

ACTIVITE INHIBITRICE

DE CROISSANCE DU 303 ET 505

SUR LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Activité inhibitrice de croissance de produits à base d'huiles essentielles vis-à-vis de *Legionella pneumophila*.

Virginia G. de Billerbeck¹, Christine Roques¹ et Pascal Vanière²

1- Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle, Faculté de pharmacie, 35, chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse Cedex 4, France.

2- Laboratoire Air Pharma, Z.I. 337, Avenue des Terres Noires, 81370 Saint-Sulpice, France.

Résumé

Parmi les micro-organismes susceptibles de coloniser les systèmes de climatisation, les *Legionella* trouvent un réservoir idéal principalement au niveau des tours aérorefrigérantes. L'objectif de ce travail est de déterminer l'activité antimicrobienne de deux produits AIR PHARMA à base d'huiles essentielles sur *Legionella pneumophila*. Le laboratoire AIR PHARMA est une filiale des Sociétés AIR CONTROL, spécialisées dans le nettoyage et la décontamination des réseaux aérauliques par robot. Le laboratoire AIR PHARMA a mis au point un système de "micronisation" d'huiles essentielles sous forme de fumée sèche (sans effet mouillant) dans les systèmes de climatisation (1). Les huiles essentielles testées présentent un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent la croissance de moisissures, levures et bactéries à Gram positif et à Gram négatif (2). Sur *Legionella pneumophila*, les produits AIR PHARMA 303 et 505 présentent des CMI et des QMI particulièrement faibles : CMI $\leq 0,06$ % en milieu gélosé et QMI ≤ 10 μ l en micro-atmosphère. Ces résultats montrent l'intérêt d'utiliser ces produits dans un but préventif afin de contrôler la prolifération de cette bactérie au sein du système de climatisation.

Introduction

Les *Legionella* sont des bactéries hydrotélluriques, isolées dans les eaux douces, les lacs, les sources chaudes, ainsi que dans la terre et le compost (3). Elles peuvent vivre à l'état libre dans l'environnement, et se multiplient de façon active à l'intérieur des cellules, notamment certains protozoaires de type amibe. A partir des sites naturels, la bactérie peut coloniser des sites artificiels dans certaines conditions. Les *Legionella* sont ainsi détectées en faible quantité dans l'eau froide et en quantité nettement plus élevée dans l'eau chaude, leur température de multiplication optimale se situant entre 25 et 45 °C. Elles sont en revanche

Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie Industrielle
35 chemin des Maraîchers 31062 Toulouse Cedex 04
tél. : 05.62.25.68.60 fax : 05.61.25.95.72 e-mail : fonderephar@wanadoo.fr

tuées par une eau très chaude (> 60 °C). Certaines espèces de ce genre, pathogènes opportunistes, peuvent causer des infections chez l'homme (légionelloses). *Legionella pneumophila* est responsable de la plupart des cas de légionellose. La maladie des « légionnaires » est une pneumopathie fébrile atypique accompagnée de troubles hépatiques, digestifs et neurologiques de pronostic sévère. La contamination nécessite l'inhalation d'un aérosol d'eau contaminée. L'aérosol peut provenir d'une douche (4), d'un bain à remous ou d'une tour aérorefrigérante. Les bains à remous ont été à l'origine de 181 cas aux Pays-Bas en 1999 (5) et de 93 cas en Belgique (6). Les tours aérorefrigérantes ont été à l'origine de 20 cas à Paris en 1998 (7) et de 8 cas à Paris en 1999 (8). Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité anti-*Legionella* de deux produits à base d'huiles essentielles, proposés par le laboratoire AIR PHARMA pour l'amélioration de la qualité sanitaire du système de climatisation, entraînant par conséquent un effet bénéfique sur la qualité de l'air des locaux climatisés.

Matériels

Le produit 303 (Laboratoire AIR PHARMA) contient des huiles essentielles de *Géranium*, *Lavande*, *Sauge* et *Thym rouge* et un émulsifiant non ionique E 40. Il est proposé pour la micronisation dans les réseaux de climatisation dans le domaine tertiaire (système de climatisation de bureaux, halls de réception, locaux administratifs, salles d'exposition).

Le produit 505 (Laboratoire AIR PHARMA) contient des huiles essentielles de *Cannelle*, *Thym rouge*, *Eucalyptus* et *Citronnelle* et un émulsifiant non ionique E 40. Il est proposé pour la micronisation dans les réseaux de climatisation dans le domaine hospitalier (systèmes de climatisation de blocs opératoires des hôpitaux, cliniques et salles blanches) et en agro-alimentaire. Les huiles essentielles entrant dans la composition des produits AIR PHARMA ont été fournies par le Laboratoire COMPAL (c/San Lorenzo 44, I-iz. 50001 Zaragoza, Espagne).

La souche testée est une souche référencée de *Legionella pneumophila* ATCC 33152.

Méthodes

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, nous avons fait appel à deux méthodes complémentaires *in vitro* : dilution en milieu gélosé (9) et micro-atmosphère (10).

En milieu gélosé, différentes concentrations de produit (0,06 - 0,12 - 0,25 - 0,50 %) sont incorporées dans le milieu de culture spécifique pour la croissance des *Legionella*

(Buffer Charcoal Yeast Extract, BioMérieux) supplémenté en chlorhydrate de L-cystéine et en pyrophosphate ferrique. La surface du milieu est inoculée sous forme de dépôts de *L. pneumophila* à différentes concentrations (10^5 , 10^4 et 10^3 bactéries/dépôt). Après incubation à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂ pendant 6 jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible, comparativement au témoin sans produit.

La méthode en micro-atmosphère constitue une première approche pour l'étude de l'activité antimicrobienne des vapeurs de produits volatils. Différentes quantités de produit (10 - 20 - 40 - 80 - 160 µl) sont déposées sur un papier filtre placé au fond du couvercle d'une boîte de Petri. La surface du milieu est inoculée par de dépôts de *L. pneumophila* à différentes concentrations (10^5 , 10^4 et 10^3 bactéries/dépôt). Immédiatement, les boîtes fermées sont retournées (dépôt du produit en position inférieure, à l'intérieur du couvercle de la boîte de Petri). Après incubation à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂ pendant 6 jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La QMI (Quantité Minimale inhibitrice) est définie comme la plus petite quantité de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible, comparativement au témoin sans produit.

Résultats

Les résultats obtenus sont rapportés dans les tableaux 1 et 2. Les produits AIR PHARMA 303 et 505 testés par contact dans le milieu de culture (**tableau 1**) présentent une forte activité inhibitrice vis-à-vis de *Legionella pneumophila* avec une CMI inférieure ou égale à 0,06 % pour le produit 505 et égale à 0,06 % pour le produit 303. Cette activité inhibitrice ne varie pas en fonction de la taille de l'inoculum testé. En micro-atmosphère (**tableau 2**), la QMI des deux produits est inférieure ou égale à 10 µl de produit et n'apparaît pas inoculum dépendante.

<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	CMI du produit 303 (%)	CMI du produit 505 (%)
10^3 , 10^4 ou 10^5 bactéries / dépôt	0,06	≤ 0,06

Tableau 1. Activité des produits AIR PHARMA 303 et 505 incorporés dans le milieu de culture gélosé après 6 jours d'incubation à 37 °C et en atmosphère enrichie en CO₂. La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est exprimée en pourcentage de produit dans le milieu.

<i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	QMI du produit 303 (µl)	QMI du produit 505 (µl)
10 ³ , 10 ⁴ ou 10 ⁵ bactéries / dépôt	≤ 10	≤ 10

Tableau 2. Activité des produits AIR PHARMA 303 et 505 en micro-atmosphère après 6 jours d'incubation à 37 °C et en atmosphère enrichie en CO₂. La QMI (Quantité Minimale Inhibitrice) est exprimée en microlitres (µl) de produit déposé à l'intérieur du couvercle de la boîte de Petri.

Ces résultats montrent que les produits AIR PHARMA 303 et 505 possèdent une très forte activité inhibitrice de croissance vis-à-vis de *Legionella pneumophila* par contact en milieu gélosé. Par comparaison, ces produits ont précédemment été testés sur d'autres souches bactériennes lors de leur validation (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) et les CMI observées sont comprises entre 0,1 et 0,5 % (2). En phase vapeur, *Legionella pneumophila* se montre également très sensible aux produits 303 et 505, puisque une inhibition de croissance a été constatée avec la plus petite quantité de produit testée (10 µl). Sur d'autres souches bactériennes (2), les produits 303 et 505 présentent des QMI plus élevées: 40 µl vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, 80 µl vis-à-vis d'*Escherichia coli* et supérieure à 160 µl vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

En conclusion, l'utilisation des produits AIR PHARMA 303 et 505 est donc recommandée pour l'assainissement du système de climatisation, en tant que traitement préventif, afin de limiter le risque de développement de micro-organismes et particulièrement, de *Legionella pneumophila* au sein du système de climatisation. Cependant, ce traitement préventif complète, mais ne remplace pas la maintenance de la centrale de traitement de l'air qui doit être effectuée périodiquement, en fonction de la conception des systèmes et du risque de prolifération microbologique.

Références bibliographiques

- (1) N. GRUMEL. Des huiles essentielles dans un immeuble de grande hauteur. *Clim'Pratique* 2000 ; 32 : 35-36.
- (2) V. G. DE BILLERBECK, C. ROQUES, P. VANIERE et P. MARQUIER. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*. En révision pour publication.
- (3) Groupe ECRIR. Le point sur la Légionellose. La lettre de l'infectiologue de la microbiologie clinique 2001; tome XVI, 6 : 193-196.
- (4) R.F. BREIMAN, B.S. FIELDS, G.N. SANDEN *et al.* Association of shower use with legionnaires' disease. Possible role of amoebae. *JAMA* 1990; 263 : 2924-2926.
- (5) J.E. VAN STEENBERGEN, SLIJKERMAN F.A.N., SPEELMAN P. The first 48 hours of investigation of an outbreak of legionellosis in the Netherlands. *Eurosurveillance* 1999; 4 : 112-115.
- (6) K. DE SCHRIJVER, E. VAN BOUWEL, L. MORTELMAS *et al.* Une épidémie de Légionellose parmi les visiteurs d'un salon en Belgique. *Eurosurveillance* 1999; 5 : 115-119.
- (7) B. DECLUDT , L. GUILLOTIN, B. VAN GASTEL *et al.* Foyer épidémique de Légionellose à Paris en juin 1998. *Eurosurveillance* 1999; 4 : 115-118.
- (8) Cas groupés de Légionelloses dans le 15^{ème} arrondissement de Paris, *Bull. Epidemiol. Hebdom.* août 1999. 41 : 173.
- (9) B. BENJILALI, A. TANTAOUI-ELARKI, M. ISMAILI-ALAOUI *et al.* Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plant. Méd. Phytothér.* 1986; 20 : 155-167.
- (10) B. BENJILALI, A. TANTAOUI-ELARKI, A. AYADI *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.