	< 5	< 5	< 5
Solution C (CPC à 0,05 %) - 0.05% CPC	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Solution D (CPC à 0,1 %) - 0.1% CPC	≥ 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Vérum (CHX à 0,05 % + CPC à 0,05 %) Verum 0.05% CHX + 0.05% CPC	≥ 5	≥ 5	≥ 5	< 5	< 5	< 5

TABLEAU IV - TABLE IV

Réductions logarithmiques observées pour *P. aeruginosa* CIP 103467 après 3 minutes d'exposition à chaque dilution des solutions testées.
Logarithmic reductions observed for *P. aeruginosa* CIP 103467 after a 3 minutes exposure to each dilution of solutions.

	40 %	20 %	15 %	10 %	5 %	1 %
Solution A (CHX à 0,05 %) - 0.05% CHX	≥ 5	≥ 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Solution B (CHX à 0,1 %) - 0.1 CHX	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 5	< 5	< 5
Solution C (CPC à 0,05 %) - 0.05% CPC	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Solution D (CPC à 0,1 %) - 0.1% CPC	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Vérum (CHX à 0,05 % + CPC à 0,05 %) Verum 0.05% CHX + 0.05% CPC	≥ 5	≥ 5	≥ 5	< 5	< 5	< 5

Les résultats obtenus pour *S. aureus* CIP 4.83 indiquent, concernant les dilutions actives du bain de bouche (verum), une efficacité bactéricide de celui-ci supérieure à celle des solutions contenant, à une concentration correspondant à celle du verum, un seul des deux principes actifs (digluconate de chlorhexidine à 0,05 % ou chlorure de cétalpyridinium à 0,05 %). L'activité bactéricide du verum s'avère supérieure aussi à celle de la solution contenant du chlorure de cétalpyridinium à la concentration 2X (0,1 %), et similaire à celle de la solution contenant du digluconate de chlorhexidine à la concentration 2X (0,1 %).

Concernant *P. aeruginosa* CIP 103467, le bain de bouche (verum) exprime un effet bactéricide à des dilutions supérieures à celles des solutions contenant, à une concentration correspondant à celle du verum, un seul des deux principes actifs (digluconate de chlorhexidine à 0,05 % ou chlorure de cétalpyridinium à 0,05 %). Les

Results obtained on *S. aureus* CIP 4.83 indicate a higher bactericidal efficiency considering the active dilutions of the mouthwash solution (verum) than those of solutions containing each active substance alone, at the concentration present in the verum (0.05% of chlorhexidine digluconate or 0.05% of cetylpyridinium chloride). The bactericidal activity of the verum was also higher than that of the solution containing cetylpyridinium chloride at a concentration 2X (0.1%) and similar to the activity of the solution containing chlorhexidine digluconate at a concentration 2X (0.1%).

Considering *P. aeruginosa* CIP 103467, the mouthwash solution (verum) expresses a bactericidal effect at higher dilutions than those of solutions containing each active substance alone, at the concentration present in the product (0.05% of chlorhexidine digluconate or 0.05% of cetylpyridinium chloride). Results observed for each

résultats observés pour chacun des deux principes actifs soulignent la médiocre activité de la solution contenant du chlorure de cétylpyridinium à une concentration 2X (0,1 %) (aucune activité bactéricide à la concentration testée la plus forte). Dans le même temps, le verum exprime une efficacité bactéricide similaire à celle de la solution contenant du digluconate de chlorhexidine à une concentration 2X (0,1 %).

Activité bactéricide sur les souches parodontopathogènes

Afin de confirmer l'intérêt du produit testé, des tests complémentaires ont été réalisés sur les souches obligatoires figurant dans la norme ainsi que sur celles de référence correspondant aux espèces impliquées dans les maladies parodontales. Ils l'ont été dans les conditions prescrites par la norme (5 minutes de contact à 20°C) et dans des conditions additionnelles (1 et 3 minutes de contact), ces dernières étant plus représentatives des conditions réelles d'utilisation des bains de bouche. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau V** (réductions logarithmiques).

Les essais se sont déroulés dans les conditions prescrites par la norme européenne concernée et ce, pour trois concentrations dont une active et une inactive. Conformément aux conditions de test spécifiées, la concentration testée la plus élevée a été 80 % (vol/vol). Les résultats obtenus confirment l'efficacité bactéricide du verum sur toutes les souches testées – y compris celles parodonto-pathogènes – aux concentrations 80 et 40 % (vol/vol), avec un temps de contact de 5 minutes. Cette activité bactéricide a aussi été observée avec les temps de contact de 1 et 3 minutes, ce qui confirme l'efficacité potentielle de ce produit dans des conditions normales d'utilisation.

Activité bactéricide sur des biofilms jeunes et des biofilms matures

Pour finir, l'efficacité de ce nouveau produit a été testée sur des biofilms jeunes/matures correspondant au modèle de biofilm tel que décrit par Guggenheim et coll. (2001). Les nombres d'UFC/disque obtenus pour chaque souche et type de biofilm sont indiqués dans la **figure 1**. Avait été défini comme seuil de détection pour la méthode employée : 1,7 log UFC.

La colonisation des disques HA concorde avec les observations de Guggenheim et coll. (2001), avec un maximum d'UFC égal à 7,71 log ± 0,35. Le biofilm jeune non traité est caractérisé par la présence de microcolonies constituées essentiellement de cocci (7,71 log UFC ± 0,35) – ces bactéries étant toutes viables –, ainsi que par une surface de disque non intégralement recouverte (**figure 2**).

active compound alone underline the poor activity of the solution containing cetylpyridinium chloride at a concentration 2X (0.1%) (no bactericidal activity at the highest concentration under assay). In the same time, the verum expresses a similar bactericidal efficiency than the solution containing chlorhexidine digluconate at a concentration 2X (0.1%).

Bactericidal activity against periodontopathogen strains

To confirm the interest of the product under assay, complementary tests were performed on the obligatory strains of the standard and on reference strains of species implicated in periodontal diseases, considering the obligatory conditions of the standard (5 minutes of contact at 20°C) and additional conditions (1 and 3 minutes of contact) more representative of the actual conditions of use (mouthwashes). Results are presented in **table V** as logarithmic reductions.

Assays were performed according to the obligatory conditions defined in the European standard, considering three concentrations including one active and one inactive. According to the test conditions the highest concentration to be tested is 80% (V/V).

Results confirm the bactericidal efficiency of the verum on all tested strains, even periodontopathogens, at 80% and 40% (V/V) and for a contact time of 5 minutes. This activity is maintained even for lower contact times (1 and 3 minutes), confirming the potent efficiency of the product in conditions of use.

Bactericidal activity on early and mature biofilms

The efficiency of the new product was finally evaluated on a model of early and mature biofilms as described by Guggenheim et al. (2001). **Figure 1** presents the numerations of CFU/disc in both conditions and for each strain. According to the method, the limit of detection was defined at 1.7 log of CFU.

The colonisation of the HA discs is coherent with Guggenheim et al. (2001) observations, with a total number of CFU of 7.71 log ± 0.35. The non treated early biofilm is characterized by the presence of microcolonies essentially made of cocci (CFU of 7.71 log ± 0.35), with all bacteria being viable, and disc surface not totally covered (**figure 2**).

TABLEAU V - TABLE V

Réductions logarithmiques observées pour chaque souche testée, indiquées en fonction de la concentration du produit (80 %, 40 % et 1 % vol/vol) et du temps de contact (1, 3 ou 5 minutes).

Logarithmic reductions observed for each tested strains, at three concentrations of the product (80%, 40% and 1% V/V), for three contact times (1, 3 and 5 minutes).

SOUCHES - STRAINS	TEMPS DE CONTACT (MIN) CONTACT TIME (MIN)	CONCENTRATION (%) (VOL/VOL) - CONCENTRATION (%) (V/V)		
		80	40	1
<i>S. aureus</i> CIP 4.83	1	> 5	> 5	< 5
	3	> 5	> 5	< 5
	5	> 5	> 5	< 5
<i>P. aeruginosa</i> CIP 103467	1	> 5	> 5	< 5
	3	> 5	> 5	< 5
	5	> 5	> 5	< 5
<i>A. actinomycetemcomitans</i> CIP 52106T	1	> 5	> 5	< 5
	3	> 5	> 5	< 5
	5	> 5	> 5	< 5
<i>S. mutans</i> CIP 103220T	1	> 5	> 5	< 5
	3	> 5	> 5	< 5
	5	> 5	> 5	< 5
<i>P. gingivalis</i> AIP 103683	1	> 5	> 5	< 5
	3	> 5	> 5	< 5
	5	> 5	> 5	< 5
<i>A. naeslundii</i> CIP 103128T	1	> 5	> 5	< 5
	3	> 5	> 5	< 5
	5	> 5	> 5	< 5
<i>F. nucleatum</i> CIP 101130T	1	> 5	> 5	< 5
	3	> 5	> 5	< 5
	5	> 5	> 5	< 5

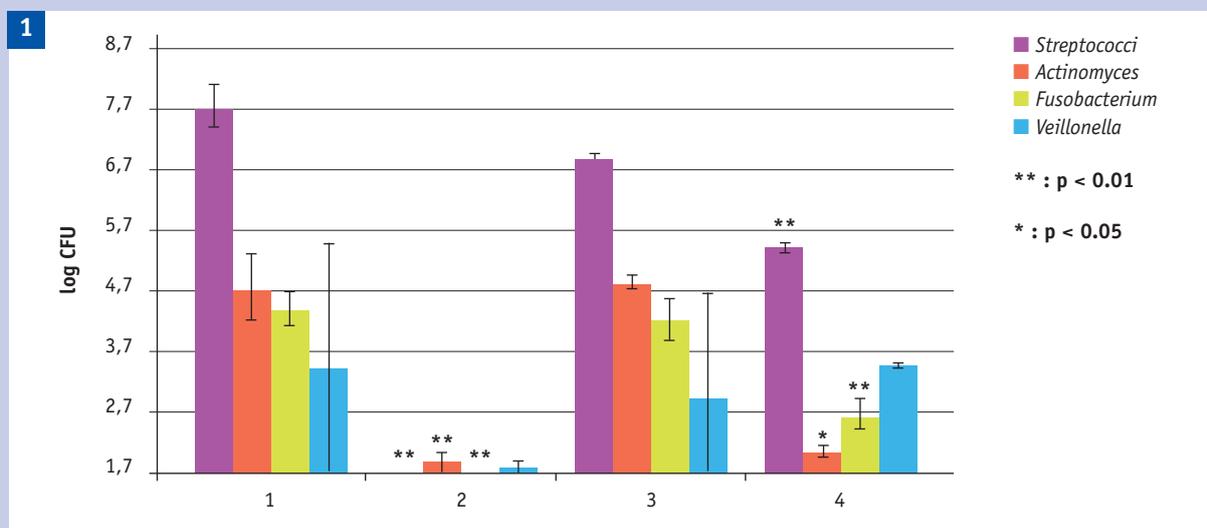
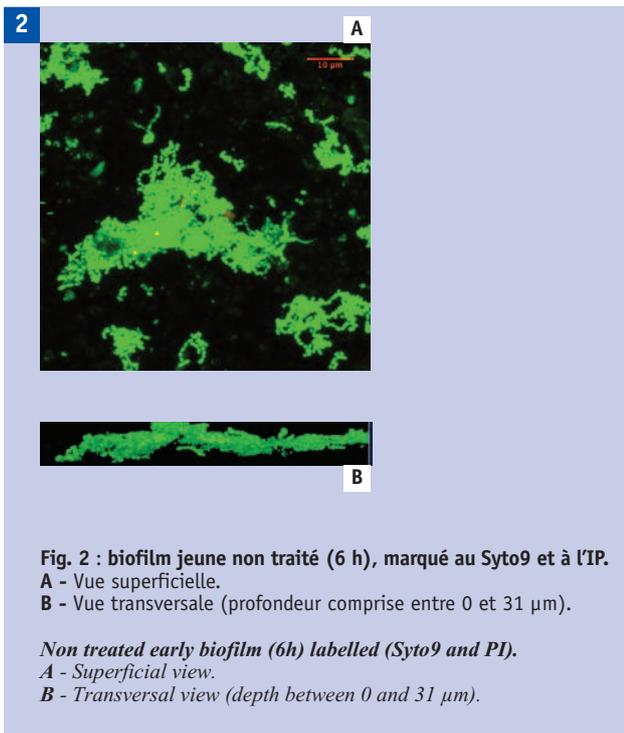


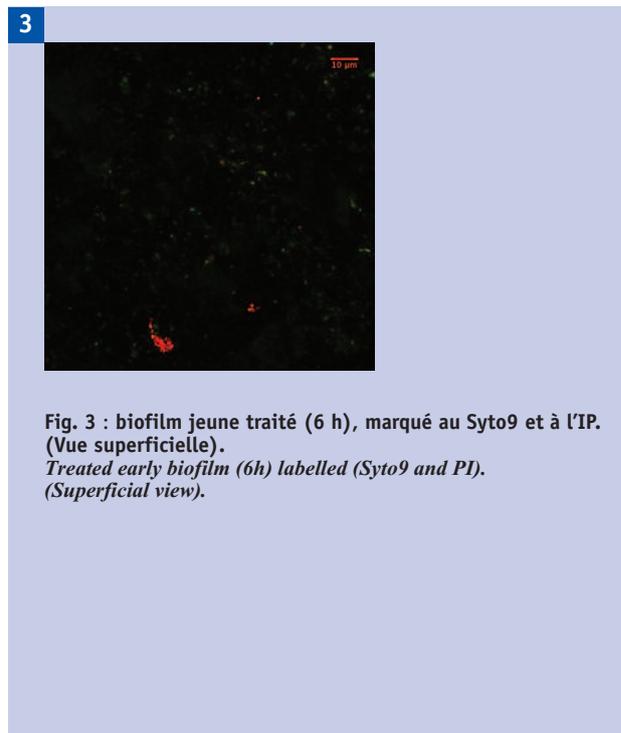
Fig. 1 : nombres d'UFC (moyennes ± écarts type) pour chaque condition d'essai, à savoir :
 1 : biofilm jeune non traité - 2 : biofilm jeune traité - 3 : biofilm mature non traité - 4 : biofilm mature traité.
CFU numbers (mean ± standard deviation) in each assay conditions:
 1: non treated early biofilm - 2: treated early biofilm - 3: non treated mature biofilm - 4: treated mature biofilm.



Les résultats obtenus indiquent une grande efficacité sur les biofilms jeunes, avec une réduction significative de *S. oralis* (1,7 log versus 7,71), *A. naeslundii* (1,85 log versus 4,74) et *F. nucleatum* (1,7 log versus 4,44). La réduction de *Veillonella* est notable (1,78 log versus 3,43) mais non significative en raison d'un écart type élevé. Ces résultats sont confirmés par les observations confocales. Il a été constaté après traitement que la plupart des bactéries avaient été éliminées et que le nombre de bactéries résiduelles viables était faible (**figure 3**).

Concernant les biofilms matures, les niveaux initiaux des différentes souches sur les disques HA étaient similaires à ceux observés pour les biofilms jeunes (maximum d'UFC : $6,88 \log \pm 0,06$). Le dénombrement des bactéries résiduelles viables après traitement indique cependant une plus grande résistance des biofilms matures. Comme le montrent les observations confocales, ceci est corrélé à leur architecture, plus développée (**figure 4**).

Le traitement par le nouveau bain de bouche CHX + CPC induit une réduction significative de *S. oralis* (5,38 log versus 6,88), *A. naeslundii* (2,09 log versus 4,84) et *F. nucleatum* (2,68 log versus 4,24) mais non significative pour *Veillonella*. L'analyse par microscopie confocale effectuée après traitement du biofilm montre que par rapport au biofilm non traité la plupart des cellules ont été éliminées, ce qui se traduit à la fois par une diminution d'épaisseur et une hétérogénéité. Comme le montre le marquage par l'IP, la plupart des cellules résiduelles présentes sur le support sont endommagées (**figure 5**).



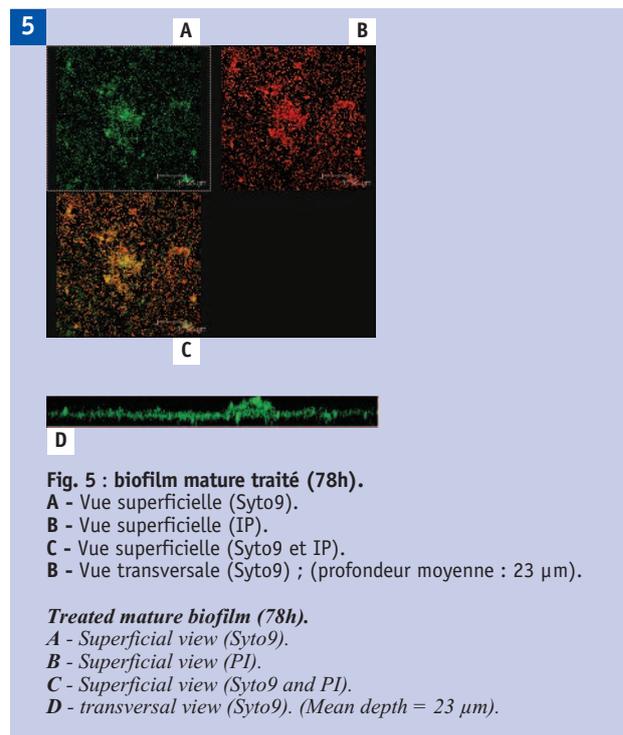
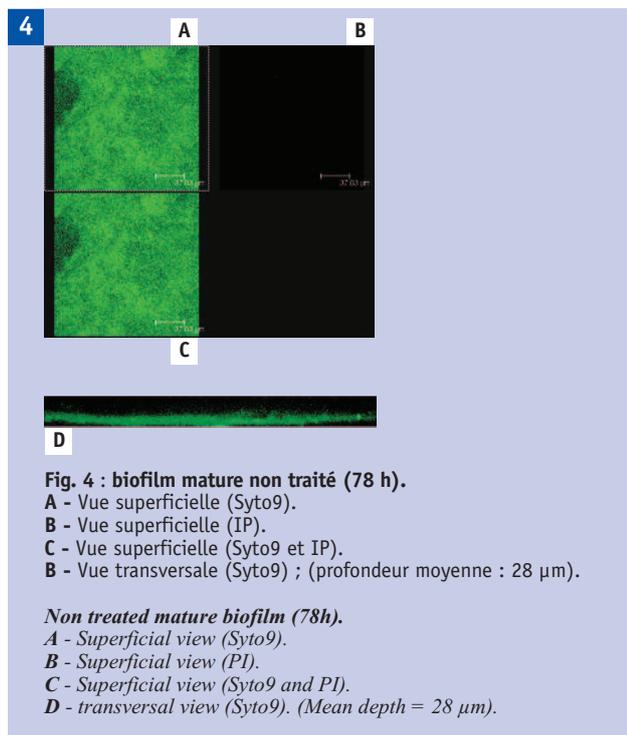
Results indicate a great efficiency on early biofilms with a significant reduction of *S. oralis* (1.7 log versus 7.71), *A. naeslundii* (1.85 log versus 4.74) and *F. nucleatum* (1.7 log versus 4.44). The reduction of *Veillonella* was notable (1.78 log versus 3.43) but not significant considering the high level of standard deviation.

These results are confirmed by confocal observations. After treatment, the main part of bacteria are removed and residual viable bacteria are poorly present (**figure 3**).

On mature biofilms, initial levels of each strain on HA discs appear similar to those observed in early biofilm (total CFU: 6.88 ± 0.06). However, considering the numeration of viable residual bacteria after treatment, the mature biofilms appear more resistant. This is correlated with a higher structuration of the biofilm as indicated by confocal observations (**figure 4**).

Treatment with the new CHX + CPC mouthwash product still induces a real significant reduction of *S. oralis* (5.38 log versus 6.88), *A. naeslundii* (2.09 log versus 4.84) and *F. nucleatum* (2.68 log versus 4.24) but no significant reduction of *Veillonella*.

Confocal microscopy after biofilm treatment reveals the removing of most cells in comparison to the untreated biofilm with a depth reduction combined with heterogeneity. Most cells remaining on the support are damaged as indicated by labelling with PI (**figure 5**).



Discussion

Nos résultats sur l'efficacité bactéricide de solutions à base de CPC et/ou de CHX confirment leurs spectres d'action déjà décrits (Pitten et Kramer, 2001). La différence notable entre le CPC et la CHX est la plus grande efficacité de cette dernière – à une concentration de 0,05 % – vis à vis de *P. aeruginosa*.

Quand, comme pour la formulation de bain de bouche testée ici, de la CHX à 0,05 % et du CPC à 0,05 % sont associés, les résultats obtenus révèlent une interaction positive, laquelle se traduit par une réduction significative des deux bactéries (*P. aeruginosa* et *S. aureus*) même lorsque le bain de bouche est dilué à 15 % (vol/vol). Ce spectre élargi, qui comprend des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, a été vérifié sur des espèces bactériennes parodontales : une réduction de 5 log en 1 minute de contact avec ce nouveau bain de bouche a pu être obtenue même après dilution à 80 et 40 % (vol/vol).

Ces résultats *in vitro* sont en accord avec l'efficacité de ces molécules telle que rapportée dans des études cliniques. L'efficacité des bains de bouche à base de chlorhexidine sur le contrôle de plaque et en termes de réduction des gingivites et d'autres pathologies parodontales, est connue et largement décrite (Addy et coll., 1991a ; 1991b, Van Strydonck et coll., 2005 ; Matthews 2011). Dans un récent rapport, Gunsolley (2010) évalue l'efficacité clinique de bains de bouche antimicrobiens – sur la base d'une revue de la littérature

Discussion

Our results on bactericidal efficiency of CPC or CHX solutions or a combination of both ingredients confirm their known spectrum (Pitten et Kramer, 2001). The notable difference between CPC and CHX is the activity of the latter at a concentration of 0.05% against *P. aeruginosa*.

When CHX and CPC are combined at 0.05% like in the mouthwash formulation under assay, the results demonstrate a positive interaction leading to significant reductions of both bacteria (*P. aeruginosa* and *S. aureus*) even when the mouthwash is diluted at 15% (V/V).

This extended spectrum including Gram positive and Gram negative bacteria was checked on periodontal species confirming a five log reduction by 1 minute of contact with the new mouthwash even after dilution at 80 and 40% (V/V).

These *in vitro* results are in line with the described efficiency of these molecules in clinical studies. The efficiency of chlorhexidine mouthwashes on plaque control and in reduction of gingivitis and other periodontal diseases is well described and known (Addy et al., 1991a; 1991b, Van Strydonck et al., 2005; Matthews 2011). In a recent report, Gunsolley (2010) evaluates the clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses by reviewing literature on clinical long term efficacy (6 months) of anti-plaque or anti-gingivitis mouthrinses versus placebo.

traitant de l'efficacité clinique sur le long terme (6 mois) de bains de bouche antiplaque/anti-gingivite versus placebo. Les résultats de cette analyse attestent de l'efficacité de la chlorhexidine et d'huiles essentielles et, dans une moindre mesure, de celle du CPC. L'efficacité de ce dernier est moins avérée que pour la chlorhexidine du fait, notamment, que le nombre d'études cliniques réalisées est moins important.

Une autre revue de littérature antérieure avait montré que les bains de bouche à base de CPC utilisés comme traitement d'appoint pour l'hygiène orale réduisaient faiblement mais significativement l'accumulation de plaque et les inflammations gingivales (Haps et coll., 2008). Il est cependant précisé dans ces deux revues que les études examinées portent sur des concentrations de CPC allant de 0,005 à 0,1 %, avec une biodisponibilité variable.

Une étude clinique randomisée montre l'efficacité d'un bain de bouche « CHX à 0,05 % + CPC à 0,05 % » utilisé comme traitement parodontal d'appoint (TPA) chez des patients avec contrôle de plaque non maîtrisé ; ce bain de bouche permet de réduire la plaque et la gingivite, et de diminuer la charge microbienne présente dans la salive et le sulcus gingival de ces patients (Esribano et coll., 2010). Une autre étude clinique sur les résultats, à 15 jours, d'un bain de bouche sans alcool – utilisé comme TPA et associant lui aussi CHX à 0,05 % et CPC à 0,05 % – démontre l'activité inhibitrice de cette formulation sur la formation de plaque, ainsi que son efficacité antibactérienne (Santos et coll., 2004).

Le CPC est décrit comme induisant une altération des membranes bactériennes, et la CHX comme ayant ce même effet associé à une précipitation des protéines intracellulaires (Pitten et Kramer, 2001 ; Scheie 1989). Combiner des antiseptiques cationiques comme le CPC et la CHX s'avère particulièrement positif du fait de l'absence d'effets antagonistes tels que ceux observés avec certains composés anioniques (Sheen et coll., 2003).

L'association de ces deux agents antiseptiques, aux spectres d'action complémentaires, peut donc être considérée comme pertinente dans le cadre d'un contrôle de la formation de plaque, sans altération de la flore normale. Celle-ci pourrait en effet conduire à une réduction significative des microorganismes dominants et par là-même à un risque de prolifération de (a) micro-organismes exogènes (i.e. levures, bactéries entériques), ou (b) micro-organismes associés à des pathologies orales. De la même manière, le développement d'une tolérance ou résistance à ces agents est non souhaité (Marsch 1992).

Les résultats de certaines études cliniques à long terme, réalisées dans des conditions normales d'utilisation de produits antiplaque, et d'études épidémiologiques soulignent l'absence d'altération de la flore résidente et

This analysis underlines strong evidence on the efficacy of chlorhexidine and essential oils and, at a lower extend, CPC considering that a smaller number of similar clinical trials had been performed.

Previously, another literature review demonstrated that CPC mouthrinses used as adjuncts to oral hygiene allow slight but significant reduction of plaque accumulation and gingival inflammation (Haps et al., 2008). However, both papers underline that these studies looked at CPC concentrations ranging from 0.005 to 0.1% with various bioavailability.

A randomised clinical trial demonstrated the efficacy of a 0.05% CHX and 0.05% CPC mouth rinse in supportive periodontal care (SPC) in patients with inadequate plaque control by reducing plaque and gingivitis, as well as in decreasing the microbial load in saliva and gingival sulcus (Esribano et al., 2010).

Results from another short-term clinical trial (15 days) using a formulation containing 0.05 % CHX, 0.05 % CPC and no alcohol demonstrated plaque-inhibitory activity and antibacterial efficacy in patients in SPC (Santos et al., 2004).

CPC is described to induce disruption of membrane function while CHX combines this effect with intracellular protein precipitation (Pitten et Kramer, 2001; Scheie 1989). Combining cationic antiseptics such as CPC and CHX is clearly positive considering the absence of inhibitory effects such as those described with some anionic compounds (Sheen et al., 2003).

The association of these 2 antiseptic agents with complementary spectra can also be considered as relevant to control plaque formation without impairment of the normal oral flora.

Indeed, undesirable alterations to the composition of plaque would include the suppression of the predominant organisms leading to overgrowth by either (a) exogenous species (e.g., yeasts, enteric bacteria), or (b) organisms associated with oral diseases. Likewise, the development of resistance or tolerance to these agents would also be undesirable (Marsch 1992).

Results from a number of long-term clinical studies conducted under real-life use conditions of antiplaque biocides and epidemiological studies indicate no adverse alterations in the bacteria found in dental plaque or emergent microbial resistance.

None of the studies show emergence of resistant microflora or alterations of the oral microbiota, while such formulations have been found to provide the benefits of reducing plaque and gingivitis (Sreenivasan 2002).

d'émergence de résistance. Aucune des études répertoriées n'indique de sélection d'une microflore résistante ou une alteration du microbiote oral, alors que ce type de formulation démontre un intérêt en termes de réduction de plaque et d'inflammation gingivale (Sreenivasan 2002).

Ces études *in vivo*, de même que celle présentée par Quyrinen et coll., (2005) sur cette même association soulignent l'intérêt dans le contrôle de plaque à long terme. L'effet observé est corrélé à un contrôle de la microflore orale, notamment avec réduction de la flore anaérobie, permettant l'indication dans le traitement de l'halitose (Roldan et coll., 2003; Winkel et coll., 2003).

Les résultats de la présente étude *in vitro* confirment le spectre d'activité et l'efficacité de l'association testée sur les principales espèces bactériennes impliquées dans l'évolution de la flore constitutive de la plaque dentaire vers les maladies parodontales et l'halitose.

The interest of combining CPC and CHX at low concentration (0.05%) was confirmed using the Guggenheim biofilm *in vitro* model. In such conditions, we noted a significant reduction of the early and mature biofilms without modification of bacteria equilibrium, so limiting dysmicrobism risk.

These *in vivo* reports as well as a paper by Quyrinen et al., (2005) on the same combination underline its potent interest on long-term plaque control. The effect has been associated with oral flora control, especially reduction in total anaerobic counts, leading to an indication in halitosis (Roldan et al., 2003; Winkel et al., 2003).

The present *in vitro* study confirms the spectrum and the high level of efficiency of the combination on the main species implicated in plaque evolution to periodontal diseases and halitosis.

Conclusion

En conclusion, le bain de bouche EludrilCARE® doit permettre d'assurer une maintenance post-thérapeutique efficace, notamment chez les sujets à risque. Son activité bactéricide joue un rôle clé en ce sens qu'elle permet un contrôle de la formation de plaque sans rompre l'équilibre de la flore orale. Ce bain de bouche peut être prescrit comme produit de maintenance pour les soins parodontaux et l'implantologie, avec limitation des effets secondaires du type de ceux rencontrés avec les bains de bouche à forte concentration en CHX. De plus, l'absence d'alcool dans la formulation devrait se traduire par une meilleure observance sur le long terme.

In conclusion, EludrilCARE® mouthwash is intended to be used in order to help protecting teeth and gums and maintain post-therapeutic oral hygiene and care. Considering the bactericidal activity, its key role is to control plaque formation without disrupting oral flora balance. It can be recommended as a follow-up adjunct to periodontal care and implants, limiting side effects of high-concentration CHX mouthrinses. Moreover, by eliminating alcohol in the formulation, a better long-term compliance may be achieved.

Traduction : Jérôme Ferry

Demande de tirés-à-part :

**Pr. Christine ROQUES - UMR 5503 - Université Paul Sabatier - Faculté de Pharmacie - 35, chemin des Maraîchers
31062 Toulouse cedex 9 - France**

- ADDY M., JENKINS S., NEWCOMBE R.
The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts.
J Clin Periodont 1991a;**18**: 90-93. Cat 1
- ADDY M., WADE W., GOODFIELD S.
Stain au ing et antimicrobial properties in vitro of some chlorhexidine formulations.
Clin Prev Dent 1991b;**13**(1):13-17. Cat 2
- BARNETT M.L.
The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice. Control of supragingival plaque et gingivitis.
J Amer Dent Ass 2003;**134**: 699-701. Cat 1
- BARNETT M.L.
The rational for the daily use of an antimicrobial mouthrinse.
J Amer Dent Ass 2006;**137**:16-21. Cat 1
- ESCRIBANO M., HERRERA D., MORANTE S., TEUGHELIS W., QUIRYNEN M., SANZ M.
Efficacy of a low-concentration chlorhexidine mouth rinse in non-compliant periodontitis patients attending a supportive periodontal care programme : a randomized clinical trial.
J Clin Periodont 2010;**37**(3):266-275. Cat 1
- FRANCO NETO C.A., PAROLO C.C., RÖSING C.K., MALTZ M.
Comparative analysis of the effect of two chlorhexidine mouthrinses on plaque accumulation et gingival bleeding.
Braz Oral Res 2008;**22**(2):139-144. Cat 1
- GJERMO P., BAASTAD K.L., RÖLLA G.
The plaque inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *J Periodont Res* 1970;**5**(2):102-109. Cat 1
- GMÜR R., GUGGENHEIM B.
Antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius* as recognized by monoclonal antibodies.
Infect Immun 1983;**42**(2):459-470. Cat 2
- GUGGENHEIM B., GIERSTEN E., SCHÜPBACH P., SHAPIRO S.
Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001;**80**(1):363-370. Cat 2
- GUNSOLLEY J.C.
Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses.
J Dent 2010;**38**:S1:S6-S10. Cat 3
- HAPS S., SLOT D.E., BERCHIER C.E., VAN DER WEIJDEN G.A.
The effect of chlorure de cétylpyridinium-containing mouthrinses as adjuncts to toothbrushing on plaque et parameters on gingival inflammation: a systematic review.
Int J Dent Hyg 2008;**6**:290-303. Cat 3
- JENKINS S., ADDY M., NEWCOMBE R.G.
Dose response of chlorhexidine against plaque et comparison with triclosan. *J Clin Periodont* 1994;**21**(4):250-255. Cat 1
- LANG N.P., BRECX M.
Chlorhexidine digluconate an agent for chemical plaque control et prevention of gingival inflammation.
J Periodont Res 1986;**21**:74-89. Cat 1
- MARSCH P.D.
Microbiological aspects of the chemical control of plaque et gingivitis. *J Dent Res* 1992;**71**:1431-1438. Cat 2
- MATTHEWS D.
No difference between 0.12 % et 0.2 % chlorhexidine mouthrinse on reduction of gingivitis.
Evid Based Dent 2011;**12**(1):8-9. Cat 1
- PARASKEVAS S. et VAN DER WEIJDEN G.A.
A review of the effects of stannous fluoride on gingivitis.
J Clin Periodont 2006;**33**:1-13. Cat 3
- PITTEN F.A., KRAMER A.
Efficacy of chlorure de cétylpyridinium used as oropharyngeal antiseptic.
Arzneim. Forsch/ Drug Res 2001;**51**:588-595. Cat 1
- QUYRINEN M., SOERS C., DESNYDER M., DEKEYSER C., PAUWELS M., VAN STEENERGHE D.
A 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy.
J Clin Periodont 2005;**32**(4):390-400. Cat 1
- ROLDAN S., WINKEL E.G., HERRERA D., SANZ M., VAN WINKELHOFF A.J.
The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, chlorure de cétylpyridinium et zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients : a dual-centre, double-blind placebo-controlled study.
J Clin Periodont 2003;**30**(5):427-434. Cat 1
- SANTOS S., HERRERA D., LOPEZ E., O'CONNOR A., GONZALEZ I., SANZ M.
A randomized clinical trial on the short-term clinical et microbiological effects of the adjunctive use of a 0.05% chlorhexidine mouth rinse for patients in supportive periodontal care. *J Clin Periodont* 2004;**31**(1):45-51. Cat 1
- SEGRETO V.A., COLLINS E.M., BEISWANGER B.B.
A comparison of moutrinses containing two concentrations of chlorhexidine. *J Periodont Res* 1986;**21**:23-32. Cat 1
- SHAPIRO S., GIERSTEN E., GUGGENHEIM B.
An *in vitro* oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses.
Caries Res 2002;**36**(2):93-100. Cat 2
- SHEEN S., EISENBURGER M., ADDY M.
Effect of toothpaste on the plaque inhibitory properties of a chlorure de cétylpyridinium mouth rinse.
J Clin Periodont 2003;**30**:255-260. Cat 1
- SCHEIE A.
Modes of action of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine.
Dent Res 1989;**68**:1609-1616. Cat 2
- SCHROEDER H.E., MARTHALER T.M., MÜHLEMANN H.R.
Effects of some potential inhibitors on early calculus formation. *Helv Odont Acta* 1962;**6**:6-9. Cat 1
- SREENIVASAN P., GAFFAR A.
Antiplaque biocides et bacterial resistance : a review.
J Clin Periodont 2002;**29**(11):965-974. Cat 3

- THURNHEER T., GMÜR R., SHAPIRO S.,
GUGGENHEIM B.
Mass transport of macromolecules within an *in vitro* model
of supragingival plaque.
App Envir Microb 2003;**69**(3):1702-1709. Cat 2
- VAN STRYDOCK D.A., TIMMERMAN M.F.,
VAN DER VELDEN U., VAN DER WEIJDEN G.A.
Plaque inhibition of two commercially available
chlorhexidine mouthrinses.
J Clin Periodont 2005;**32**(3):305-309. Cat 1
- WILKINS E.M.
Clinical practice of the dental hygienist, Ninth edition, *Ed:*
Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, USA. 2004. Cat 3
- WINKEL E.G., ROLDAN S., VAN WINKELHOFF A.J.,
HERRERA A.J., SANZ M.
Clinical effects of a new mouthrinses containing
chlorhexidine, chlorure de cétylpyridinium et zinc-lactate on
oral halitosis. A dual-center, double-blind placebo-controlled
study. *J Clin Periodont* 2003;**30**(4):300-306. Cat 1
- ZANATTA F.B., ANTONIAZZI R.P., RÖSING C.K.
Staining et calculus formation after 0.12% chlorhexidine
rinses in plaque-free et plaque covered surfaces :
a randomized trial. *J Appl Oral Sci* 2010;**18**(5):515-521, Cat 1