

# Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng sur les germes couramment associés à la contamination des formes pharmaceutiques liquides

Josias B.G. YAMEOGO<sup>1,2\*</sup>, Charles B. SOMBIE<sup>1</sup>, Salf OUEDRAOGO<sup>3</sup>, Hermine Zime DIAWARA<sup>1</sup>, Jérôme KABORE<sup>1</sup>, Belinda BASSAVE MONE<sup>2</sup>, Nathalie SIRIMA KOMI<sup>2</sup>, Rasmané SEMDE<sup>1</sup>

## Résumé

Dans un contexte de méfiance vis-à-vis des conservateurs antimicrobiens de synthèse, nous nous sommes intéressés à l'utilisation potentielle de l'huile essentielle et/ou l'extrait aqueux de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng dans la protection des formules pharmaceutiques. Le pouvoir antimicrobien de ces extraits a été évalué in vitro dans cette étude sur six souches bactériennes et deux souches fongiques communément associées à la contamination des formes pharmaceutiques. La méthode de diffusion en milieu gélosé à partir de puits a été mise à profit pour l'évaluation de la sensibilité des souches aux extraits végétaux. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la méthode de micro-dilution en milieu liquide. Toutes les souches microbiennes testées se sont révélées insensibles à l'extrait aqueux de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. En revanche, l'huile essentielle a montré de fortes activités antibactérienne et antifongique à des faibles concentrations. Les valeurs de concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues avec l'huile essentielle étaient de l'ordre de 0,312 à 1,250 % (v/v). Ces résultats montrent que l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng pourrait être exploitée pour la conservation des médicaments.

**Mots-clés :** *Cymbopogon schoenanthus*, huile essentielle, extrait aqueux, antimicrobien, formes pharmaceutiques, conservateur.

## Antimicrobial activity of *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng essential oil and aqueous extract on microorganisms commonly associated to the contamination of liquid dosage forms

### Abstract

In the context of current distrust of synthetic antimicrobial preservatives, the potential of *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng essential oil and/or aqueous extract in the protection of medicines was evaluated. In this work, the antimicrobial activity of these extracts has been studied in vitro with respect to six bacterial and two fungal strains commonly associated to the contamination of pharmaceutical products. The method of diffusion in agar and solid medium was used to assess the susceptibility of the strains to plant extracts. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by the method of micro-dilution in liquid

<sup>1</sup> Laboratoire de Développement du Médicament, ED2S, Université Joseph KI-ZERBO, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso.

<sup>2</sup> Laboratoire National de Santé Publique, Ministère de la santé, 09 BP 24 Ouagadougou 09, Burkina Faso.

<sup>3</sup> Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Centre National de Recherche en Sciences et Techniques (IRSS/CNRST), 03 BP 7047 Ouagadougou 03, Burkina Faso.

\* Auteur Correspondant : josiasbyg@yahoo.fr, Tel : 00226 70 06 12 92

medium. All microbial strains tested were found to be insensitive to the aqueous extract of *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. However, the essential oil has proven antibacterial and antifungal activities at low concentrations. The minimum inhibitory concentrations (MIC) values obtained with the essential oil were in the range of 0.312 to 1.250 % (v/v). These results show that the essential oil of *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng could be used for the preservation of medicines.

**Keywords:** *Cymbopogon schoenanthus*, essential oil, aqueous extract, antimicrobial, medicines, preservative.

## Introduction

La qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques constitue l'un des critères de qualité auquel doit satisfaire un médicament (1). Trois notions sont couramment utilisées pour décrire cette qualité microbiologique. Il s'agit de : i) l'absence de micro-organisme pour les préparations déclarées stériles, ii) la propreté microbienne pour les médicaments qui ne doivent pas être stériles (des limites de contaminations microbiennes sont exigées pour ces préparations), iii) la présence d'agents conservateurs antimicrobiens qui concerne certaines préparations stériles ou non (2).

Les conservateurs antimicrobiens sont des substances de nature chimique variée, utilisés pour prolonger la durée de conservation d'un médicament ou d'un cosmétique en évitant la prolifération de germes tels que les bactéries ou les champignons. Les principaux conservateurs antimicrobiens utilisés dans les domaines pharmaceutique et cosmétique sont les esters de l'acide 4-hydroxybenzoïque, également connus sous le nom de parabènes et les sels d'isothiazolinium (2,3). Les parabènes en particulier et les conservateurs d'origine synthétique en général ont fait l'objet de nombreuses polémiques et sont actuellement controversés en raison de leur cancérogénicité potentielle (4). Elles sont de ce fait très surveillées par les instances réglementaires. C'est pourquoi il est important d'étudier d'autres alternatives de conservation des produits pharmaceutiques liquides.

Un intérêt massif est depuis lors porté sur les conservateurs d'origine naturelle. A ce titre, plusieurs auteurs ont montré que certains extraits végétaux à propriétés antiseptiques peuvent améliorer la conservation des produits pharmaceutiques, des cosmétiques et des aliments. A titre d'exemple, on peut citer les extraits de pépins et pulpe de *Citrus grandis* Macf. (L.), de *Rubus rosaefolius* Smith ou les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* (L.), de *Rosmarinus officinalis* L., de *Calamintha officinalis* Bromfield ... (5,6,7).

C'est dans le contexte de méfiance vis-à-vis des conservateurs antimicrobiens de synthèse comme les parabènes et de recherche de nouveaux conservateurs naturels que nous nous sommes intéressés aux extraits de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng (poacées). *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng est une plante herbacée aromatique des régions chaudes très répandue en Afrique tropicale occidentale et centrale. Elle se développe au Burkina Faso sur des sols pauvres y compris dans les milieux apparemment les moins favorables aux plantes (8). La plante entière, les feuilles fraîches et le décocté sont traditionnellement utilisés comme insectifuge et antiseptique dans les infections de la peau (9). Les informations recueillies auprès des tradipraticiens de santé du Burkina Faso, font état d'une utilisation traditionnelle de cette plante comme antiseptique cutané et oral. Les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng ont été rapportées par d'autres auteurs (10,11). Cependant, il n'existe pas de données sur l'activité antimicrobienne du *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng du Burkina Faso. En effet, les données

disponibles concernent surtout la biologie, l'écologie de la plante et la composition chimique de son huile essentielle (8, 12).

Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel d'utilisation de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng comme conservateur antimicrobien des médicaments.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Matériels

#### 1.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng récoltées à Bérégadougou, dans la région des Cascades du Burkina Faso. L'identification botanique et l'authentification ont été réalisées par un botaniste, conformément à un herbier déposé sous le numéro N°4310, à l'herbarium du laboratoire d'écologie de l'Unité de formation et de recherche en sciences de la vie et de la terre (UFR/SVT) de l'Université Joseph KI-ZERBO. Les feuilles récoltées ont été lavées à l'eau de robinet puis découpées en petits morceaux.

#### 1.1.2. Souches microbiennes

Des souches microbiennes de référence conservés à -86 °C dans un surgélateur ont été utilisées. Les caractéristiques de ces souches sont présentées dans le tableau I. Le choix des espèces a été fait sur la base de leur fréquence dans la contamination des préparations pharmaceutiques, de leur pathogénicité, de leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens (*cas de Staphylococcus aureus*, *de Klebsiella pneumoniae* et *de Pseudomonas aeruginosa*) et des exigences de qualité microbienne des formes orales et dermiques. Au total, huit souches microbiennes ont été testées.

**Tableau I :** Caractéristiques des souches microbiennes utilisées.

Types de germes	Identité de la souche	Référence de la souche
Bactérie à Gram-positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
Bactérie à Gram-négatif	<i>Echerichia coli</i>	ATCC 8739
	<i>Salmonella enteridis</i>	ATCC 13076
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
Champignon	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16888

#### 1.1.3. Milieu de culture, réactifs et solvants

Les géloses Mueller Hinton (MH) et Sabouraud Dextrose (LiofilChem, Italie), les milieux Tryptone Soja Agar (TSA) et Sabouraud Chloramphénicol Agar (BioMaxima, Pologne), le chlorure de sodium (NaCl, Fluka, Allemagne) et le Dimethylsulfoxyde (DMSO, VWR International, France) ont été utilisés.

Les substances chimiques de référence (Ciprofloxacine USP et Ketoconazole USP) ont été obtenues avec la Pharmacopée américaine (USP). L'eau distillée a été fraîchement préparée au laboratoire à l'aide d'un distillateur GFL, modèle 2008 (Belgique).

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Préparation des extraits végétaux

L'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng a été extraite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Alambic. Pour ce faire, la matière végétale (100 kg) a été introduite dans la cuve de l'Alambic, additionnée d'une quantité d'eau puis distillée pendant 3 heures. L'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau est recueillie dans un flacon en plastique ambré hermétiquement fermé puis conservée au réfrigérateur entre 2 et 8°C. Le rendement en huile essentielle (Rd), défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (MHE) et la masse de la matière végétale utilisée (MMV) a été calculé selon la formule ci-après :

$$Rd = MHE / MMV \times 100$$

Rd : Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%) ;

MHE : Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g) ;

MMV : Masse de la matière végétale utilisée en gramme (g).

Deux échantillons d'huile essentielle ont été utilisés. L'un était vieux de 5 ans et l'autre a été fraîchement préparé à partir de la matière végétale récoltée en novembre 2018.

L'extrait aqueux a été obtenu par décoction de 100 g de matière végétale dans 1 L d'eau. Le décocté obtenu a été filtré à l'aide d'un filtre Nylon de porosité 0,8 µm, puis conditionné dans des flacons plastiques ambrés de type polyéthylène haute densité.

Les essais d'activité antimicrobienne ont été réalisés de décembre 2018 à juin 2019.

### 1.2.2. Préparation des inocula

Les souches bactériennes ont été repiquées sur la gélose TSA et les souches de *Candida albicans* et d'*Aspergillus niger* sur la gélose Sabouraud Chloramphénicol. Après incubation, une colonie fraîche bien isolée de chaque souche, issue du troisième repiquage, a été prélevée à l'aide d'une anse à platine et transférée dans un tube à hémolyse et mise en suspension avec une solution saline stérile (0,9 % NaCl). La turbidité de chaque suspension microbienne a été ajustée pour obtenir des concentrations finales de 10<sup>8</sup> UFC/mL (pour les bactéries) ou 10<sup>6</sup> UFC/mL (pour *Candida et Aspergillus*), par rapport à la solution standard Mc Farland 0,5.

### 1.2.3. Tests de sensibilité

La sensibilité des souches microbiennes aux extraits de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng a été évaluée par la technique de diffusion en milieu gélosé (13,14). Les milieux MH ou Sabouraud ont été ensemencés par inondation avec les inocula de bactéries ou de levure et champignon, respectivement. Ensuite, à l'aide d'un emporte-pièce stérile, quatre puits d'environ 6 mm de diamètre ont été effectués dans la gélose de chaque boîte à pétri. Les deux premiers puits de la boîte à pétri ont reçu 70 µL du même échantillon d'extrait végétal (huile essentielle ou décocté). Le troisième et le quatrième puits de la boîte ont reçu respectivement 70 µL de la solution du témoin

positif (solutions dosées à 500 mg/mL de ciprofloxacine pour l'activité antibactérienne et de kétoconazole pour l'activité antifongique) et 70 µL de la solution du témoin négatif (eau pour préparation injectable). Les tests de validation et de stérilité ont été réalisés avec des milieux de culture ensemencés ou non, respectivement.

Les boîtes de pétri ensemencées ont été incubées à 37° C pendant 24 h pour les bactéries, 25° C pendant 72 h pour *Candida albicans* et 25° C pendant 7 jours *Aspergillus niger*.

Après le temps d'incubation recommandé, la présence ou non de zone d'inhibition autour des puits a été observée. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle millimétrée.

Pour les essais de sensibilité, quatre dépôts ont été réalisés pour chaque échantillon d'extrait et pour chaque souche microbienne afin de confirmer les résultats par des analyses statistiques.

#### **1.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées à l'aide de la méthode de dilution en milieu liquide (15).

Huit gammes de concentration des extraits ont été préparés dans des tubes à essai selon la méthode de dilution successive en suivant une approche géométrique de raison ½. La première dilution de la gamme a été obtenue en mélangeant 1mL d'huile essentielle et 1mL de DMSO. Cent (100) µL de chaque gamme de dilution de l'extrait ont été ensuite transférés dans des micro-tubes stériles et mélangés avec 850 µL de bouillon MH ou Sabouraud selon la souche microbienne testée et 50 µL d'inoculum pur.

Pour chaque souche et chaque extrait testés, deux autres micro-tubes ont été utilisés comme témoin de croissance (témoin positif) et témoin négatif. Le tube témoin positif ne contient pas d'extrait végétal et le tube témoin négatif ne contient pas d'inoculum. Des bouillons inoculés avec 100 µL de DMSO ont été également utilisés pour tester l'activité antimicrobienne du solvant vis-à-vis des souches utilisées.

Après homogénéisation, 300µL du contenu de chaque micro-tube ont été introduits dans les cupules d'une plaque de micro dilution et incubés dans les conditions décrites dans les tests de sensibilité.

La CMI est la plus faible concentration de l'extrait pour laquelle il n'y a pas de croissance (absence de trouble) visible à l'œil nu après le temps d'incubation prescrit. La confirmation de la croissance ou non des germes est réalisée par ensemencement des contenus des cupules correspondant aux CMI et aux premières concentrations, juste après la CMI, conduisant à un trouble du milieu.

#### **1.2.5. Analyse et interprétation des données**

Les données sont présentées en moyenne ± Ecart type. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test ANOVA. La signification statistique a été établie à  $p < 0,05$ .

L'interprétation des données de sensibilité a été effectuée selon l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne décrite par Ponce *et al.* (14) en comparant les diamètres des zones d'inhibition aux valeurs de référence ci-après :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre  $\leq 8$  mm ;
- Sensible (+) : diamètre entre 9 à 14 mm ;
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm ;
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre  $\geq 20$  mm.

## II. Résultats

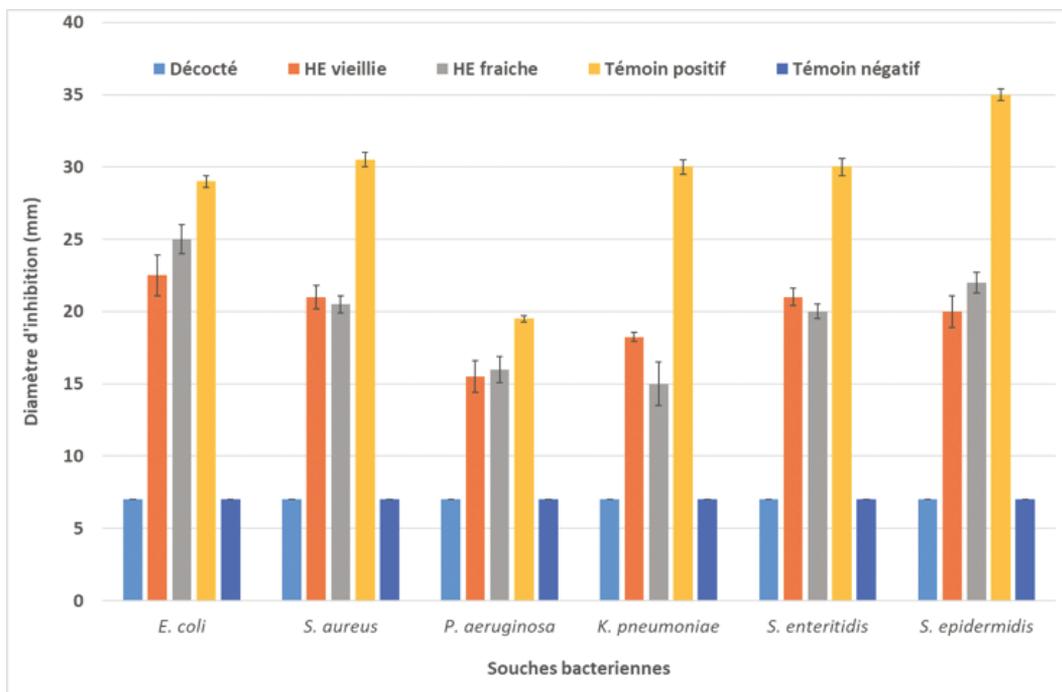
L'huile essentielle obtenue est un liquide visqueux limpide de couleur jaunâtre avec une odeur caractéristique. Le rendement d'extraction a été de  $0,41 \pm 0,03$  % (m/m).

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle (fraîche ou vieille de 5 ans) et du décocté aqueux de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng vis-à-vis des germes couramment associés à la contamination des formes pharmaceutiques sont présentés sur les figures 1 et 2. Ces résultats montrent des zones d'inhibition importantes des deux échantillons d'huile essentielle sur l'ensemble des souches bactériennes et fongiques testées. En effet, les souches de bactéries à Gram positif testées (*Staphylococcus aureus* ATCC6538 et *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) ont été extrêmement sensibles aux deux échantillons d'huile essentielle avec des diamètres d'inhibition de 20 à 22 mm.

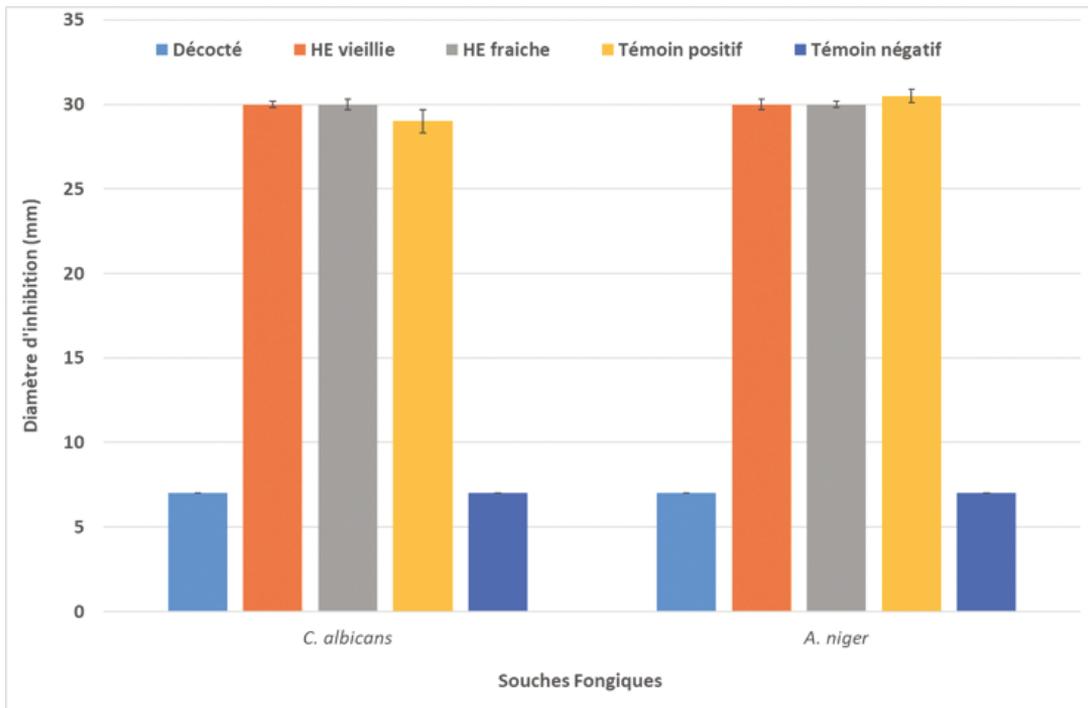
Pour les bactéries à Gram négatif, les souches *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Salmonella enteridis* ATCC 13076 sont extrêmement sensibles alors que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont très sensibles.

La souche de levure (*Candida albicans* ATCC 10231) ainsi que la souche de champignon (*Aspergillus niger* ATCC 16888) ont été extrêmement sensibles à l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng avec des diamètres d'inhibition de 29 à 30,5 mm.

Cependant l'extrait aqueux n'a pas montré d'activité vis-à-vis de ces souches microbiennes testées.



**Figure 1** : Diamètres d'inhibition (n = 3) des différents extraits de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng sur six souches bactériennes. (7 mm = diamètre de l'emporte-pièce, correspond à une absence de zone d'inhibition).



**Figure 2** : Diamètres d'inhibition (n =3) des différents extraits de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng sur deux souches fongiques. (7 mm = diamètre de l'emporte-pièce, correspond à une absence de zone d'inhibition).

Les contrôles de croissance et de stérilité réalisés ont donné des résultats favorables à la validité des essais de sensibilité. En effet, nous avons observé des colonies sur les milieux gélosés ensemencés utilisés pour le contrôle de croissance. Cela témoigne la viabilité des souches utilisées et de la fertilité de nos milieux de culture. Également, aucune colonie n'a été observée sur les boîtes de pétri non ensemencés utilisés pour le contrôle de stérilité. Ce qui atteste que les milieux de culture étaient stériles et n'ont pas été contaminés au cours de la manipulation.

Les résultats de la sensibilité des germes aux différentes dilutions de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng sont consignés dans les tableaux II et III. La croissance des germes est marquée par une turbidité du milieu tandis-que l'inhibition de croissance est marquée par une limpidité du milieu. Les bouillons utilisés pour le contrôle positif étaient troubles et aucune turbidité n'a été observée au niveau du contrôle négatif. Des concentrations minimales inhibitrices comprises entre 0,312 à 1,250 % (v/v) ont été enregistrées.

**Tableau II :** Sensibilité des souches vis-à-vis des dilutions de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng vieille de 5 ans.

ouches microbiennes	Concentration (% (v/v))							
	10,000	5,000	2,500	1,250	0,625	0,312	0,156	0,078
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. enteridis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

- Absence de croissance ; + Présence de croissance.

**Tableau III :** Sensibilité des souches vis-à-vis des dilutions de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng fraîchement préparée.

Souches microbiennes	Concentration ((%) (v/v))							
	10,000	5,000	2,500	1,250	0,625	0,312	0,156	0,078
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. enteridis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

- Absence de croissance ; + Présence de croissance.

### III. Discussion

Les rendements moyens de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche. Les différences de rendement obtenus à partir de plantes récoltées à diverses saisons dans le même milieu ne sont pas statistiquement significative ( $P = 0,28$ ). Ce qui témoigne d'une maîtrise du procédé d'extraction.

#### 3.1. Sensibilité des microorganismes aux extraits de *Cymbopogon schoenanthus*

Les résultats montrent que le décocté n'a aucune activité antimicrobienne sur les souches bactériennes et fongiques testées. Cette absence de sensibilité des germes pourrait s'expliquer par l'évaporation des composés volatiles de la plante lors de l'ébullition. Cela exclut toute possibilité d'utilisation de cet extrait comme conservateur antimicrobien. La littérature donne peu d'informations sur la composition et l'activité antimicrobienne du décocté de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng

mais beaucoup sur son utilisation contre les spasmes digestifs, les troubles intestinaux, les aigreurs et les intoxications alimentaires (16).

L'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng montre une très forte activité inhibitrice (extrêmement sensible) vis-à-vis de toutes les souches de bactéries à Gram positif testées. Par contre, pour les bactéries à Gram négatif, l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng montre une activité inhibitrice modérée (très sensible) vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, par rapport aux autres. Les plus grands diamètres d'inhibition des souches bactériennes sont obtenus avec *Escherichia coli*, bien qu'il soit communément reconnu que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux huiles essentielles (17). En effet, il est souvent rapporté que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux huiles essentielles (17). Cette résistance est attribuée à la présence de lipopolysaccharides dans la paroi cellulaire de ces bactéries qui constitue une barrière pour l'huile essentielle (18). *Pseudomonas aeruginosa*, est connue pour sa résistance à divers agents antimicrobiens du fait de sa capacité à former un biofilm, une organisation complexe composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se retrouvent en conditions physiologiques spécifiques à leur situation (18). Il est également reconnu bien souvent résistante aux huiles essentielles (17). *Klebsiella pneumoniae* est une entérobactérie connue également pour sa résistance naturelle aux antibiotiques. Ces bactéries sont responsables d'infections nosocomiales des surinfections des plaies et peuvent se retrouver dans les préparations pharmaceutiques d'où l'intérêt de tester l'activité antimicrobienne de nos extraits sur ces souches.

Cependant, les diamètres d'inhibition induits par l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng sur les cultures de toutes les souches bactériennes restent inférieurs à ceux obtenus avec la Ciprofloxacine, utilisée dans notre étude comme antibiotique de référence en raison de son spectre d'activité très large. En revanche, les diamètres d'inhibition induits sur les cultures de *Candida albicans* ATCC 10231 et de *Aspergillus niger* ATCC 16888 sont comparables à celles de la référence, le ketoconazole, qui est un antifongique à large spectre. Ces souches de levure et champignon sont les plus sensibles à l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng au regard des diamètres d'inhibition obtenus (29 à 30,5 mm).

L'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng a donc une très bonne activité antifongique sur *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. Ces microorganismes peuvent coloniser facilement les préparations pharmaceutiques liquides et entraîner une détérioration de leur qualité. Par conséquent, elles font partie des germes spécifiés recherchés lors du contrôle de la qualité microbienne des préparations pharmaceutiques (2, 3).

Plusieurs auteurs ont également rapporté de bonnes activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng, avec cependant des diamètres d'inhibition moins prononcés par rapport à ceux obtenus dans notre étude. A titre d'exemple, *Hellali et al.* (19) ont montré une activité inhibitrice de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* originaire d'Algérie, avec des diamètres d'inhibition de  $15,0 \pm 1,4$  ;  $19,5 \pm 0,7$  ;  $10,5 \pm 0,7$  et  $12 \pm 1,4$  mm, respectivement sur *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 et *Candida albicans* ATCC 10231. Également, *Haslim et al.* (11) ont trouvé des zones d'inhibition plus faibles de  $12$  ;  $5 \pm 0,6$  ;  $14 \pm 0,16$  et  $15 \pm 0,2$  mm, respectivement sur *Escherichia coli* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 et *Staphylococcus aureus* avec l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng d'Arabie Saoudite. Par contre, *Koba et al.* (20) ont trouvé que l'huile essentielle *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng du Bénin avait un faible pouvoir inhibiteur sur *Pseudomonas aeruginosa* et sur *Staphylococcus intermedius*. Le faible pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle de *Cymbopogon*

*schoenanthus* du Benin a été attribué à la présence d'une forte concentration en pipéritone, cétone considérée déjà comme peu active (20, 21). Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles seraient attribuées à leur profil chimique. Un screening phytochimique des échantillons d'huile essentielle utilisés dans notre étude est en cours dans notre laboratoire et permettra d'établir une relation entre sa composition chimique et son activité antimicrobienne.

Des travaux de Yentema *et al.* (12), l'action antimicrobienne marquée de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng originaire de la région des Cascades du Burkina Faso pourrait être attribué à une forte proportion en alcools terpéniques et en phénols. Il est en effet souvent constaté des différences dans la composition chimique des huiles essentielles liées entre autres aux conditions climatiques de culture de la plante, au procédé d'extraction de l'huile essentielle, aux conditions de conservation, etc (22).

Par ailleurs, les différences de zones d'inhibition observées entre l'huile essentielle fraîchement extraite et celle vieille de cinq ans ne sont pas statistiquement significatives pour toutes les souches microbiennes ( $P = 0,17$ ). Ce qui signifie que les conditions de conservation sont adéquates et n'entraîneraient pas d'altération des caractéristiques de l'huile essentielle. Ces résultats sont également en faveur d'une absence de variation de la composition chimique de l'huile essentielle en fonction de l'année de récolte.

Au regard des résultats des tests de sensibilité, on peut affirmer que l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng de la région des cascades du Banfora possède une très bonne activité antibactérienne et antifongique avec un spectre d'action large. Ceci est en faveur de l'utilisation de cette huile comme conservateur antimicrobien des préparations pharmaceutiques.

### 3.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée uniquement avec les échantillons d'huile essentielle, l'extrait aqueux s'étant révélé non inhibiteur de la croissance microbienne. Les dilutions de l'huile essentielle ont été réalisées avec une solution de 1 % de DMSO utilisé comme solvant. Les bouillons inoculés avec le DMSO ont montré qu'à la concentration utilisée, ce solvant n'avait pas d'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées.

Les résultats des tableaux VI et VII montrent une activité dose dépendante de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng sur les souches bactériennes et fongiques testées. En effet, la croissance des germes a été inhibée par les plus fortes concentrations d'huile essentielle. Cette inhibition s'est traduite par une limpidité des bouillons de culture semblable à ceux des témoins négatifs. En revanche, les souches ont été insensibles aux plus faibles concentrations d'huile essentielle, notamment à partir de la dilution au 8<sup>ème</sup>. L'absence d'inhibition de la croissance des microorganismes est marquée par une turbidité du bouillon de culture comparable à ceux des témoins positifs.

Les CMI obtenues avec l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng sur les souches bactériennes et fongiques testées sont comprises entre 0,312 à 1,250 % (v/v). La plus faible CMI (0,312 % (v/v)) est obtenue avec les souches de *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Escherichia coli*. Par contre la plus grande CMI (1,250 % (v/v)) a été observé avec les souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus avec les tests de sensibilité qui montraient que les premières souches étaient extrêmement sensibles, tandis que les dernières étaient très sensibles. Toujours en adéquation avec les résultats de l'essai de sensibilité, des CMI intermédiaires de 0,625 % (v/v) ont été obtenues avec les souches de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis* et *Salmonella enteridis*.

Des CMI similaires ou plus faibles de CMI sur *Staphylococcus aureus* et sur *Escherichia coli* ont été obtenues par *Alitonou et al.* avec l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng originaire de la région du Djougou au Bénin (10) et de l'Arabie Saoudite (11). Par contre, *Koba et al.* (21), ont montré l'absence d'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng du Bénin, sur des souches d'*Aspergillus sp* et de *Pseudomonas aeruginosa* avec des CMI supérieures à 500 mg.mL<sup>-1</sup>.

Des différences de CMI (d'un pas de dilution) entre l'huile essentielle fraîchement préparée et celle vieille de cinq ans sont observées sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Escherichia coli*. En dehors de ces deux cas, les CMI des deux échantillons d'huile essentielle sont similaires sur les autres souches. La différence de CMI observée est probablement due à des proportions légèrement différentes des constituants chimiques. L'évaluation phytochimique en cours permettra de confirmer ou pas cette hypothèse.

Les faibles CMI retrouvées sur une large gamme de souches microbiennes dans cette évaluation sont en faveur de l'utilisation de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng comme conservateur antimicrobien des préparations pharmaceutiques.

## Conclusion

Le présent travail constitue une étude préliminaire dans la recherche et le développement de conservateurs antimicrobiens à partir d'extrait de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng.

Les résultats obtenus montrent que le décocté n'a aucune activité antimicrobienne contrairement à l'huile essentielle qui possède une très bonne activité antibactérienne et antifongique à large spectre avec des CMI très faibles. Ces données obtenues in vitro permettent d'envisager l'utilisation de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng comme conservateur antimicrobien des préparations pharmaceutiques.

Cependant, d'autres études complémentaires s'avèrent nécessaires afin d'évaluer l'impact de certains paramètres de formulation tels que le pH et la force ionique sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle. Le mécanisme d'action de cette huile sur les différents germes devra également être élucidé. Ensuite, les études de phytochimie et de toxicité orale en cours dans notre laboratoire, permettront de compléter l'évaluation du potentiel d'utilisation de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng comme conservateur antimicrobien.

## Références Bibliographiques

1. DIRECTION EUROPEENNE DE LA QUALITE DU MEDICAMENT ET SOINS DE SANTE. Pharmacopée Européenne 2019; 10è éd.: 220-5.
2. LEVACHER E. PHI 41 Pharmacotechnie Industrielle, IMT Editions 2006; 2 è éd, 673p
3. LE HIR A., CHAUMEIL J-C., BROSSARD D., CHARRUEAU C., CRAUSTE-MANCIET S. Pharmacie galénique – Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. Masson 2016; 10è éd., 433p.
4. DARBRE P. D., ALJARRAH A., MILLER W. R., COLDHAM N. G., SAUER M. J., POPE G. S. Concentrations of parabens in human breast tumors. Journal of Applied Toxicology 2004; 24:5-13.
5. HERMAN A. Antimicrobial Ingredients as Preservative Booster and Components of Self-Preserving Cosmetic Products. Current Microbiology 2019; 76: 744–54
6. OSTROSKY E. A., MARCONDES E. M., NISHIKAWA SDE O., LOPES P. S., VARCA G. H., PINTO TDE J. *et al.* *Rubus rosaefolius* extract as a natural preservative candidate in topical formulations. AAPS PharmSciTech. 2011; 12:732-7.

7. **NOSTRO A., CANNATELLI M. A., MORELLI I., MUSOLINO A. D., SCUDERI F., PIZZIMENTI F. et al.** Efficiency of *Calamintha officinalis* essential oil as preservative in two topical product types. *J. Appl. Microbiol.* 2004; 97:395-401.
8. **DEVINEAU J.-L., FOURNIER A.** Integrating environmental and sociological approaches to assess the ecology and diversity of herbaceous species in a Sudan-type savanna (Bondoukuy, western Burkina Faso). *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 2007; 202: 350-70.
9. **MARWAT S.K., KHAN M. A., UR-REHMAN F., BHATTI I.U.** Aromatic plant species mentioned in the holy Qura'n and Ahadith and their ethnomedicinal importance. *Pak. J. Nutr.* 2009; 8: 1472-9
10. **ALITONOU G.A., AVLESSI F., TCHOBO F., NOUDOGBESSI J. P., TONOUHEWA A., YEHOUEYOU B. et al.** Chemical composition and biological activities of essential oils from the leaves of *Cymbopogon giganteus* Chiov. and *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng (Poaceae) from Benin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2012; 6:1819-27.
11. **HASHIM G.M., ALMASAUDI S. B., AZHAR E., AL JAOUNI S. K., HARAKEH S.** Biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil. *Saudi J Biol Sci* 2017;24: 1458-64.
12. **YENTEMA O., OUEDRAOGO A., SAMATE A.** Composition chimique et caractéristiques physiques de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng du Burkina Faso. *Journal des Sciences Appliquées* 2007; 7: 503-6
13. **HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl Microbiol.* 1999, 86: 985-90.
14. **PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C., ROURA S.I.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 2003; 36:679-84.
15. **SHAN B., CAI Y., BROOKS J.D., CORKE H.** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 117: 112-9.
16. **AKOËGNINO A., VAN DER BURG W.J., VAN DER MAESEN L.J.G.** Flore Analytique du Bénin. Backhuys Publishers 2006; 1034p
17. **REYNOLDS J.** The Extra Pharmacopoeia 1996, 31st edition. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London.
18. **KALEMBA D., KUNICKA A.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils, *Curr. Med. Chem.*,2003; 10: 813-29
19. **HELLALI M., MAHFOUD HADJ M., FARAH R., TALLI A.** Antimicrobial and antioxidant activities of *Cymbopogon schoenanthus* (L.) spreng essential oil, growing in Illizi Algeria. *J. Med. Plants Res.* 2015; 10(14): 188-94
20. **KOBA K., SANDA K., RAYNAUD C., NENONENE Y.A., MILLET J., CHAUMONT J.P.** Activités antimicrobienne d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon sp.* africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Ann. Med. Vet.* 2004; 148:202-6
21. **KOBA K., SANDA K., RAYNAUD C., MANDIN D., MILLET J., CHAUMONT J.P.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* L. (DC) Stapf., *C. nardus* L. Rendle et *C. schoenanthus* L. Spreng. *J. Mycol. Méd.* 2003; 13: 175-85.
22. **OLIVEIRA M.J., IANI F.P.C., OLIVEIRA C.B.A., SANTOS M.R., SOUZA P.S., SANTOS S.C., SERAPHIN J.C., FERRI P.H.** Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical Systematics and Ecology* 2005; 33: 275-85.