



Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires

Evaluation of antibacterial properties of essential oils and/or of their major components

Stéphane Fontanay, Marie-Eugénie Mougenot, Raphaël E. Duval

CNRS, SRSMC, UMR 7565, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France

Université de Lorraine, SRSMC, UMR 7565, F-54001 Nancy

ABC Platform®, F-54001 Nancy

raphael.duval@univ-lorraine.fr

Résumé

La recherche de nouveaux traitements contre les maladies infectieuses est un sujet de pleine actualité : l'émergence et la dissémination des mécanismes de résistance aux antibactériens, l'importance croissante des infections associées aux soins, combinées à la quasi absence de nouveaux antibiotiques génèrent, au-delà de la santé individuelle, un véritable problème de santé publique. Il y a urgence à trouver et à proposer des nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement de ces infections. Dans ce contexte, les Huiles Essentielles (HE) connues et utilisées depuis des siècles pour leurs propriétés anti-infectieuses, peuvent se révéler être une alternative au « tout antibiotique ». En effet, depuis plusieurs années, les HE connaissent un très net regain d'intérêt, et plusieurs études tendent à démontrer leurs réelles propriétés antimicrobiennes.

Cependant, avant d'envisager toute utilisation des HE en thérapeutique anti-infectieuse, nous devons relever un défi de taille : à l'heure actuelle, aucun protocole expérimental, permettant d'évaluer *in vitro* les propriétés antibactériennes d'une HE, n'est validé ou recommandé par aucune autorité réglementaire, quelle qu'elle soit (Pharmacopée, ISO, ANSM...). L'objectif de cette revue est de présenter les différentes techniques utilisées ou utilisables pour l'évaluation *in vitro* des propriétés antibactériennes d'une HE, en soulignant les avantages et les inconvénients de chacune.

Mots-clés

Huiles Essentielles ; Activités antibactériennes ; Méthodes d'évaluation

Abstract

The search for new treatments against infectious diseases is currently highlighted : the emergence and dissemination of resistance mechanisms to antibacterial drugs, the increasing importance of infections associated to healthcare, combined with the quasi inexistence of new antibiotics generates, beyond individual health, a real problem of public health. It is now urgent to find and to propose new therapeutic approaches for the treatment of these infections. In this context, essential oils (EO) known and used for centuries for their anti-infectious properties, may present as an alternative to "all-antibiotic". As a matter of fact, since many years now E O aroused considerable new interest and many studies tend to support their real antimicrobial properties.

However, before envisaging the use of EO in infectious therapeutics, we must face a considerable challenge: currently no experimental protocol allowing and in vitro evaluation of the antibacterial properties of an EO has been validated or recommended by any health authority whatsoever. The aim of this review is to present the different techniques used or which could be used for the in vitro evaluation of antibacterial properties of EO, underlining the advantages and drawbacks of each.

Keywords

Essential oils; Antibacterial properties; Evaluation methods



Introduction

Les Huiles Essentielles (HE), connues et utilisées depuis l'Antiquité, étaient initialement obtenues par macérât de plantes aromatiques dans des huiles végétales en Egypte et en Chine. La découverte du papyrus « Ebers » datant du XVI^e siècle avant notre ère, a permis de découvrir différentes formulations à base d'HE utilisées en thérapeutique ou dans la vie de tous les jours. Ces différents remèdes étaient utilisés pour leurs multiples propriétés, en particulier leurs propriétés antimicrobiennes (Bassolé et Juliani, 2012). C'est à partir du XVIII^e siècle, avec l'avènement de la Chimie Moderne (découverte du chlore, de l'iode...), et la promotion de l'asepsie (utilisation de l'eau de Javel...) pour la prévention du risque infectieux, que l'utilisation des HE s'est réduite ; jusqu'à tomber en désuétude au cours du XX^e siècle, du moins dans les pays « occidentaux », suite à la découverte et l'essor rapide des antibiotiques. Cependant, depuis plusieurs années, l'engouement du grand public pour les Médecines « douces » et « naturelles » s'est considérablement accru : homéopathie, phytothérapie, gemmothérapie... L'aromathérapie (ou thérapeutique par les HE) n'a pas échappé à ce regain d'intérêt ; en effet, l'étude et l'utilisation des HE a non seulement suscité l'intérêt du grand public, mais aussi celui des scientifiques. Ainsi, si nous effectuons une recherche d'articles scientifiques avec les mots clés « essential oils as antimicrobial agents », sur la base de données la plus couramment et fréquemment utilisée par les chercheurs (*i.e.* « PubMed ») nous obtenons une liste de 3 097 références, dont 169 revues. Au-delà d'un aspect chiffré, il est très intéressant de constater que le nombre d'articles scientifiques publiés sur ce thème a très nettement augmenté à partir des années 2000 (Fig. 1).



Figure 1

Nombre de publications mentionnant les activités antimicrobiennes des Huiles Essentielles depuis 1949 (base de données PubMed, date de création 19-06-2014).

Cette augmentation exponentielle du nombre d'articles relatant les activités antimicrobiennes des HE peut s'expliquer au moins par deux points : la multiplication des micro-organismes résistants aux anti-infectieux d'une part et la nette diminution de l'arsenal thérapeutique d'autre part. En effet, les principales recherches menées jusqu'alors en microbiologie portaient essentiellement sur (i) le Virus de l'Immunodéficience Humaine, (ii) sur la Tuberculose et (iii) le Paludisme (ou Malaria). Cet état des lieux devient particulièrement alarmant lorsque l'on sait que dans le domaine de la Bactériologie, seulement 14 antibiotiques ont obtenu l'équivalent de l'Autorisation de Mise sur le Marché française, aux États-Unis depuis 1998 (Boucher *et al.*, 2013). Avec la multiplication et la dissémination des Bactéries Multi-Résistances (BMR), la raréfaction de nouveaux antibiotiques, il existe un risque réel d'impasse thérapeutique (*i.e.* l'impossibilité de prendre en charge des patients développant une pathologie d'origine infectieuse), qui nous amènent et nous obligent à envisager d'autres stratégies thérapeutiques alternatives au « tout antibiotique ».

La Recherche de nouveaux principes actifs anti-infectieux, durant plusieurs décennies, s'est principalement focalisée sur le développement de molécules hydrosolubles. Ce choix repose sur les propriétés physicochimiques intrinsèques de ces molécules et *de facto*, leur facilité d'utilisation en thérapeutique.



En effet, les molécules hydrosolubles sont censées se dissoudre plus facilement dans le sang et les autres milieux physiologiques, permettant un transport et une diffusion optimale dans l'organisme. Les molécules hydrophobes, quant à elles, ne sont que peu solubles dans les fluides biologiques, et ont une mauvaise diffusion dans l'organisme. Cependant, ce type de molécule a la propriété de traverser plus facilement les membranes et barrières biologiques. Cette dernière caractéristique laisse entrevoir une perspective intéressante pour la recherche de nouvelles thérapeutiques.

Les récents scandales ayant touché le domaine de la Santé en général, et celui du Médicament en particulier, nous ont rappelés qu'un principe actif (quel qu'il soit) doit, avant toute utilisation en thérapeutique, faire ses preuves. Il doit, en premier lieu, prouver son efficacité puis démontrer sa sécurité d'emploi. Ces différents événements, largement médiatisés, ont provoqué un retour vers une Médecine plus « traditionnelle » ou « naturelle » chez un grand nombre de patients, jugeant ces thérapeutiques plus « saines » et « sans danger ». Cet engouement pour des thérapeutiques naturelles nous pousse à confirmer les propriétés biologiques des HE. Nous nous intéresserons ici uniquement à l'étude des propriétés antibactériennes des HE. A l'heure actuelle, il existe un certain nombre de recommandations et autres normes qui permettent l'évaluation *in vitro* d'un futur candidat médicament (phase préclinique du développement d'un médicament). Les données issues de cette phase sont indispensables pour toutes les étapes de développement, en particulier la mise en place des essais cliniques. Dans le cas des HE, il existe dans la littérature une multitude de techniques différentes mises en place. Ces techniques, toutes différentes les unes des autres, sont utilisées pour évaluer et/ou démontrer *in vitro*, les propriétés antimicrobiennes des HE (et plus particulièrement dans notre cas, antibactériennes). Cette situation nous montre tout le travail d'harmonisation qu'il reste à effectuer dans ce domaine particulier de Recherche et Développement. De plus, il est important de souligner qu'il n'existe pas à l'heure actuelle, de protocole pour l'évaluation antibactérienne des HE clairement mentionné dans les 3 principales Pharmacopées : Européenne, Américaine et Japonaise.

L'objet de cet article est donc de faire le point sur les différentes techniques qui sont actuellement utilisées pour effectuer l'évaluation des propriétés antibactériennes des HE, tout en soulignant les limites, avantages et inconvénients de chacune de ces méthodes.

Aspect normatif

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'un principe actif se fait grâce à la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La CMI se définit comme la plus faible concentration en principe actif capable d'inhiber toute croissance bactérienne à 24 h (cette grandeur est aussi utilisée pour l'évaluation des activités antifongiques) (Jehl, 2014). La CMI se distingue de la CMI₅₀, de la CMI₉₀ et de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide). Il existe plusieurs définitions des CMI₅₀ et CMI₉₀ suivant les auteurs. Nous ne retiendrons que celle de la CMB qui correspond à la concentration en principe actif permettant de tuer 99,9 % des bactéries à 24 h. La CMI est actuellement la seule valeur pour laquelle il existe un consensus en termes de définition et d'utilisation, pour l'évaluation des activités antibactériennes et antifongiques. En ce qui concerne les activités antivirales, les efficacités recherchées sont très différentes, et ne seront pas détaillées ici.

Les protocoles permettant de déterminer la CMI apparaissent dans de nombreuses recommandations : le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) pour la France (Jehl, 2014) ; l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Kahlmeter *et al.*, 2006) au niveau européen ; le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) au niveau américain (CLSI, 2012). A cette liste de recommandations, il convient également de citer les normes issues de l'ISO (*International Organization for Standardization*) dont fait partie l'AFNOR (Association Française de Normalisation). Nous pouvons noter que le comité technique de l'ISO sur les HE (« ISO/TC 54 Huiles Essentielles ») présente des normes relatives aux paramètres physico-chimiques liées à leur qualité et/ou leur provenance, mais aucune norme sur leur activité biologique et/ou leurs composants (parmi les 128 publiées, les 22 pays participants et les 29 pays observateurs).

Trois méthodes sont fréquemment utilisées et citées dans la littérature : la dilution du principe actif en milieu solide ou « macrométhode en milieu gélosé » (considérée par beaucoup d'auteurs comme la méthode de « référence ») ; la diffusion du principe actif en milieu solide ou « méthode des disques » ; et la dilution du principe actif en milieu liquide, macro- ou micro-méthode en milieu liquide.

Quelle que soit la méthode considérée, plusieurs paramètres communs sont en général retrouvés :

- ▶ la taille de l'inoculum bactérien (5×10^5 - 5×10^6 Unité Formant Colonie par millilitre, UFC/mL) ;
- ▶ le milieu de culture à utiliser (milieu Mueller-Hinton bouillon ou agar) ;
- ▶ la température d'incubation ($35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) ;
- ▶ le temps d'incubation (entre 18 et 24h).



En ce qui concerne le milieu de culture à utiliser (*i.e.* Mueller-Hinton), il est important de préciser que ce milieu est préconisé à partir du moment où les études font apparaître l'utilisation d'antibiotiques, soit comme molécules de référence (pour comparer une efficacité antibactérienne obtenue avec une HE, par exemple), soit quand les auteurs veulent vérifier le profil de résistance des souches utilisées au cours des études. Depuis les dernières recommandations CA-SFM/EUCAST 2014, il est préconisé d'utiliser le milieu Mueller-Hinton II (MHB II) (Jehl, 2014).

En ce qui concerne les souches bactériennes, les auteurs se doivent de préciser l'origine des souches bactériennes : si leurs souches sont issues de collection ou à défaut d'isolats cliniques. Dans tous les cas, il est nécessaire de s'assurer de la pureté des souches, mais aussi de pouvoir renseigner si elles ont acquis un mécanisme de résistance, et le cas échéant, lequel. Si les souches sont d'origine inconnue ou mal documentée, il est donc nécessaire de réaliser un antibiogramme. Les souches de références sont normalement accessibles auprès de sociétés nationales et/ou internationales spécialisées. Nous pouvons citer à titre d'exemple l'*American Type Culture Collection* (ATCC) pour le continent Nord-Américain, ou la Collection de l'Institut Pasteur (CIP) pour la France. Ces souches sont, quoi qu'il en soit, référencées et classées. En effet, elles possèdent une « carte d'identité », correspondant au « numéro ATCC » ou « numéro CIP », et permettant d'accéder directement à toutes les informations relatives à une souche particulière (origine, provenance, profil de résistance aux antibiotiques, utilisation dans un contexte normatif...). A titre d'exemple, si nous considérons la bactérie *Escherichia coli*, il existe actuellement 789 souches référencées au catalogue ATCC. C'est pourquoi, il est nécessaire de préciser le numéro ATCC ou CIP, et/ou d'apporter le plus d'informations possibles quant à l'origine et au profil de résistance de la souche testée. Reste pour le chercheur à choisir quelles souches tester. Beaucoup d'études sur les HE antimicrobiennes se sont portées sur les bactéries se développant dans les aliments d'origine industrielle et pathogènes pour l'Homme. D'autres études, se sont quant à elles intéressées aux micro-organismes d'intérêt médical, en particulier les bactéries associées à des Infections Nosocomiales (IN), ou infections liées aux soins. En France, depuis plusieurs années, le Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN), enquête, entre autres, sur ces IN et établissent « l'Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé » (RAISIN, 2012). La dernière enquête, datant de 2012, montre une prévalence des IN de 5,3 % (en augmentation par rapport à 2006). Les espèces bactériennes les plus rencontrées sont : *Escherichia coli* (26 %), *Staphylococcus aureus* (15,9 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (8,4 %). En ce qui concerne, les bactéries *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, il y existe un consensus : les souches de référence sont *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Pour *Staphylococcus aureus*, un consensus existe depuis peu, la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (faible résistance aux pénicillines) a été acceptée par la SFM lors de la dernière version du CA-SFM/EUCAST de 2014 (Jehl, 2014).

L'ensemble de ces recommandations doit évidemment servir à la réalisation de comparaisons entre les études. Il faut, par conséquent, que les auteurs respectent *a minima* ces règles communes et fournissent l'ensemble des informations permettant d'obtenir un regard critique quant à la comparaison des résultats.

Aspect méthodologique

Il est nécessaire de rappeler que la qualité d'obtention de l'échantillon est primordiale, en particulier dans le domaine des HE. En effet, la composition des HE diffère d'une part suivant les genres et espèces de plantes ; et d'autre part dans la teneur de leurs différents composants, suivant la provenance, la localisation géographique de la plante dont est extraite l'HE (même pour des plantes d'une même espèce). C'est pourquoi, il est nécessaire de réaliser une chromatographie en phase gazeuse associée à un spectrophotomètre de masse afin de définir la composition et la teneur des éléments à tester.

La méthode de référence : la méthode en milieu gélosé

Dans cette méthode, la substance à tester est incorporée dans la gélose, avant que celle-ci ne soit coulée dans les boîtes de Pétri. La gélose ne peut être coulée qu'après avoir été maintenue en surfusion (entre 50 et 60°C). Lorsque cette gélose est prise en masse, il ne reste qu'à ensemencer les bactéries, puis incubé à 35°C pendant 24h. La CMI ainsi obtenue s'observe à l'œil nu par l'absence de croissance bactérienne à la surface de la boîte de Pétri. Elle sera ainsi fonction de la concentration en principe actif, mais aussi de la bactérie testée, dans la limite de la gamme de concentrations testée.

Cette technique reste fastidieuse et présente plusieurs inconvénients. En effet, les HE sont constituées de molécules aromatiques volatiles, et ce, même à température ambiante. Il devient alors difficile de connaître la concentration des molécules effectives (contenues dans les HE) dans la gélose en surfusion. De plus, cette méthode « à chaud » est délicate à mettre en œuvre : il est nécessaire de maîtriser la température, car une diminution de celle-ci pourrait entraîner une solidification de la gélose et par conséquent un manque d'homogénéité de la substance à tester, ainsi qu'une erreur potentielle d'interprétation. En outre, la quantité de travail et de matériel nécessaires pour cette méthode sont des facteurs limitants. Pour réaliser une gamme de concentrations, il faudra ainsi réaliser autant de boîtes de Pétri que de concentrations à tester. Pour s'assurer de la répétabilité de l'expérience, il sera nécessaire de réaliser plusieurs fois ces tests, en général en triplicat. En outre, afin d'évaluer le spectre antibactérien, il faudrait tester plusieurs espèces bactériennes, mais il est délicat (même si cela reste possible) d'ensemencer plusieurs bactéries sur une même boîte. Enfin, le volume de gélose pour chaque boîte de Pétri est de 17 mL ; la quantité d'HE sera donc proportionnelle à cette quantité de gélose, et suivant la gamme de concentrations peut s'avérer être très consommatrice en HE. Ainsi, même si cette technique reste la méthode de référence pour la détermination de la CMI pour les HE, car elle permet d'étudier les propriétés antibactériennes d'un grand nombre de substances (dont les substances hydrophobes), elle présente un certain nombre de limites.

La méthode la plus connue : la méthode des disques

Actuellement, cette méthode est la plus connue et la plus utilisée, elle consiste en l'ensemencement sur un milieu gélosé, dans une boîte de Pétri, d'une suspension bactérienne. La substance à tester est ensuite imprégnée sur un disque de cellulose, lui-même déposé sur la boîte de Pétri. Durant l'incubation, la substance est alors censée diffuser dans la gélose (à la surface et/ou dans la masse) ce qui crée un gradient de concentration dépendant de la substance (**Fig. 2**).

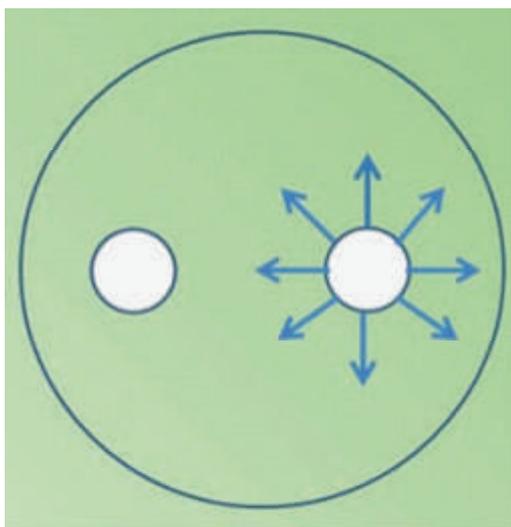


Figure 2

Principe de la diffusion du principe actif dans la méthode « des disques ». Les disques de cellulose imprégnés de la substance à tester sont déposés à la surface de la gélose et laisse diffuser la substance dans la gélose (à la surface et/ou dans la masse), créant ainsi un gradient de concentration de la substance à tester.

Plusieurs inconvénients concernant cette technique sont également à noter :

La préparation des disques, également appelée « imprégnation » peut se mesurer de deux façons : par la mesure de la masse de l'échantillon (la façon la plus courante) ou la mesure du volume de l'échantillon. En effet, pour être déposé sur les disques de cellulose, l'échantillon doit se trouver sous forme liquide ; mais la nature du solvant à utiliser, les volumes ou concentrations à tester restent à déterminer. Dans l'absolu, le solvant le plus facile à utiliser est l'eau. Pour de très petits volumes d'HE, une dilution de cette HE pourrait être envisageable; seulement les HE n'étant pas miscibles à l'eau, il semble plus facile et logique de déposer un volume connu d'HE sur les disques. Cependant, les disques ont une capacité d'absorption limitée, il est donc important de ne pas dépasser cette capacité afin de connaître le volume exact déposé. De plus, dans la littérature nous pouvons observer que les expériences menées utilisent des volumes d'HE et des disques de diamètre différent (donc capacités d'absorption différentes) empêchant par ce fait une comparaison entre ces études (Janssen *et al.*, 1986). En outre, les HE étant hydrophobes et liposolubles, il est difficile d'être certain de la bonne diffusion de l'ensemble des constituants de l'échantillon dans la gélose. Le milieu gélosé peut être vu comme un support à 3 dimensions, un maillage complexe de différentes molécules qui peut freiner ou piéger la diffusion d'éléments chimiques présents dans un échantillon aussi complexe qu'une HE. Ainsi, ces différentes molécules peuvent migrer de façons différentes dans la gélose, ce qui peut là aussi être source d'interprétation erronée.



L'activité antibactérienne, lorsqu'elle est observée, apparaît sous la forme d'un halo d'inhibition autour du disque. Le diamètre mesuré donne une donnée qualitative de l'inhibition, avec comme règle : « Plus le diamètre d'inhibition est important, plus l'échantillon présente une activité antibactérienne importante ». Cette mesure ne peut cependant être quantitative, car la relation diamètre critique/concentration critique n'est pas connue et définie pour les HE (à la différence des antibiotiques). Cette méthode ne permet donc qu'une approche qualitative de l'activité antibactérienne des HE.

La méthode des disques présente aussi quelques difficultés d'interprétations. Dans l'exemple qui va suivre nous utilisons une HE de citron (*Citrus limonum* – zestes pressés) de la marque Phytosun™. Quatre bactéries ont été testées : *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, toutes de souches ATCC définies précédemment. Les disques ont été préparés de trois manières différentes :

- ▶ 10 µL d'un mélange eau/DMSO (V/V 50/50) par disque ;
- ▶ 10 µL d'un mélange HE/DMSO (V/V 50/50) par disque ;
- ▶ 10 µL d'HE pure par disque.

Le but de ces trois conditions différentes étant d'évaluer l'impact du dispersant (ici le DMSO) sur la diffusion de l'HE dans le milieu de culture gélosée (Fig. 3).

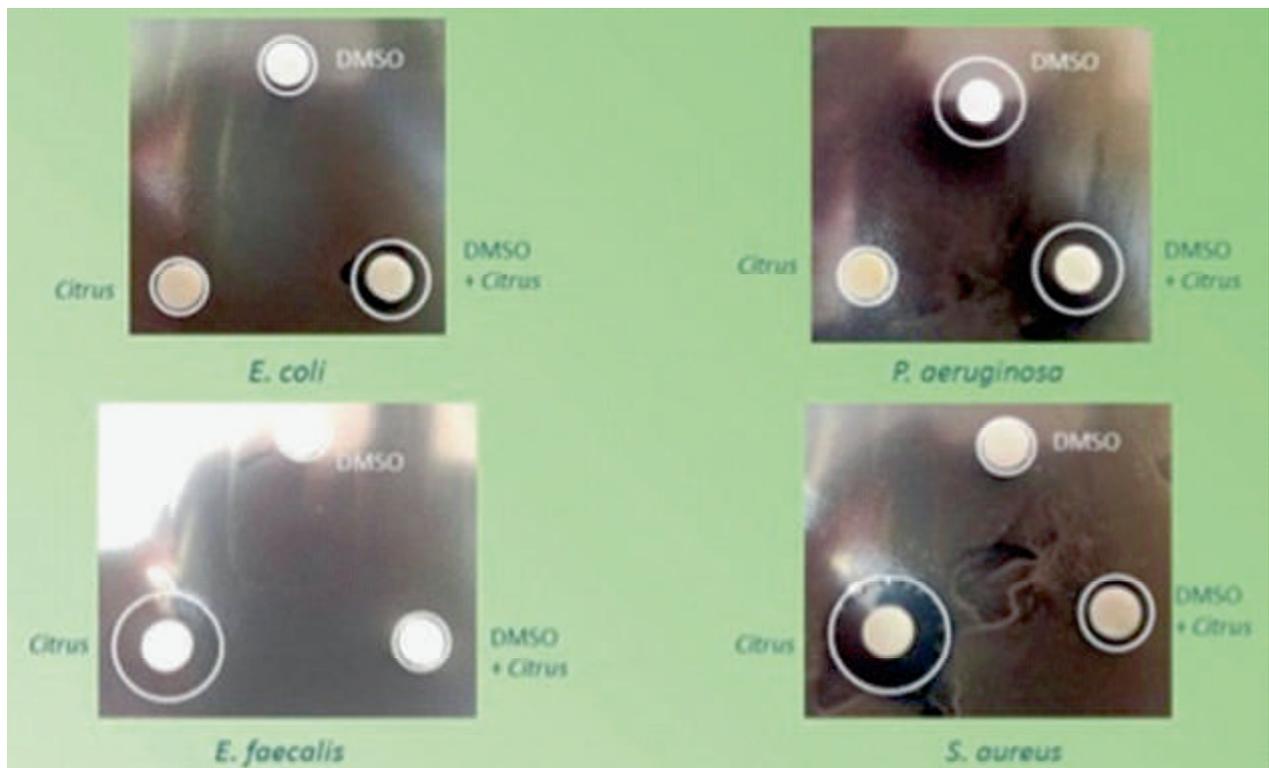


Figure 3

Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de Citrus limonum par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Quatre bactéries ont été testées : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *S. aureus*. Les disques ont été préparés suivant 3 conditions : mélange DMSO/eau, mélange DMSO/Citrus limonum ou Citrus limonum « pur ».

Trois comportements distincts ont été mis en évidence :

- **pour *E. coli*** : un très faible diamètre d'inhibition est observé pour les conditions « Eau et DMSO » et « HE pure ». Cependant, pour le mélange « HE et DMSO » un diamètre d'inhibition plus large est observé. Deux questions peuvent alors se poser : « Le mélange 'HE et DMSO' a-t-il une meilleure diffusion que les deux constituants pris séparément ? » et/ou « La zone d'inhibition de l'association 'HE et DMSO' plus importante reflète-t-elle une synergie entre le DMSO et l'HE ? »
- **pour *P. aeruginosa*** : dans les conditions « Eau et DMSO » et « HE et DMSO » les zones d'inhibitions sont équivalentes et plus importantes que pour l'« HE pure ». On peut alors se demander si : « L'activité de 'HE et DMSO' est seulement liée à l'activité seule du DMSO ? »
- **pour *E. faecalis* et *S. aureus*** : de très faibles zones d'inhibitions sont observées pour « Eau et DMSO » et « HE et DMSO », tandis que le diamètre d'inhibition pour l'« HE pure » est plus important. La question suivante peut alors se poser : « Le DMSO présenterait-il dans ce cas un antagonisme avec l'HE ? »

Il est intéressant de noter que l'on observe une activité antibactérienne de l'HE de *Citrus limonum* pure, uniquement sur les bactéries à Gram positif. Cette observation concorde avec plusieurs publications sur l'activité antibactérienne des HE (Inouye *et al.*, 2001). Cependant, nous pouvons également observer que ces résultats sont difficiles à interpréter.

Cas des aromatogrammes

Les aromatogrammes sont une technique dérivée de la méthode des disques, ils permettent de comparer les efficacités des HE entre elles. Les disques étant tous chargés de la même quantité d'HE, cette méthode permet de choisir pour une bactérie donnée, l'HE la plus efficace. Cependant, les recommandations et normes « officielles » ne se fondent pas sur des résultats relatifs, mais sur des valeurs chiffrées.

Une méthode alternative : la méthode en milieu liquide

La méthode en milieu liquide peut se décliner en 2 techniques distinctes : soit en tube, appelée « macrométhode en milieu liquide » ; soit en plaque à 96 puits (fond en « U »), appelée « microméthode en milieu liquide ». Dans ces deux cas de figure, une gamme de concentrations de la substance à tester est réalisée. Cette gamme de concentrations peut, là aussi, faire intervenir l'utilisation d'un dispersant afin d'obtenir un milieu plus homogène. En effet, en milieu aqueux, l'HE reste à la surface et ne se disperse pas naturellement (Fig. 4) ; dans ces conditions les bactéries se concentrent dans la phase aqueuse et ne rentrent pas en contact avec la substance à tester. De plus, si la quantité d'HE est assez suffisante pour former un film uniforme et étanche (à l'oxygène de l'air), les bactéries pourraient se retrouver en anaérobiose. Dans ces conditions le métabolisme bactérien serait modifié, ce qui entraînerait des erreurs d'interprétation pour l'évaluation des propriétés antibactériennes de ces HE.

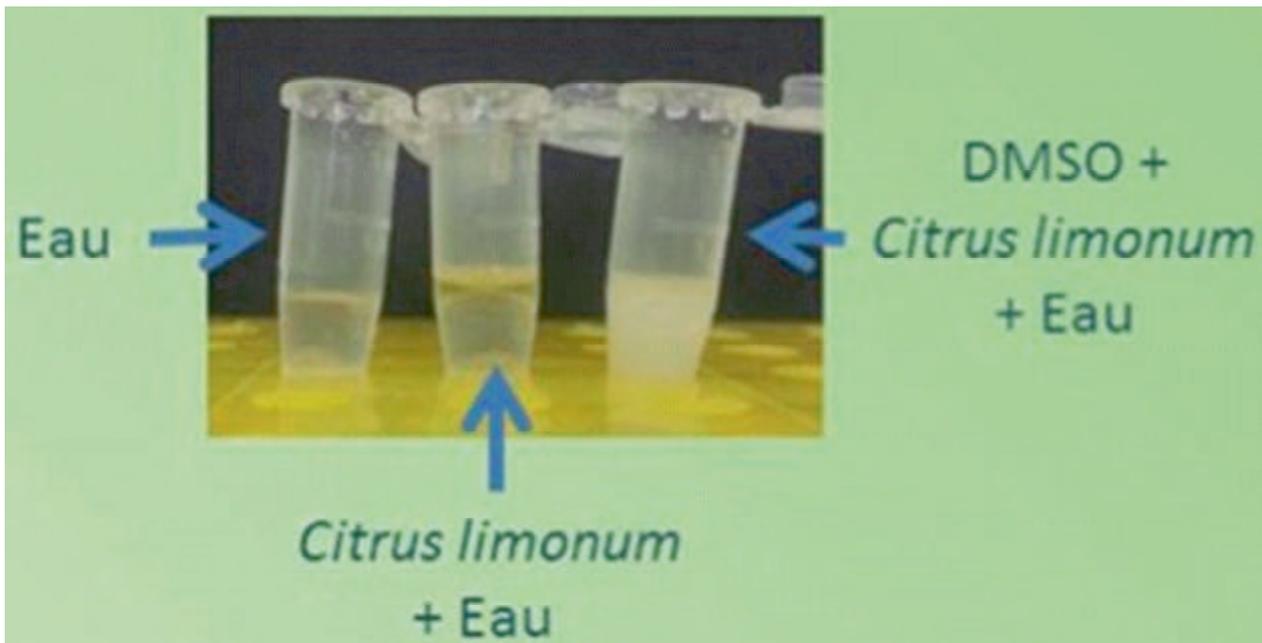


Figure 4
Intérêt du DMSO pour la réalisation d'une gamme de concentrations d'Huile Essentielle en milieu aqueux. Comparaison de l'homogénéité des solutions aqueuses d'HE de Citrus en absence et en présence de DMSO. En absence de DMSO, l'HE de Citrus ne se disperse pas naturellement dans la phase aqueuse.

Dans notre cas, au laboratoire, nous avons choisi de développer la microméthode en milieu liquide. En effet, la macrométhode provoque une surconsommation de réactifs et de la substance à tester (ici les HE). De plus, la microméthode est une technique automatisable, à la différence de la macrométhode.

Dans le cas de la technique dite en « microméthode », le plan des plaques est le suivant (**Figure 5**). La gamme de concentrations est réalisée par dilution sériée dans l'eau et/ou le dispersant. Après cette dilution, l'inoculum bactérien est ajouté dans les puits correspondants. Les microplaques ainsi préparées sont incubées 24h à 35°C. La croissance bactérienne, si elle a lieu, se traduit par l'apparition d'un trouble dans le puits. L'interprétation est la suivante : s'il y a un trouble, cela signifie que l'HE, aux concentrations testées, n'a pas d'activité antibactérienne ; à l'inverse, s'il y a absence de ce trouble, cela signifie que l'HE à la concentration correspondante possède une activité antibactérienne.

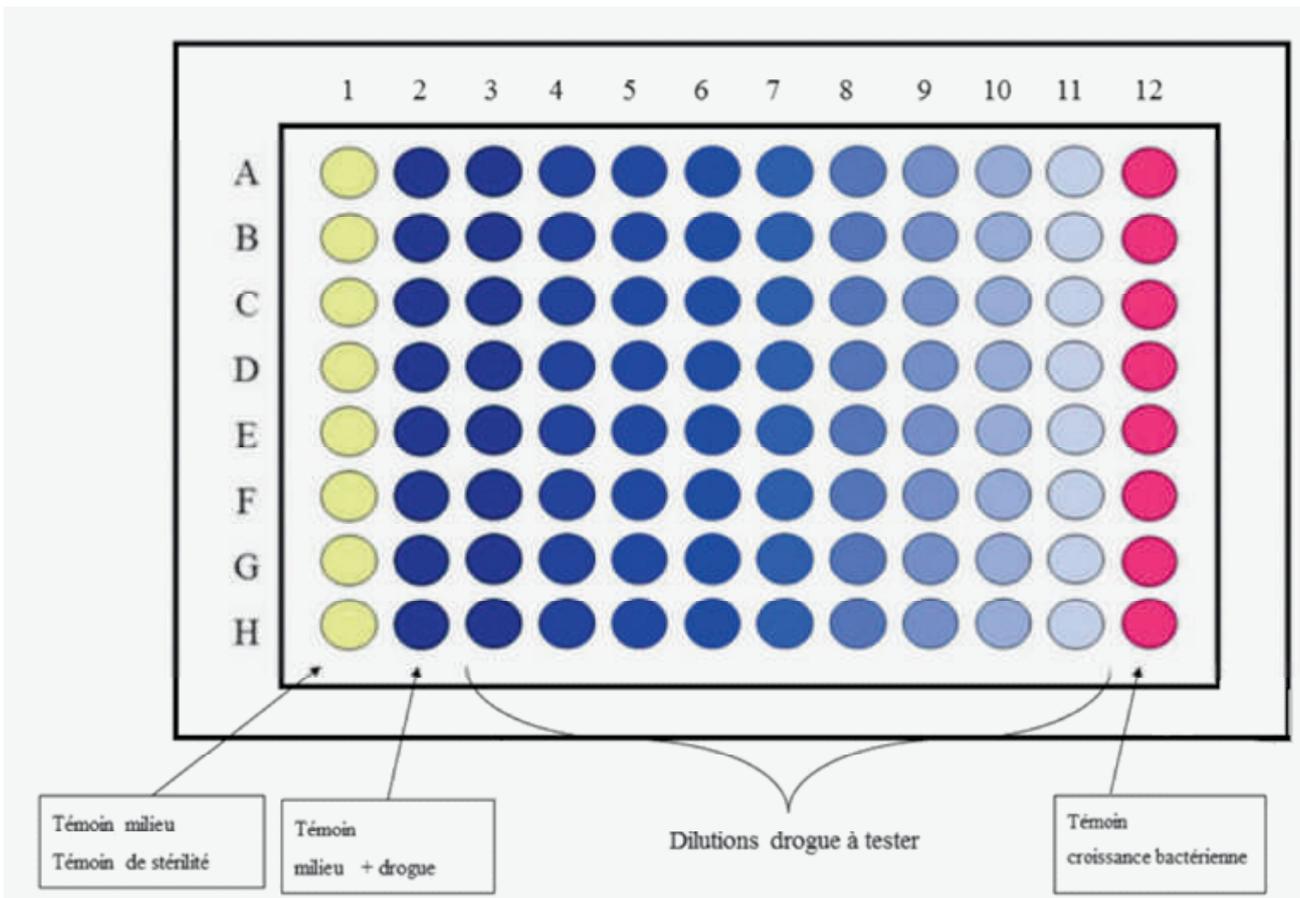


Figure 5

Plan d'une microplaque pour la réalisation de la microméthode en milieu liquide

La colonne 1 correspond à du milieu de culture seul. Ce témoin permet de confirmer la stérilité des opérations.

La colonne 2 contient du milieu MH et la substance à tester à sa plus forte concentration. Ce témoin permet de mettre en évidence une interaction éventuelle entre un ou des composants du MH et la substance testée. Si l'absorbance est modifiée dans ce témoin, il faudra en tenir compte dans la détermination de la CMI.

La colonne 12 contient seulement du MH et l'inoculum et permet de vérifier que l'absence de croissance dans les autres colonnes n'est pas due à de mauvaises conditions de culture mais bien à une action de la substance testée sur les bactéries.

Les colonnes 3 à 11 correspondent à des concentrations de la substance à tester de 512 à 2 µg/mL (où de 256 à 1 µg/mL) suite à la réalisation d'une gamme de dilution d'ordre 2 et ce pour un volume final de 50 µL.

Il est nécessaire de réaliser des « contrôles négatifs » afin de vérifier que l'expérience se déroule dans de bonnes conditions opératoires (en particulier la stérilité). Les témoins doivent donc être absents de toute contamination. Ces contrôles permettent également de vérifier les modifications d'absorbance dues aux caractéristiques physico-chimiques des constituants. En effet, l'HE provoque souvent une augmentation de l'absorbance, dont il faut tenir compte lors de l'évaluation des propriétés antibactériennes des HE. Ces contrôles négatifs sont de plusieurs types (ils sont représentés en jaune sur la **Figure 6**) :

- ▶ le contrôle « milieu + eau » (50/50) ou « milieu + eau + dispersant » (50/25/25) (dans le cas où un dispersant est utilisé) correspond à l'absorbance du milieu de culture ;
- ▶ le contrôle « milieu + eau + HE » (50/25/25) ou « milieu + dispersant + HE » (50/25/25) (dans le cas où un dispersant est utilisé) correspond à l'absorbance du mélange du milieu de culture et de l'HE.

En rose (Figure 5) est représenté le contrôle « milieu + bactéries », aussi appelé « témoin de croissance ». Il permet d'évaluer que la croissance bactérienne se déroule correctement. C'est un « étalon absolu » (en vert sur la Figure 6), car c'est par rapport à cette absorbance que l'activité antibactérienne de l'HE sera évaluée.

L'influence du DMSO sur la croissance bactérienne a également été évaluée. Dans notre expérience, l'échantillon est composé de : 25 µL de milieu (Mueller-Hinton bouillon dans notre cas), de 25 µL d'eau, de 25 µL de DMSO et de 25 µL du bouillon bactérien (en rouge sur la Figure 6). Le DMSO inhibe ainsi la croissance des 4 bactéries testées.

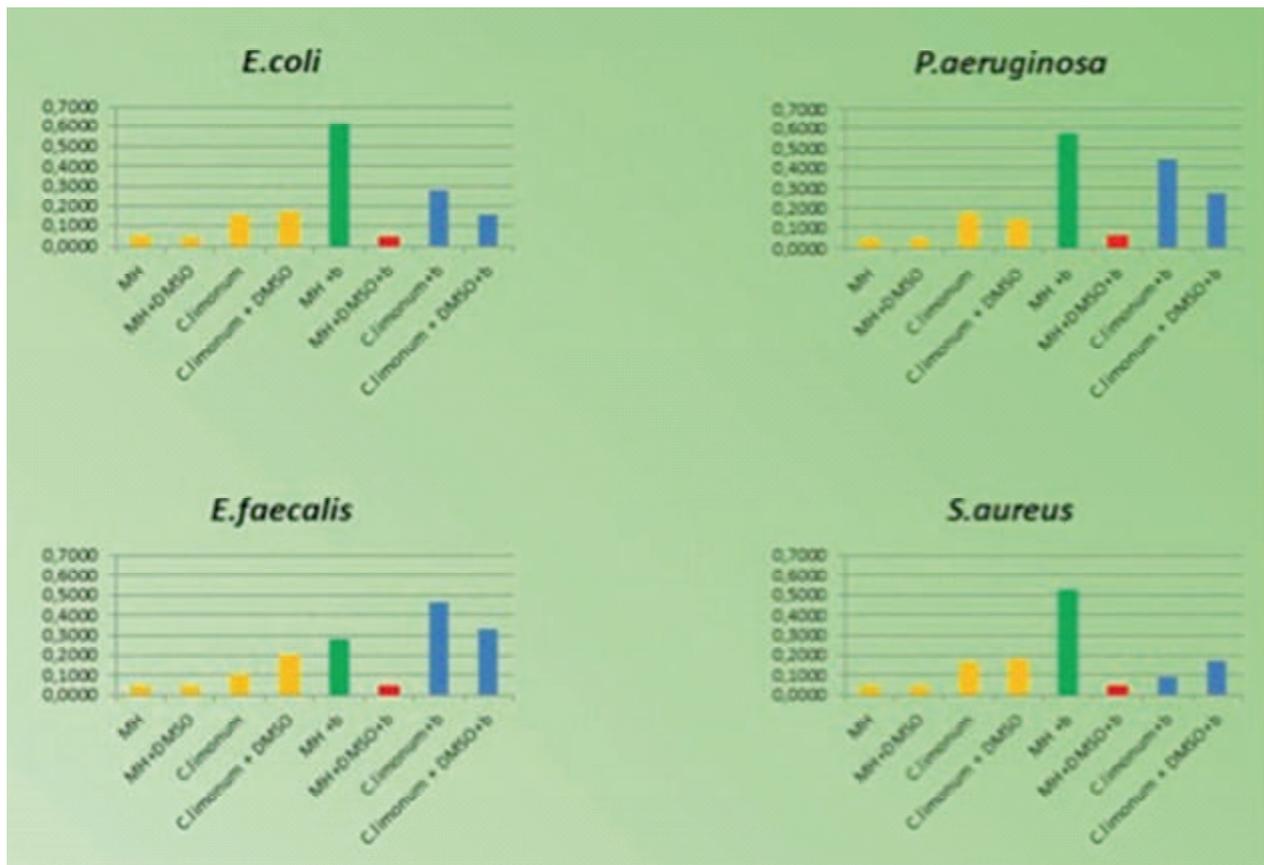


Figure 6

Evaluation de l'activité antibactérienne de l'Huile Essentielle de *Citrus limonum* par la microméthode en milieu liquide. Ces histogrammes représentent les valeurs d'absorbances (DO) obtenues après 24 heures d'incubations pour chacune des souches bactériennes suivantes : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *S. aureus*.

Pour chaque bactérie :

- En jaune sont représentés les « contrôles négatifs » : « MH », qui correspond à l'absorbance du milieu de culture seul ; « MH + DMSO », qui correspond à l'absorbance du mélange MH + dispersant ; « C. limonum », qui correspond à l'absorbance du mélange MH + Huile Essentielle ; « C. limonum + DMSO », qui correspond à l'absorbance du mélange MH + Huile Essentielle + dispersant.
- En vert le contrôle « MH + b », appelé « témoin de croissance »
- En rouge, le contrôle « MH + b + DMSO », appelé « témoin de croissance en présence du dispersant ».
- En bleu, les essais « C. limonum + b » et « C. limonum + DMSO + b ».

Dans une autre série d'expériences, nous avons utilisé le DMSO à une concentration maximale de 5 % dans chaque puits. Cette concentration de DMSO n'a pas d'influence sur la croissance bactérienne (résultats d'expériences précédentes et publications). Cependant, pour des petites quantités d'un mélange « HE + DMSO dans l'eau », il est nécessaire de réaliser une émulsion par aspiration-refoulement avec la micropipette le plus rapidement possible. En effet, au cours de nos expériences, nous avons observé la formation d'un « gel » au fond du puits empêchant de pratiquer une dilution en série exacte. De plus, certaines huiles essentielles telles que le Ravintsara (*Cinnamomum camphora*) semblent ne pas être miscibles au DMSO, lors la mise en suspension de ces deux substances.

Sur la Figure 6 sont représentées en bleu les conditions « HE + bactérie » et « HE+ DMSO + bactéries » ; ce sont les essais qui permettent de déterminer l'activité antibactérienne de l'HE de *Citrus limonum* plus ou moins en présence de DMSO.

La Figure 6 permet de conclure que l'HE de *Citrus limonum* possède une activité antibactérienne sur 3 des 4 bactéries testées (actif sur *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* mais pas *E. faecalis*). Cette HE démontre ainsi une activité antibactérienne car l'absorbance des échantillons testés est plus faible que l'absorbance du « témoin de croissance ». Cependant, pour *E. faecalis*, le « témoin de croissance » est visiblement diminué, les résultats sont par conséquent inexploitable. Cette bactérie a une croissance difficile, car c'est une bactérie anaérobie facultative.



Afin de palier à ces différents inconvénients, nous avons mis en place un protocole ne faisant pas intervenir de DMSO. Il est néanmoins nécessaire pour cet essai de ne pas dépasser la limite de concentration en HE de 12,5% V/V du volume final. Lorsque l'HE est mise au fond du puits, et que l'on ajoute l'eau, il est nécessaire de mettre en suspension l'HE par aspiration-refoulement avec la micropipette le plus rapidement possible, afin de créer une émulsion. Une fois cette émulsion créée, la dilution en série pourra être effectuée. Il ne restera ensuite qu'à rajouter le milieu de culture bactérien (i.e. bouillon) et incubé à 35°C durant 18 à 24 h.

Cette technique présente néanmoins quelques inconvénients, elle n'est valable que pour des concentrations en HE inférieures à 12,5% V/V dans l'eau. De plus, l'émulsion créée par aspiration-refoulement n'est pas stable dans le temps, et quelques gouttelettes d'HE sont visibles à la surface quelques minutes après la fin de la manipulation. On peut donc en conclure que les bactéries ne seront totalement en contact avec l'HE. Cependant, Remmal et coll ont démontré que l'activité de l'HE en présence de dispersant était plus faible que l'activité de l'HE seule (Remmal *et al.*, 1993).

Conclusion

Les techniques développées ici peuvent toutes, du moins théoriquement, permettre l'évaluation *in vitro* des propriétés antibactériennes d'une HE. Il existe de nombreux consensus entre ces techniques : milieu de culture, température et temps d'incubation... Cependant, des différences majeures existent dans leur réalisation : support (boîte de Pétri, tube, microplaque), coût en consommable et réactifs... Chaque technique possède donc des avantages, des inconvénients, mais aussi des limites. La principale limite peut se résumer à un seul point : nous ne disposons actuellement d'aucun référentiel, et de ce fait nous ne pouvons ni valider, ni interpréter et encore moins exploiter un résultat. En effet, même si nous sommes en mesure d'obtenir des valeurs chiffrées, permettant de refléter une efficacité antibactérienne, ces dernières sont pour le moment uniquement des valeurs relatives. Comme aucun référentiel, aucune méthode de référence n'existe, toute interprétation demeure à ce jour, hasardeuse. Il est donc nécessaire de poursuivre les efforts initiés pour définir un cadre expérimental, reconnu et utilisé par tous, afin de permettre une évaluation correcte, comparable et répétable de l'évaluation des propriétés antibactériennes des HE. Un consensus pourrait ainsi permettre de proposer un contexte normatif qui manque cruellement à l'heure actuelle.

Remerciements

Ce travail a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Les auteurs remercient l'« Association Lorraine pour la Recherche et le Développement de Composés Bioactifs », pour son soutien financier.

Références

- Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012;17:4, 3989-4006.
- Boucher HW, Talbot GH, Benjamin DK Jr, Bradley J, Guidos RJ, Jones RN, Murray BE, Bonomo RA, Gilbert D. and the Infectious Diseases Society of America 10 x '20 Progress-development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013;56:12:1685-94.
- CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 2012 9th ed. M07-A9. Wayne, Pa, USA.
- Inouye S, Yamaguchi H, Tazikawa T. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method, *J. Infect. Chemother* 2001;7:251-54.
- Janssen AM Scheffer JJC, Baerheim Svendsen A. Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Literature Review. Aspects of the Test Methods. *Planta Medica* 1986;395-98.
- Jehl F. (ed) Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie – Recommandations 2014, Paris, Société Française de Microbiologie, 2014;114 p.
- Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Odenholt I, Rodloff A, Soussy CJ, Steinbakk M, Soriano F, Stetsiouk O. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* 2006;2[6]:501-3.
- Remmal A, Bouchikhi T, Rheyour K, Ettayebi M, Tautouai-Elaraki A. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J Essent Oil Res* 1993;5:179-84.
http://www.atcc.org/en/About/About_ATCC/Who_We_Are.aspx.
<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/recherche/les-collections/crbip/informations-generales-sur-les-collections/iv-collections-ouvertes/la-collection-de-l-institut-pasteur-cip>.

Cet article est paru dans Ethnopharmacologia - numéro 52 de décembre 2014.