

**PUBLICATION
SCIENTIFIQUE
REVUE HYGIENES**

Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles

V.-G. de Billerbeck¹, C. Roques¹, P. Vanière², P. Marquier³

1- Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle - Faculté de pharmacie - Toulouse
2- Laboratoire Air Pharma - Saint-Sulpice 3-
Laboratoire Compal - Zaragoza (Espagne)



Virginia Gisel de
Billerbeck
Laboratoire de
bactériologie,
virologie et micro-
biologie industrielle
Faculté de Pharmacie
35, chemin des
Maraîchers F-31062
Toulouse cedex 04

Résumé. Les huiles essentielles ont un spectre d'action biocide très large puisqu'elles inhibent la croissance de moisissures, levures et bactéries. Le but de ce travail est de déterminer l'activité antimicrobienne de base de deux produits contenant des huiles essentielles micronisées et présentées sous forme de fumée sèche (sans effet mouillant) pour des systèmes de climatisation (LABORATOIRE AIR PHARMA, filiale des Sociétés AIR CONTROL). L'activité inhibitrice a été évaluée sur des bactéries, levures et moisissures, selon deux méthodes : en milieu gélose et par micro-atmosphère. En milieu gélose, le produit 505 est plus efficace que le produit 303 sur la plupart des micro-organismes testés. Les CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) du produit 505 sont comprises entre 0,1 et 0,5 % pour les bactéries et elles sont inférieures à 0,1 % pour les moisissures et les levures. Par micro-atmosphère, les produits 505 et 303 ont une activité inhibitrice comparable sur les bactéries, mais sur les moisissures et les levures testées, le produit 505 possède une activité inhibitrice plus élevée. L'utilisation du produit 505 est donc proposée pour l'assainissement du système de traitement de l'air en milieu hospitalier.

Mots-clés : Huile essentielle - Désinfection - Climatisation.

Antibacterial and antifungal activity of essential oil-based products

Summary. Essential oils have a wide spectrum of action, as they inhibit the growth of moulds, yeast and bacteria. The aim of this work is to determine the basic antimicrobial activity of two products containing essential oils used with a System of essential oil «micronisation» in the form of dry fumes (without any wetting effect) in the air-conditioning System (AIR PHARMA Laboratory, subsidiary of AiR CONTROL Companies). The inhibitory activity was evaluated on bacteria, yeast and moulds, according to two methods: in agar medium and by micro-atmosphere. In agar medium, the product 505 is more effective than the product 303, on most of the micro-organisms tested. The MICs (Minimal Inhibitory Concentrations) of the product 505 are between 0.1 and 0.5% for bacteria and are lower than 0.1 % for moulds and yeast. By micro-atmosphere, the products 505 and 303 have a similar inhibitory activity against bacteria, but against the moulds and yeast tested, the product 505 possesses a higher inhibitory activity. Then, the use of product 505 is recommended for air-conditioning System decontamination in hospitals.

Key-Words: Oils, volatile - Disinfection-Airconditioning.

LES EFFETS ANTIMICROBIENS DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE plantes aromatiques et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit de manière empirique pour l'assainissement de l'air (encensoir) ou pour augmenter la durée de vie des aliments (bouquet garni). Les propriétés antimicrobiennes sont essentiellement dues à la fraction d'huiles essentielles contenues dans ces plantes.

Les huiles essentielles sont des substances odorantes obtenues à partir de plantes, par entraînement à la vapeur d'eau, par hydrodistillation ou par expression. Une huile essentielle est composée de plusieurs constituants aromatiques plus ou moins volatils qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : hydrocarbures (composés terpéniques), alcools (ex: géraniol), aldéhydes (ex: citral).

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires (1) ou au niveau de la microflore vaginale (2), et d'origine fongique, contre les dermatophytes (3-5), les moisissures allergisantes (6) ou les champignons opportunistes (7). Elles présentent également des propriétés cytotoxiques (8) qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Dans la littérature, les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent aux *Labiatae*: Thym, Origan, Sarriette, Lavande, Menthe, Romarin, Sauge, Hysope. L'essence de Thym est souvent rapportée comme étant

parmi les huiles essentielles les plus actives (1,9,10). Son composé majoritaire, le carvacrol, possède également une forte activité antimicrobienne (11). Les huiles essentielles du genre *Eucalyptus* sp, sont particulièrement indiquées contre les maladies respiratoires. Parmi 21 espèces d'*Eucalyptus* étudiées, les composés volatils d'*Eucalyptus citriodora* se sont révélés les plus efficaces, aussi bien vis-à-vis des bactéries que des levures et des champignons (12).

Les huiles essentielles sont volatiles, cette caractéristique permet donc d'envisager leur utilisation en tant qu'agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, notamment en milieu hospitalier, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air des locaux. L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne de base de deux produits à base d'huiles essentielles (Laboratoire AIR PHARMA) pour l'amélioration de la qualité de l'air dans les locaux climatisés (13). Cette première phase d'évaluation fait appel à deux méthodes complémentaires *in vitro*: dilution en milieu gélose et micro-atmosphère.

Matériel et méthodes

Produits

Le produit 303 (Laboratoire AIR PHARMA) contient des huiles essentielles de Géranium, Lavande, Sauge et Thym rouge et un émulsifiant non ionique E 40.

Le produit 505 (Laboratoire AIR PHARMA) contient des huiles essentielles de Cannelle, Thym rouge, Eucalyptus et Citronnelle et un émulsifiant non ionique E 40.

Les huiles essentielles utilisées ont été fournies par le Laboratoire COMPAL

Souches bactériennes et fongiques

L'activité antibactérienne et antifongique a été évaluée sur des souches de référence préconisées par les normes AFNOR concernant l'activité bactéricide et fongicide des antiseptiques et désinfectants (14) :

- *Escherichia coli* CIP 54127 ;
- *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 ;
- *Staphylococcus aureus* CIP 53154 ;
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ;
- *Candida albicans* ATCC 10231,
- *Aspergillus niger* ATCC 16404.

D'autres souches fréquemment rencontrées dans l'environnement ont été testées :

- *Penicillium funiculosum* 1527 (collection du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris) ;
- *Cladosporium* sp. (Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie de Toulouse) ;
- *Fthodotorula* sp. (Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie de Toulouse).

Préparation des suspensions

Les suspensions bactériennes sont préparées à partir des pré-cultures de 24 heures sur Trypcase-soja à 37°C, dans l'eau distillée stérile, et ajustées à 1×10^8 bactéries/ml par mesure de la transmission optique à 640 nm pour *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* et ajustée à 1×10^7 bactéries/ml par mesure de la transmission optique à 640 nm pour *Bacillus subtilis*. Les spores des souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* et *Clado-*

sporium sp.) sont récupérées à l'aide d'un écouvillon à la surface d'une culture de sept jours sur gélose de Sabouraud et mises en suspension dans de l'eau distillée stérile contenant 0,05 % de Polysorbate 80 pour une meilleure dispersion des spores. Après passage au vortex, la suspension de spores est ajustée à la concentration désirée par dénombrement en cellule de Malas-sez par microscopie optique (x400). Les suspensions de cellules végétatives de levures (*Candida albicans* et *Rhodotorula* sp.), sont préparées dans 10 ml de solution de Tryptone-sel. La culture de travail de 24 heures sur gélose de Sabouraud incubée à 30°C est prélevée à l'anse. Le nombre de cellules de la suspension est ajusté à une valeur comprise entre $1,5$ et 5×10^7 cellules/ml à l'aide du diluant en estimant le nombre d'unités par la mesure de la transmission optique à 640 nm.

Détermination des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices)

Cette méthode permet la détermination de la CMI à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture. D'après la méthode décrite par BENJILALI, *et al.* (9), une solution-mère de chaque produit (concentration finale 10 % v/v) est obtenue en eau distillée stérile. Des dilutions sériées de raison 2 sont réalisées extemporanément en eau distillée stérile, à partir de la solution-mère ; 2 ml de chaque dilution sont alors incorporés à 38 ml de milieu Trypcase-soja (bactéries) ou de Sabouraud (levures et moisissures), maintenu en surfusion. Les mélanges sont immédiatement repartis dans deux boîtes de Pétri rondes (90 mm de diamètre mm) à raison de 20 ml de milieu par boîte. La gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à 0,5 - 0,25 - 0,12 - 0,06 et 0,03 %. Après solidification, l'inoculation des géloses, contenant le produit ou non (témoin) est effectuée en surface, sous forme de dépôts de 1 uL, réalisés à l'aide d'un inoculateur multipoint (UENLEY). Pour les bactéries, quatre dépôts sont réalisés par boîte contenant le produit dans le milieu Trypcase-soja (une concentration de produit pour quatre souches), à partir de suspensions correspondant à des concentration de 10^8 cellules/ml, soit 10^5 cellules/dépôt (sauf pour *B. subtilis* dont la suspension est ajustée à 10^7 spores bactériennes/ml, soit 10^4 spores bactériennes/dépôt). Pour les champignons, cinq dépôts sont réalisés par boîte contenant le produit dans le milieu de Sabouraud (une concentration de produit pour cinq souches : trois moisissures et deux levures) à partir de suspensions correspondant à des concentration de 10^7 cellules/ml, soit 10^4 cellules/dépôt. Des témoins de croissance et de stérilité du milieu sont réalisés pour chaque souche et chaque série d'essais. Tous les essais sont réalisés deux fois. Après incubation à 35°C pendant six jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit.

Détermination des QMI (Quantités Minimales Inhibitrices)

Les déterminations de QMI ont été réalisées sur la base de la méthode en micro-atmosphère décrite par

Tableau I - Activité des produits AIR PHARMA 303 et 505 incorporés dans le milieu de culture gélose après six jours d'incubation à 35°C.

BACTERIES	CMI* du produit 303 (%)	CMI* du produit 505 (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>0,5	>0,5
<i>Escherichia coli</i>	0,5	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,25	0,12
<i>Bacillus subtilis</i>	0,25	0,12
MOISSISSURES	CMI* du produit 303 (%)	CMI* du produit 505 (%)
<i>Aspergillus niger</i>	0,5	0,12
<i>Cladosporium sp.</i>	0,5	0,12
<i>Penicillium funiculosum</i>	0,12	0,06
LEVURES	CMI* du produit 303 (%)	CMI* du produit 505 (%)
<i>Candida albicans</i>	0,5	0,06
<i>Rhodotorula sp.</i>	0,25	0,03
*La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est exprimée en % de produit incorporé dans le milieu.		

Tableau II - Activité des produits AIR PHARMA 303 et 505 en micro-atmosphère après six jours d'incubation à 35°C.

BACTERIES	QMI* du produit 303 (ul)	QMI* du produit 505 (pi)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 160	>160
<i>Escherichia coli</i>	40	80
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	40
<i>Bacillus subtilis</i>	40	40
MOISSISSURES	QMI* du produit 303 (pi)	QMI* du produit 505 (ul)
<i>Aspergillus niger</i>	160	20
<i>Cladosporium sp.</i>	80	20
<i>Penicillium funiculosum</i>	40	10
LEVURES	QMI* du produit 303 (ul)	QMI* du produit 505 (ul)
<i>Candida albicans</i>	80	10
<i>Rhodotorula sp.</i>	40	10
*La QMI (Quantité Minimale Inhibitrice) est exprimée en ul de produit déposé sur le couvercle de la boîte de Pétri.		

PELLECUER, *étal.* (1) et BENJILALI, *Et al.* (15), dérivée de la méthode originale de KELLNER et KOBER (16). L'intérêt de cette méthode repose sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de croissance des composés volatils des huiles essentielles à une température d'incubation donnée. Des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) sont préparées extemporanément par dépôt de 20 ml de milieu Trypcase-soja (bactéries) ou de Sabouraud gélose (levures et moisissures) en surfusion. L'inoculation est réalisée en surface, sous forme de dépôts de 1 uL (inoculateur multipoint DENLEY), comme décrit précédemment pour la détermination des CMI. Un papier filtre (WATMANN n° 5, 80 mm de diamètre) est placé au fond du couvercle de chaque boîte de Pétri. Juste avant fermeture de la boîte, le produit testé est déposé au centre du papier. Pour chaque produit, les dépôts sont de zéro (témoin de croissance), 10, 20, 40, 80, et 160 uL. Immédiatement, les boîtes sont fermées (dépôt

de produit en position inférieure, sur le couvercle de la boîte de Pétri). Chaque essai est répété en double. Après incubation à 35°C pendant six jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La Quantité Minimale Inhibitrice (QMI) est définie comme la plus petite quantité de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit.

Résultats

Les valeurs des CMI (en %) obtenues sont indiquées dans le tableau I. Nous observons une activité inhibitrice plus forte du produit 505 par rapport au produit 303 pour la plupart des micro-organismes testés, à l'exception des bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, qui apparaissent les plus résistantes. A l'inverse, *P. funiculosum*, *C. albicans* et *Rhodotorula sp.* sont les micro-organismes les plus sensibles au produit 505.

Les QMI (en ul) sont indiquées pour les deux produits et les neuf souches-test dans le tableau II. L'activité inhibitrice de la phase volatile des deux produits sur les bactéries ciblées est comparable ; alors que sur les moisissures et les levures testées, le produit 505 présente une activité plus forte, avec des QMI plus faibles.

Discussion

Parmi les bactéries testées, les bactéries à Gram négatif se sont révélées plus résistantes aux produits testés que les bactéries à Gram positif. Cette sensibilité plus marquée des bactéries à Gram positif vis-à-vis des composés des huiles essentielles, aussi bien en milieu gélose qu'en micro-atmosphère, a déjà été observée par plusieurs auteurs (17-19). *Pseudomonas aeruginosa* s'est révélé la bactérie la plus résistante avec absence d'inhibition aux plus fortes CMI et QMI testées. L'activité inhibitrice des produits testés est plus marquée sur *E. coli*, surtout en phase vapeur. Par contre, sur les bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *B. subtilis*), l'activité des deux produits est comparable autant en milieu gélose qu'en micro-atmosphère. Parmi les moisissures, *Penicillium funiculosum* s'est révélé l'espèce la plus sensible, lors des essais en milieu gélose et en micro-atmosphère. En ce qui concerne les levures, *Candida albicans* et *Rhodotorula sp.* apparaissent très sensibles aux composés du produit 505 testé en milieu gélose et en micro-atmosphère.

En conclusion, les résultats de cette étude montrent que le produit 505 est plus efficace sur la plupart des micro-organismes testés, notamment sur les moisissures et les levures. L'utilisation de ce produit est donc préconisée pour l'assainissement du système de traitement de l'air en milieu hospitalier, par micronisation dans les réseaux de climatisation au niveau des blocs opératoires, services cliniques et salles blanches. Le produit 303, présentant une activité inhibitrice modérée, apparaît plus adapté au milieu tertiaire, par micronisation dans les réseaux de climatisation des bureaux, halls de réception, locaux administratifs et salles d'exposition

Bibliographie

- 1 - PELLECUER J, JACOB M, SIMEON BOUCHBERG M (DE), *et al.* Essais d'utilisation d'huiles essentielles de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice. *Plant Médicin Phytothér* 1980; 14: 83-98.
- 2- VIOLLON C, LEGER D, CHAUMONT JP. Activités antagonistes *in vitro* de certains composés volatils naturel vis-à-vis de germes de la flore vaginale. *Plant Méd Phytothér* 1993; 26: 17-22.
- 3- CHAUMONT JP, LEGER D. Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement voisins, relation structure-activité. *Plant Méd Phytothér* 1989; 23:124-128.
- 4- KISHORE N, MISHRA AK, CHANSOURIA JPN. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. *Mycoses* 1993; 36: 211-215.
- 5- LIMA EO, GOMPERTZ OF, GIESBRECHT AM, *et al.* In vitro antifungal activity of essential oils obtained from plants against dermatophytes. *Mycoses* 1993; 36: 333-336.
- 6- CHAUMONT JP, LEGER D. Lutte contre les moisissures allergisantes des habitations. Propriétés inhibitrices de l'huile essentielle de Géranium "Bourbon", du citronellol, du géraniol et ducitral. *Ann Pharm Fr* 1992; 50: 156-166.
- 7-VIOLLON C, CHAUMONT JP. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1994; 128: 151-153.
- 8 - SIVROPOULOU A, PAPANIKOLAOU E, NIKOLAOU C, *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *J Agr Food Chem* 1996; 44: 1202-1205.
- 9- BENJILALI B, TANTAOUI-ELARKI A, ISMAILI-ALAOUI M, *et al.* Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélose. *Plant Méd Phytothér* 1986; 20: 155-167.
- 10 - AGNIHOTRI S, VAIDYA ADB. A novel approach to study antibacterial properties of volatile components of selected Indian medicinal herbs. *Indian J of Exp Biol* 1996; 34:712-715.
- 11- PAULI A, KNOBLOCH K. Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-contaminating fungi. *Z Lebensm Unters Forsch* 1987; 185: 10-13.
- 12- HAJJIF, FKIH-TETOUANI S, TANTAOUI-ELARKI A. Antimicrobial activity of 21 *Eucalyptus* essential oils. *Fitoterapia* 1993; 64: 71-77.
- 13- GRUMEL N. Des huiles essentielles dans un immeuble de grande hauteur. *Clim Pratique* 2000; 32: 35-36.
- 14- COLLECTIF. *Antiseptiques et désinfectants*. Recueil de Normes et réglementations. AFNOR, Paris, 1998, 166, 249.
- 15- BENJILALI B, TANTAOUI-ELARKI A, AYADI A, *et al.* Method to study antimicrobial effects of essential oils: application to the antifungal activity of 6 Moroccan essences. *J Food Prot* 1984; 47: 748-752.
- 16- KELLNER W, KOBER W. Möglichkeiten der Verwendung etherischer Öle zur Raumdesinfektion. *Arzneim Forschung* 1955; 5: 224.
- 17- BOURREL C. *Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées*. Thèse de 3^e cycle, INP Toulouse, 1993.
- 18- PATNAIK S, SUBRAMANYAM VR, KOLE CR, *et al.* Antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon*: inter-and intra-specific differences. *Microbios* 1995; 84: 239-245.
- 19- SIVROPOULOU A, KOKKINI S, LANARAS T, *et al.* Antimicrobial activity of mint essential oils. *J Agr Food Chem* 1995; 43:2384-23

HYGIENES

