



1 décembre 2006
**Réunion pédagogique
du GN-MEBA**



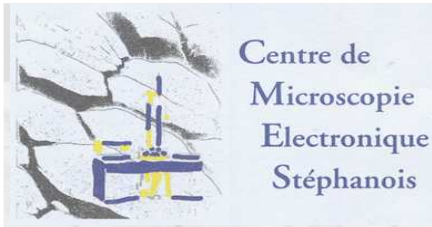
**EFFETS ANTIBACTERIENS
DES HUILES ESSENTIELLES (HE)
EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE
A BALAYAGE**

L. Mayaud¹, I. Anselme-Bertrand², A. Carricajo¹, A. Zhiri³, G. Aubert¹

¹Laboratoire de Bactériologie, CHU Bellevue Hospital, 42055, Saint-Etienne, France

²CMES, Faculté de Médecine, 42055, Saint Etienne, France

³Pranarom International S.A., B-7822 Ghislenghien, Belgique

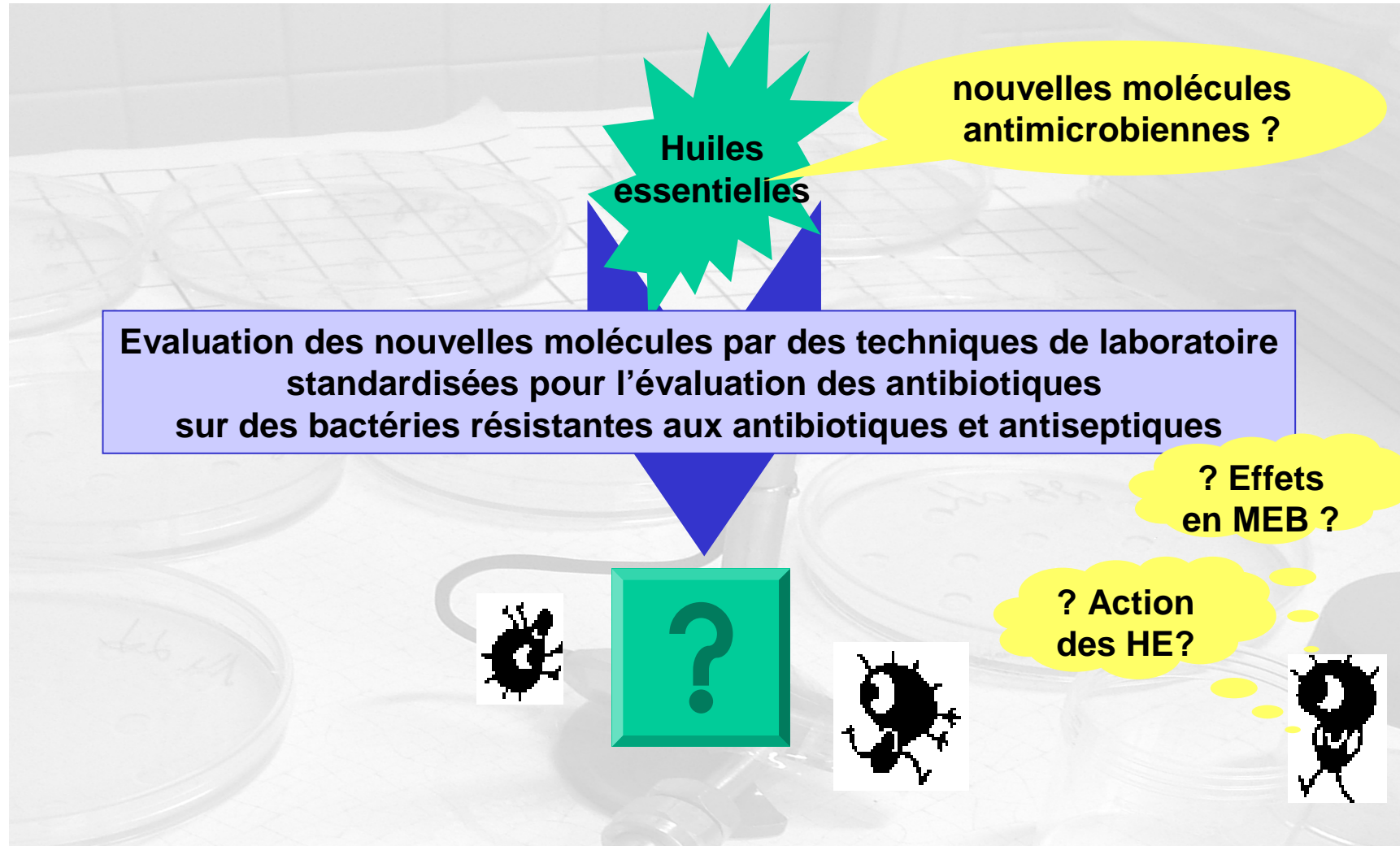


Plan



- 1- Introduction
- 2- Rappel sur les HE
- 3- Activité antimicrobienne des HE
- 4- Microscopie électronique à balayage
- 5- Conclusion

1- Introduction (1/2)



1- Introduction (2/2)

Activité bactériostatique ?
Inhibition de la croissance bactérienne
CMI = concentration minimale inhibitrice

13 huiles essentielles

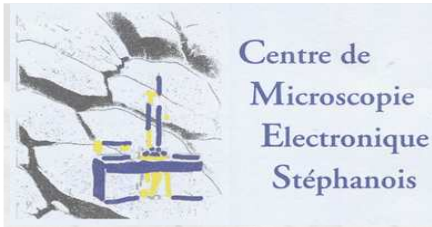
Activité bactéricide ?
Destruction bactérienne
CMB = concentration minimale bactéricide

Pouvoir antiseptique ?

**5 huiles essentielles
bactériostatiques**
avec des CMI basses

Observation en MEB ?
Avant et après traitement par l'HE
à une concentration bactéricide

**1 huile essentielle
bactéricide**



1- Introduction

2- Rappel sur les HE

3- Activité antimicrobienne des HE

4- Microscopie électronique à balayage

5- Conclusion

2- Rappel sur les HE (1/4)

DEFINITION

*Surface d'une feuille de menthe observée en MEB
Mode pression contrôlée, sans fixation
Photographie prise par I. Anselme Bertrand*

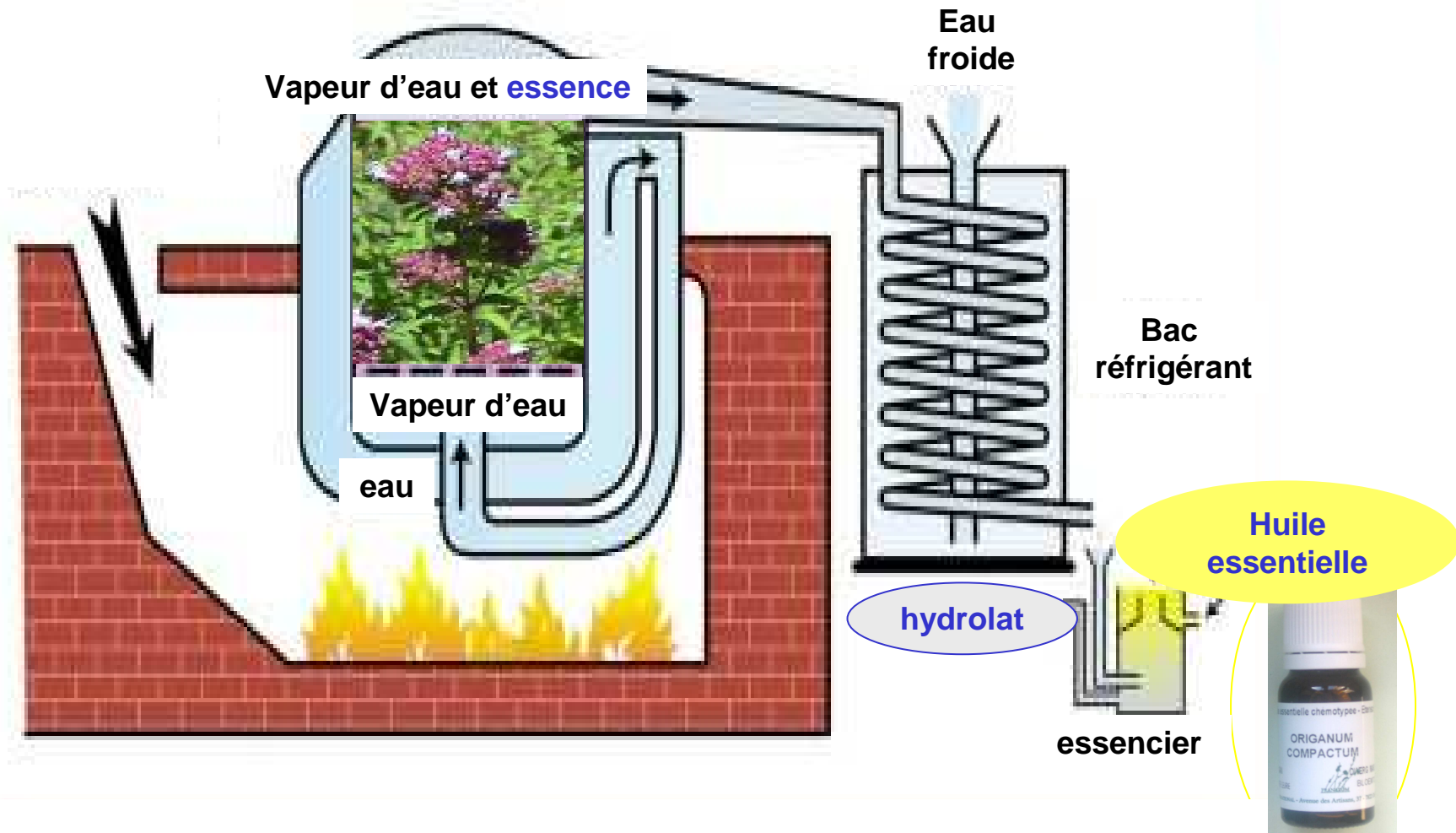
Produits odorants, non solubles dans l'eau, constitués par un mélange de 10 à 300 molécules chimiques aromatiques et volatiles...

...obtenus (AFNOR):

- « par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau de végétaux ou parties de végétaux,
- par expression mécanique du péricarpe frais de certains citrus »

2- Rappel sur les HE (2/4)

DISTILLATION à la vapeur d'eau





2- Rappel sur les HE (3/4)



QUALITE (1/2)

- **100% pure** : totale et naturelle
- définie par son espèce botanique, son organe distillé, sa provenance géographique

EXEMPLE : HE d'ORIGAN

FICHE D'ANALYSE – ANALYSIS SHEET

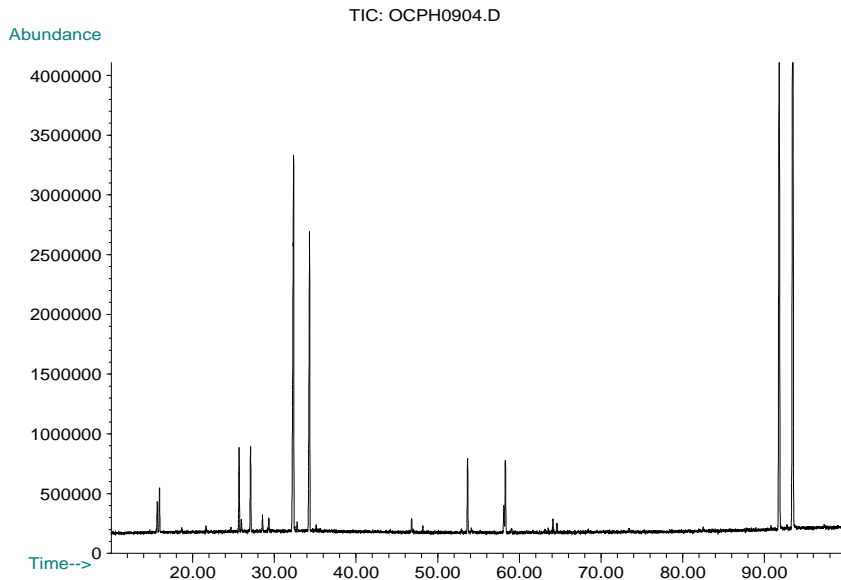
Nom botanique – <i>botanical name</i> :	<i>Origanum compactum</i>
Nom commun – <i>french name</i> :	ORIGAN COMPACT
Numéro du lot – <i>lot number</i> :	OCSFPH0305
Origine - <i>origin</i> :	PRANAROM - MAROC
Partie de la plante- <i>part of the plant</i> :	SOMMITÉ FLEURIE
Date de distillation – <i>distillation date</i> :	06/2004
Date de peremption – <i>out of date</i> :	03/2010

2- Rappel sur les HE (4/4)

QUALITE (2/2)

- définie par sa spécificité biochimique appelée **chénotype** et contrôlée par **CPG-SM**

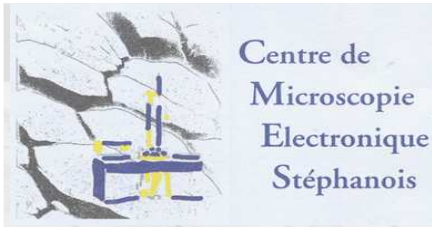
Profil CHROMATOGRAPHIQUE



- contrôlée par des analyses physicochimiques



Aspect - <i>physical state</i>	Liquide limpide
Couleur - <i>colour</i>	Jaune doré
Odeur - <i>odour</i>	Phénolique, épicée
Densité à 20°C - <i>density</i>	0,921
Densité à 15°C - <i>density</i>	0,925
Indice de réfraction à 20°C - <i>refractive index</i>	1,501 0
Pouvoir rotatoire à 20°C - <i>optical rotation</i>	+ 0,5 °
Miscibilité à l'éthanol à 80% - <i>miscibility</i>	1,6 vol. d'alcool / 1 vol. d'H.E
Point d'éclair: - <i>flashpoint</i>	56 °C



1- Introduction

2- Rappel sur les HE

3- **Activité antimicrobienne des HE**

3-1 Matériel

3-2 Activité bactériostatique

3-3 Activité bactéricide

4- Microscopie électronique à balayage



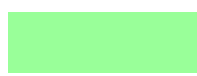


5- Conclusion

3- Activité antimicrobienne

3.1- matériel (1/3)

HE	Composants majoritaires
LEMON GRASS	géralial (40 %) néral (29 %)
CANNELLE ECORCE	aldéhyde cinnamique (69 %) eugénol (7 %)
ORIGAN	carvacrol (30 %) thymol (22 %) γ -terpinène (18 %) p-cymène (12 %)
AJOWAN	γ -terpinène (40 %) thymol (34 %) p-cymène (15 %)
GIROFLE	eugénol (76 %) acétate d'eugényle (12 %) β -caryophyllène (9 %)
CANNELLE FEUILLE	eugénol (65 %)
THYM	bornéol (27 %) thymol (13 %) β -caryophyllène (11 %)

HE	Composants majoritaires
TEA TREE	terpinène-4-ol (36 %) γ -terpinène (17 %) α -terpinène (9 %)
PALMAROSA	géraniol (78 %) acétate de géranyle (12 %)
LAVANDE	acétate de linalyle (38 %) linalol (27 %)
EUCALYPTUS	1,8-cinéole (80 %) limonène (7 %)
CAJEPUT	1,8-cinéole (67 %) limonène (9 %)
ORANGE	limonène (9 %)

	HE à aldéhydes
	HE phénolées
	HE à monoterpénols
	HE à oxyde
	HE à hydrocarbures

3- Activité antimicrobienne

3.1- matériel (2/3)

Pas d'interférence sur
l'effet antimicrobien
des HE

Solution d'AGAR 0,15 % v/v

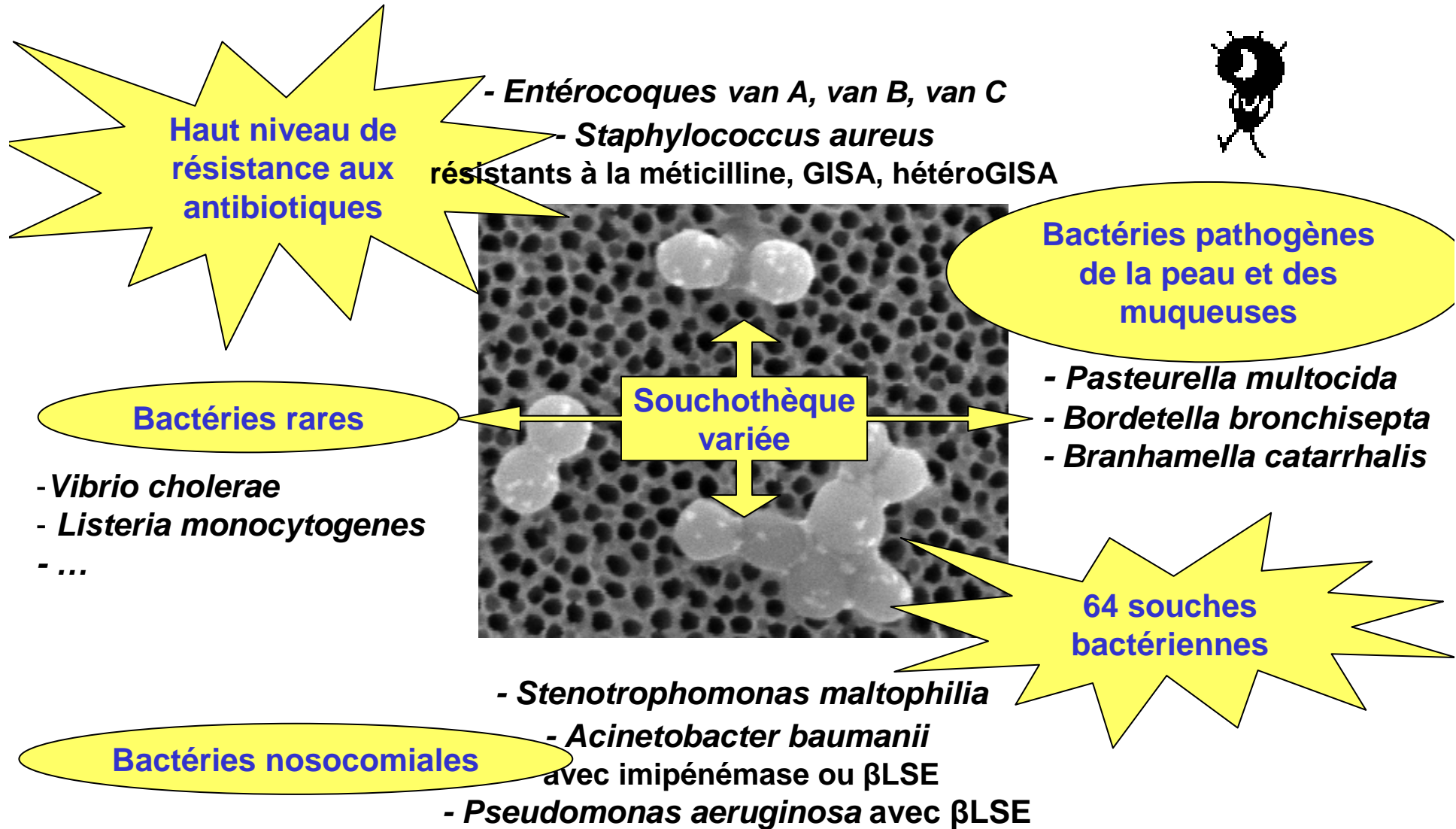
Inerte sur les
microorganismes



HE = Produits non solubles dans l'eau

3- Activité antimicrobienne

3.1- matériel (3/3)





1- Introduction

2- Rappel sur les HE

3- **Activité antimicrobienne des HE**

3-1 Matériel

3-2 **Activité bactériostatique**

3-3 **Activité bactéricide**

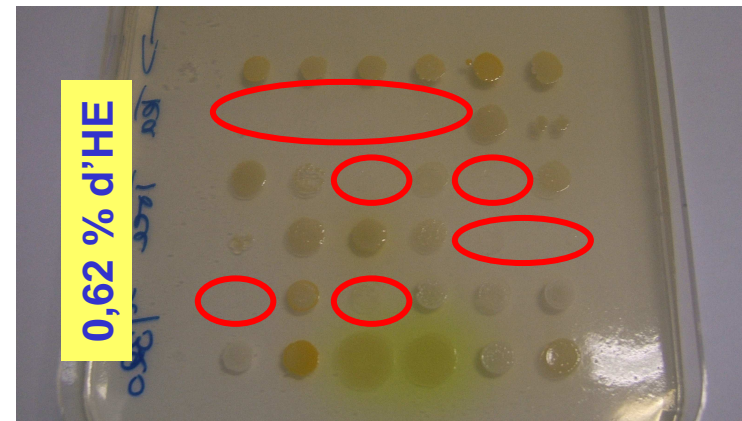
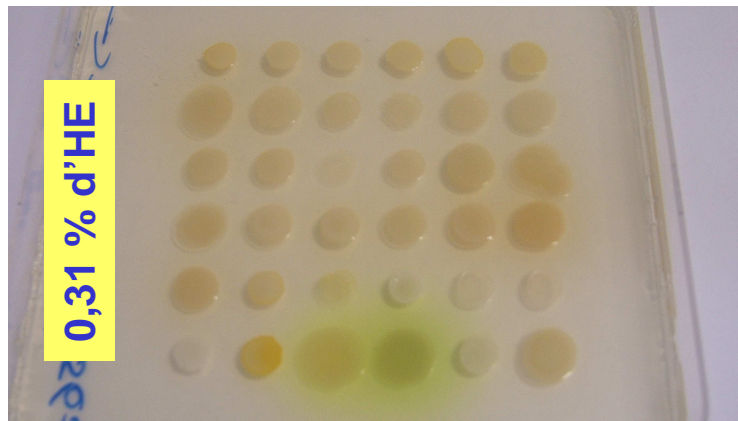
4- Microscopie électronique à balayage

5- Conclusion

3- Activité antimicrobienne 3.2- bactériostatique (1/2)

TECHNIQUE DE DILUTION EN GELOSE TECHNIQUE STANDARDISEE POUR L'EVALUATION DES ANTIBIOTIQUES

- dilution de l'HE de 2 en 2 dans une solution d'agar 0,15 %
- préparation de 11 géloses contenant différentes concentrations d'HE (0,01 % à 10 % v/v) et d'une gélose témoin sans HE
- inoculation de l'inoculum bactérien en spot de 10^5 UFC



CMI = 0,62 %

Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

=

**concentration minimale d'HE entraînant une inhibition de croissance bactérienne
après 48 heures d'incubation à 37°C**

3- Activité antimicrobienne

3.2- bactériostatique (2/2)

CMI (% v/v) des 13 HE sur les 64 bactéries Gram +, Gram – et *P. aeruginosa*

HE les + actives	Cannelle écorce	Origan	Ajowan	Thym	Girofle	Cannelle feuille	Lemon grass	Tea tree
n (Gram+ et Gram-)	62	62	62	61	62	62	57	62
CMI _{90%}	0,16	0,31	0,46	0,62	0,62	1,25	1,25	1,88
n (<i>P. aeruginosa</i>)	2	2	2	2	2	2	2	2
Ecart de CMI	0,16-0,31	1,88-2,5	7,5-10	>10	10->10	10->10	10->10	10->10

CMI < 2 % v/v

HE les - actives	Palmarosa	Eucalyptus	Cajeput	Lavande	Orange
n (Gram+ et Gram-)	62	60	59	62	59
CMI _{90%}	10	7,5	10	>10	>10
n (<i>P. aeruginosa</i>)	2	2	2	2	2
Ecart des CMI	>10	>10	10->10	>10	>10

CMI > 2 % v/v



1- Introduction

2- Rappel sur les HE

3- **Activité antimicrobienne des HE**

3-1 Matériel

3-2 Activité bactériostatique

3-3 **Activité bactéricide**

4- Microscopie électronique à balayage

5- Conclusion

3- Activité antimicrobienne

3.3- bactéricide (1/7)

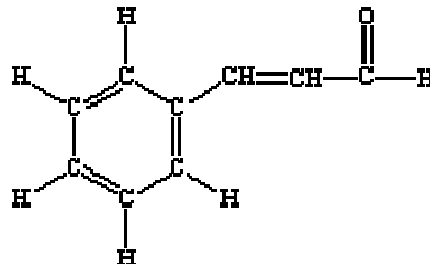
4 souches bactériennes

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Streptococcus pyogenes*, souche clinique



5 huiles essentielles

- ayant une bonne activité bactériostatique ($CMI_{90\%} < 2 \%$)
- ayant des chémotypes différents



3- Activité antimicrobienne

3.3- bactéricide (2/7)

5 huiles essentielles (suite)

HE	Composés majoritaires	CMI (% v/v)	
		CMI _{90%} (Gram+ et -)	CMI (<i>P.aeruginosa</i>)
CANNELLE ECORCE	aldéhyde cinnamique (69 %) eugénol (7 %)	0,16	0,31
ORIGAN	carvacrol (30 %) thymol (22 %) γ -terpinène (18 %) p-cymène (12 %)	0,31	2,5
THYM	bornéol (27 %) thymol (14 %) β -caryophyllène (11 %)	0,62	>10
CANNELLE FEUILLE	eugénol (65 %)	1,25	>10
TEA TREE	terpinène-4-ol (36 %) γ -terpinène (17 %) α -terpinène (9 %)	1,88	>10

3- Activité antimicrobienne

3.3- bactéricide (3/7)

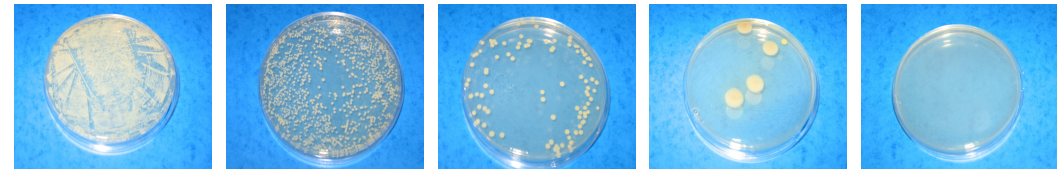
Cinétique de bactéricidie (*Time Killing Curve*)

1 mL d'une dilution d'HE dans une solution d'agar 0,15%
+
9 mL milieu de croissance contenant un inoculum de 10^7 UFC/mL

Bouillon témoin	Bouillon [HE] ₁	Bouillon [HE] ₂	Bouillon [HE] ₃	Bouillon [HE] ₄

↓ 37°C sous agitation

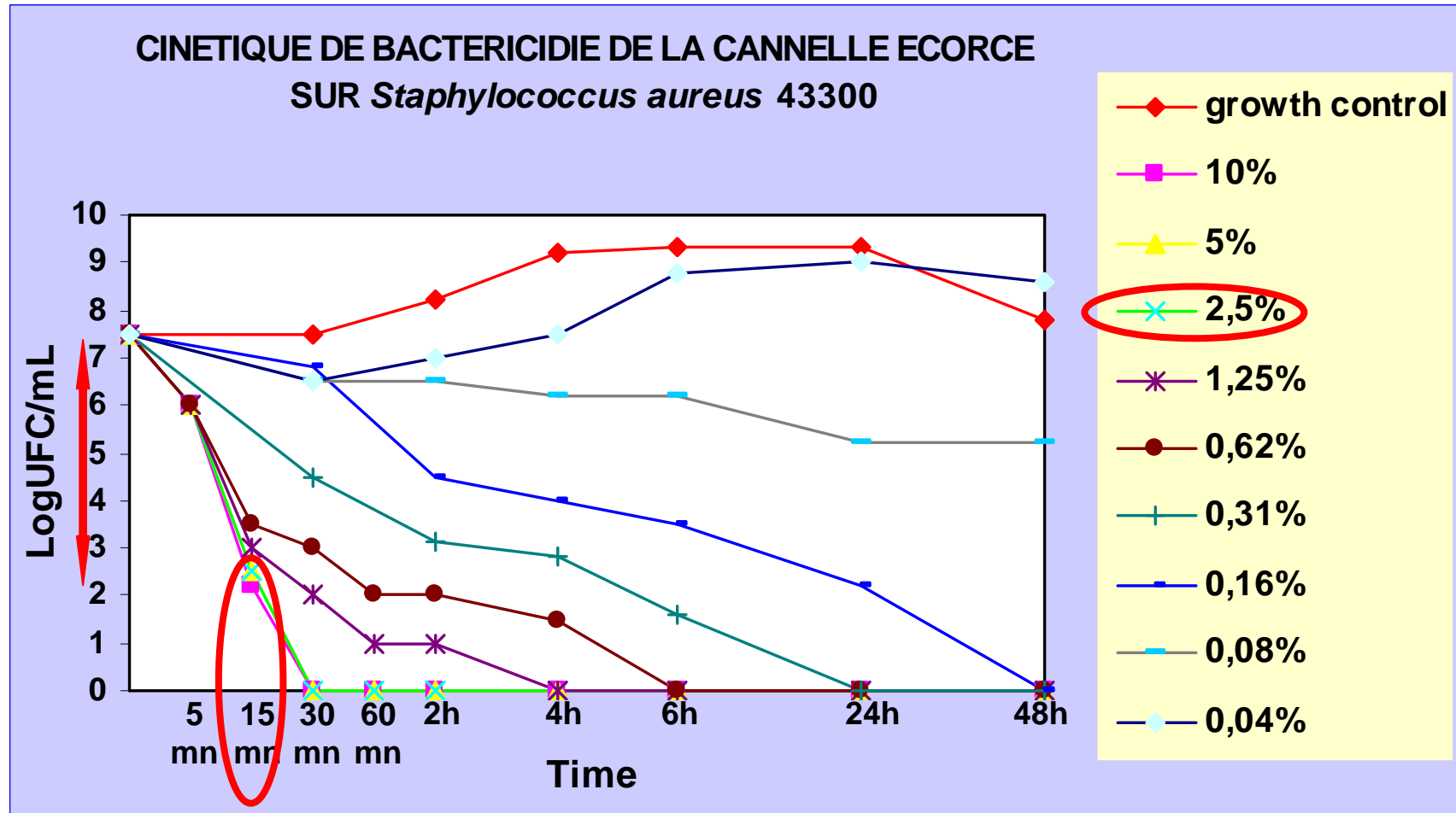
Dénombrement des bactéries survivantes à des temps fixes (5mn, 15mn, 30mn, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h, 48h)



bactéricidie
=
chute de 5 log de l'inoculum initial
(réduction de 99,999%) en moins d'une heure

3- Activité antimicrobienne

3.3- bactéricide (4/7)



Bactéricidie = diminution de 5 log

3- Activité antimicrobienne

3.3- bactéricide (5/7)

Concentrations bactéricides (% v/v) des HE sur les Gram+
S. aureus et *S. pyogenes*

	CANNELLE ECORCE	ORIGAN	THYM	CANNELLE FEUILLE	TEA TREE
<i>S.aureus</i>					
CMI (% v/v)	0,12	0,23	0,31	0,46	0,94
05 mn	>10	0,62	>10	1,25	>10
15 mn	2,5	0,62	2,5	1,25	>10
30 mn	1,25	0,62	0,62	1,25	>10
60 mn	0,62	0,62	0,62	1,25	10
24 h	0,16	0,62	0,62	1,25	2,5
<i>S.pyogenes</i>					
CMI (% v/v)	0,04	0,16			
05 mn	>10	1,25		bactéricidie / temps / dépendante	
15 mn	>10	1,25			
30 mn	>10	0,62	/		
60 mn	2,5	0,62			
24 h	0,31	0,62			
/ non déterminé					

CMB (concentration minimale bactéricide dans le temps le plus bref en moins d' une heure)

3- Activité antimicrobienne

3.3- bactéricide (6/7)

Concentrations bactéricides (% v/v) des HE sur les Gram-
E. coli et *P. aeruginosa*

	CANNELLE ECORCE	ORIGAN	THYM	CANNELLE FEUILLE	TEA TREE
<i>E.coli</i>					
CMI (% v/v)	0,08	0,23	0,31	0,46	0,62
05 mn	0,62	0,31	0,31	1,25	1,25
15 mn	0,62	0,31	0,31	1,25	1,25
30 mn	0,31	0,31	0,31	1,25	1,25
60 mn	0,31	0,31	0,31	1,25	1,25
24 h	0,08	0,31	0,31	1,25	1,25
<i>P.aeruginosa</i>					
CMI (% v/v)	0,16	2,5	>10	>10	>10
05 mn	0,62	1,25	>10	/	>10
15 mn	0,62	1,25	>10	/	>10
30 mn	0,62	1,25	>10	5	>10
60 mn	0,62	1,25	>10	5	>10
24 h	0,31	*	>10	*	*

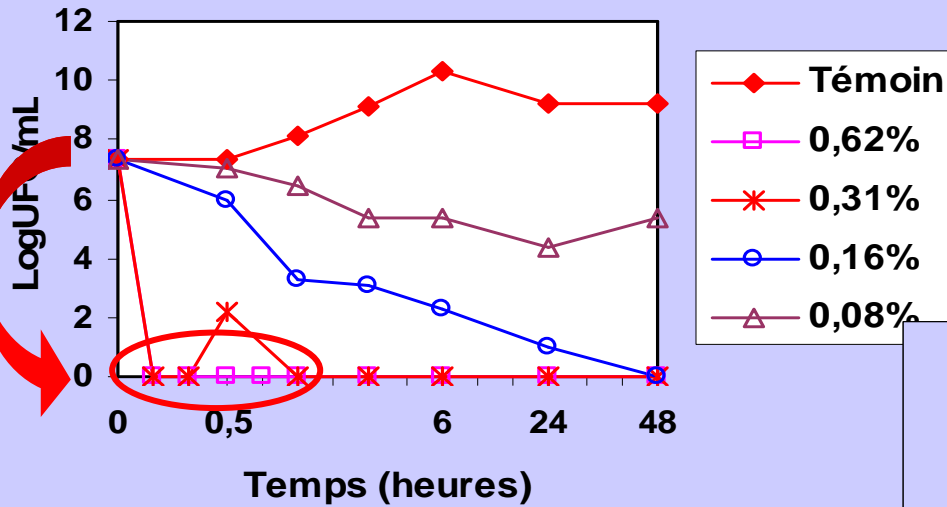
* manque de reproductibilité
/ non déterminé

CMB (concentration minimale bactéricide dans le temps le plus bref)

3- Activité antimicrobienne

3.3- bactéricide (7/7)

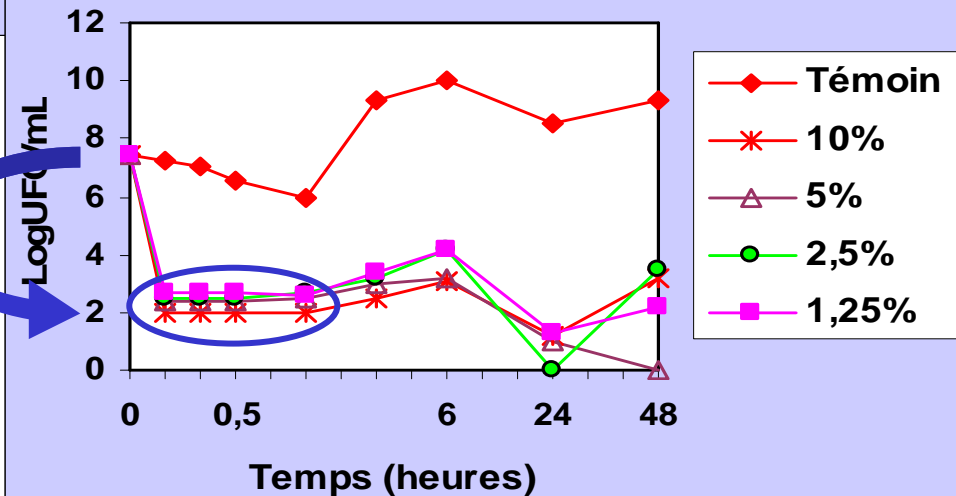
bactéricide de la Cannelle écorce sur
Pseudomonas aeruginosa 9027



Bactéricide
jamais totale
quelle que soit
la concentration $\geq 1,25\%$

bactéricide totale

bactéricide de l'Origan sur
Pseudomonas aeruginosa 9027





1- Introduction

2- Rappel sur les HE

3- Activité antimicrobienne des HE

3-1 Matériel

3-2 Activité bactériostatique

3-3 Activité bactéricide

4- Microscopie électronique à balayage

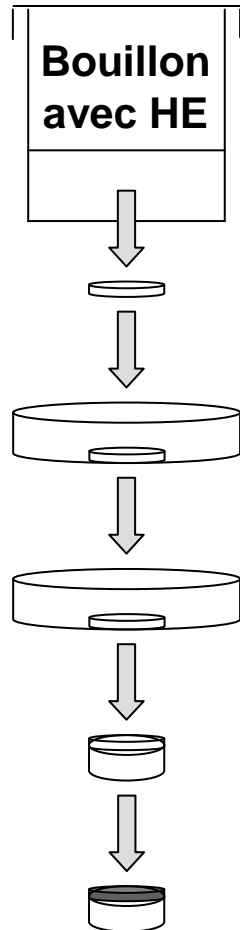
4-1 préparation technique

4-2 photographies

5- Conclusion

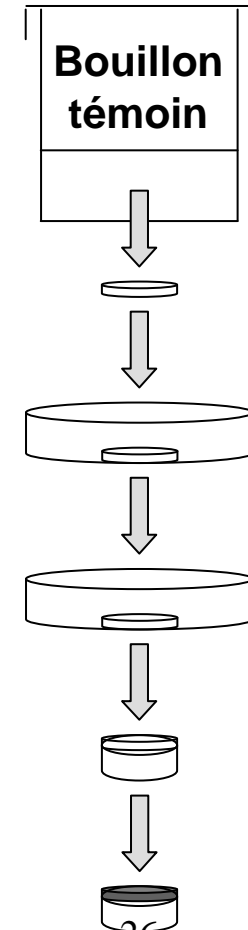
4- MEB

4.1- préparation technique (1/2)



1 mL d'une dilution d'HE dans
une solution d'agar 0,15%
+
9 mL milieu de croissance
contenant un inoculum de
 10^7 UFC/mL

1 mL d'une solution d'agar
0,15%
+
9 mL milieu de croissance
contenant un inoculum de
 10^7 UFC/mL



1 goutte de bouillon sur un filtre de porosité 0,2 μ m

Fixation 30 minutes dans un bain de glutaraldéhyde 2 %
puis 3 lavages de 10 min au PBS

Post-fixation 30 minutes dans un bain de tétr oxyde d'osmium 1 %
puis 3 lavages de 10 min au PBS

Séchage et fixation sur un support

Métallisation à l'or-palladium (Polaron, SC 7620)
Observation au MEB HITACHI S3000N + détecteur SE

4- MEB

4.1- préparation technique (2/2)

MICROSCOPE ELECTRONIQUE à BALAYAGE et à PRESSION CONTROLEE

(HITACHI S 3000N)

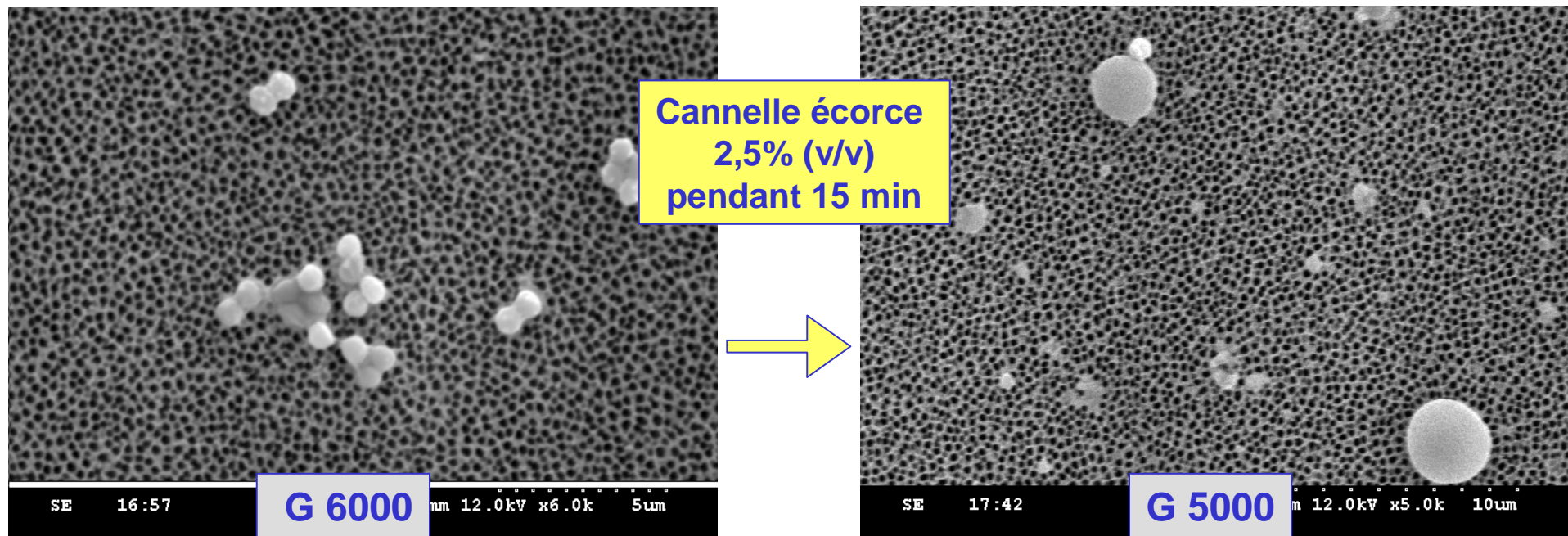
Équipé d'une platine à
effet Peltier et d'un
détecteur EDS pour
microanalyse X (QUEST
2L THERMO- NORAN)

Résolution: de 3 à 5 nm



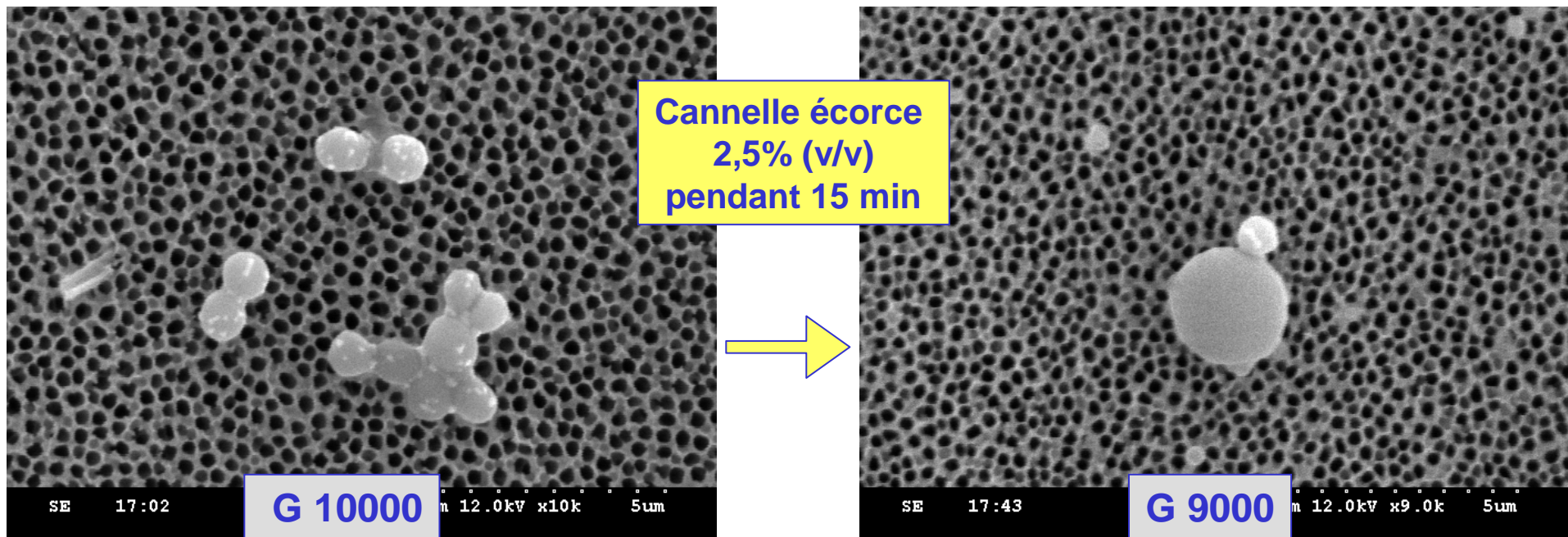
4- MEB

4.2- photographies *S. aureus* (1/3)



4- MEB

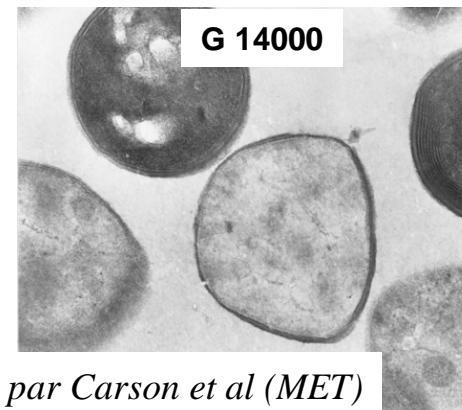
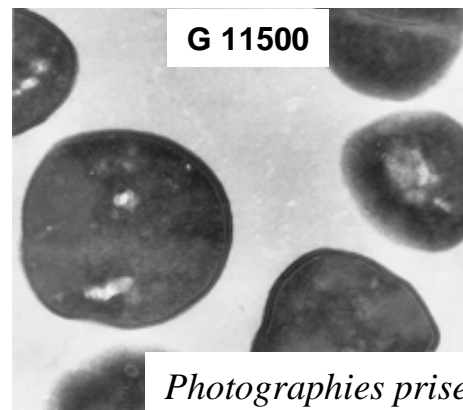
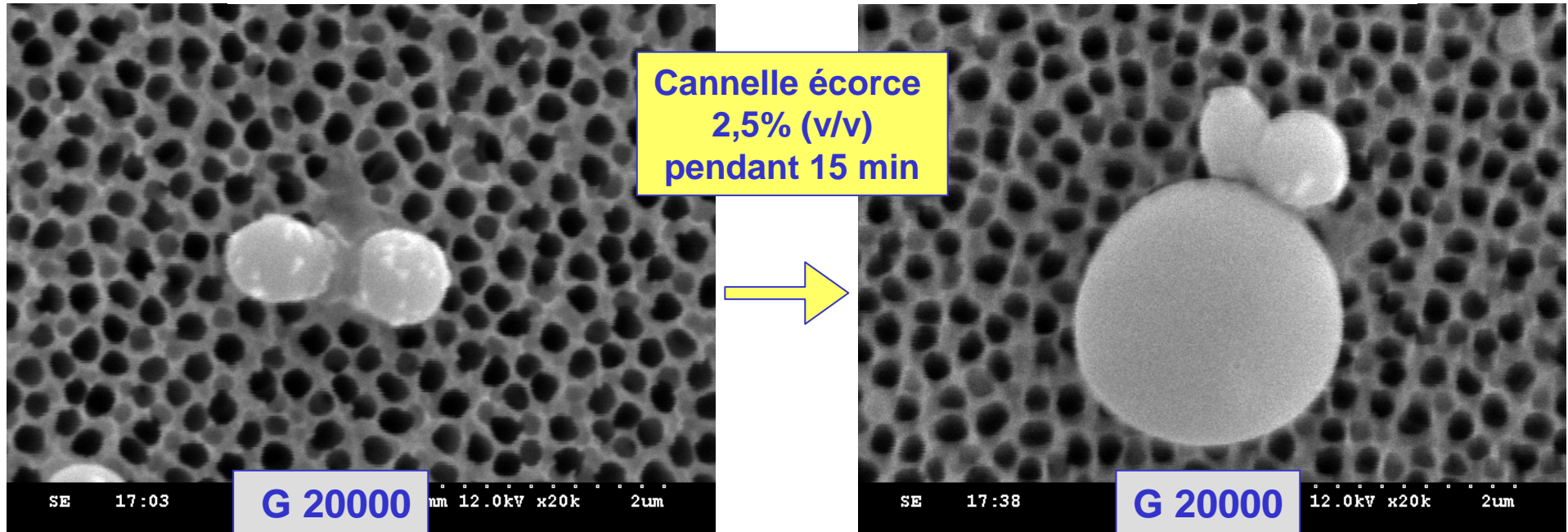
4.2- photographies *S. aureus* (2/3)



4- MEB

4.2- photographies *S. aureus* (3/3)

Photographies prises par I. Anselme-Bertrand, CMES – Faculté de Médecine de Saint Etienne

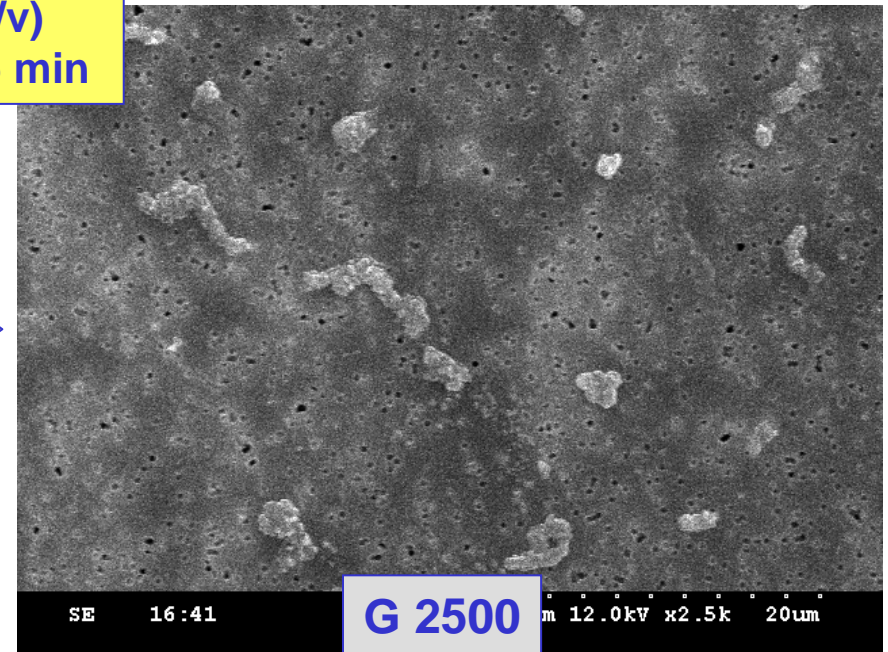
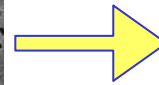
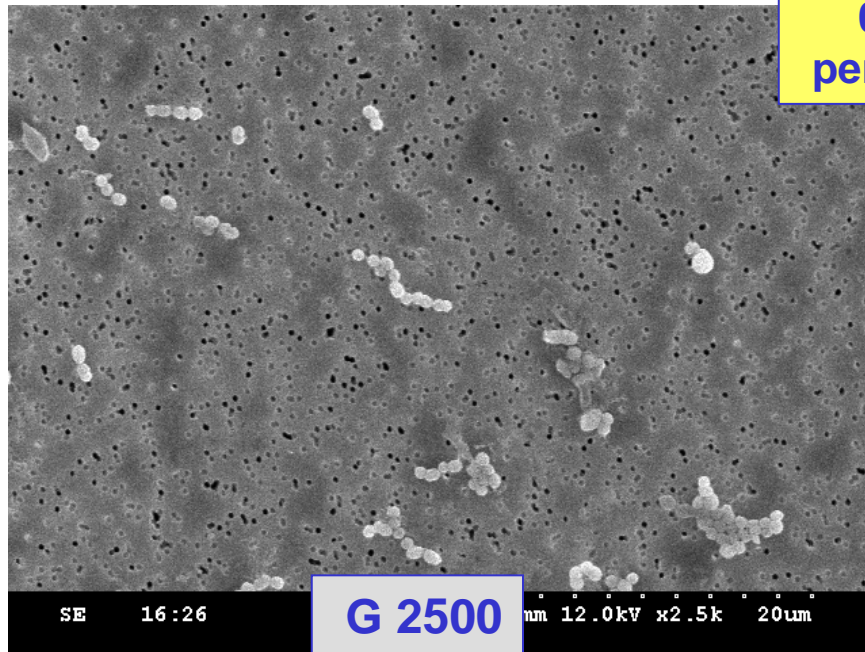


Photographies prises par Carson et al (MET)

4- MEB

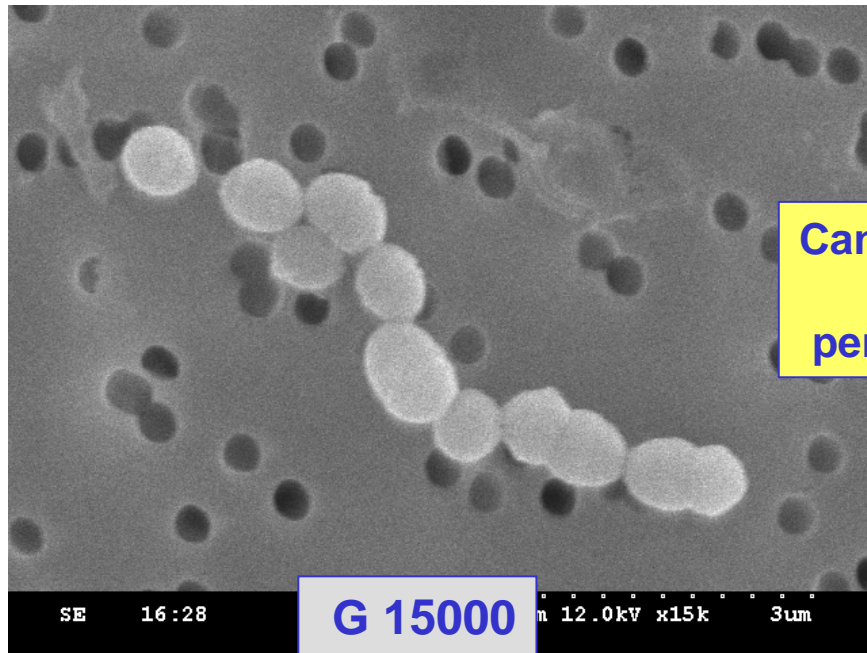
4.2- photographies *S. pyogenes* (1/3)

Cannelle écorce
0,62% (v/v)
pendant 15 min

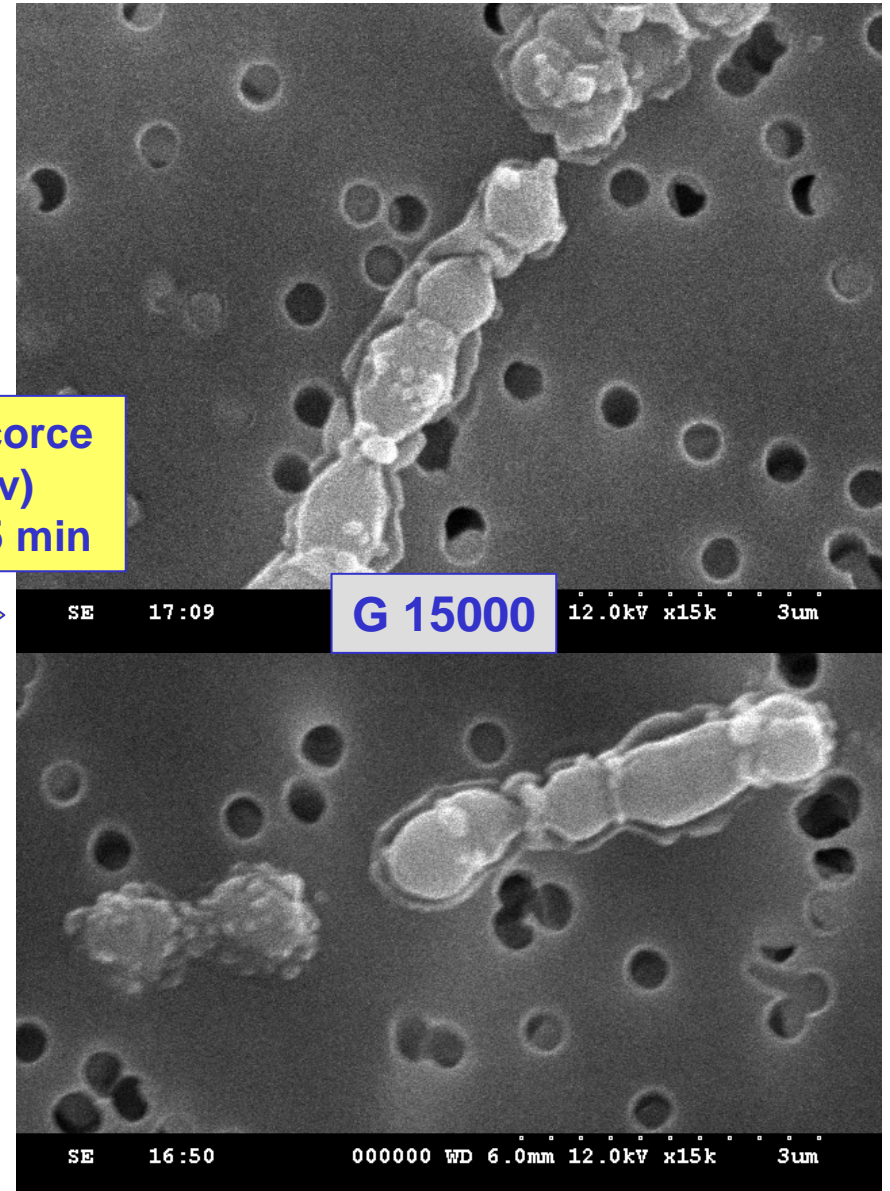
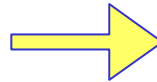


4- MEB

4.2- photographies *S. pyogenes* (2/3)



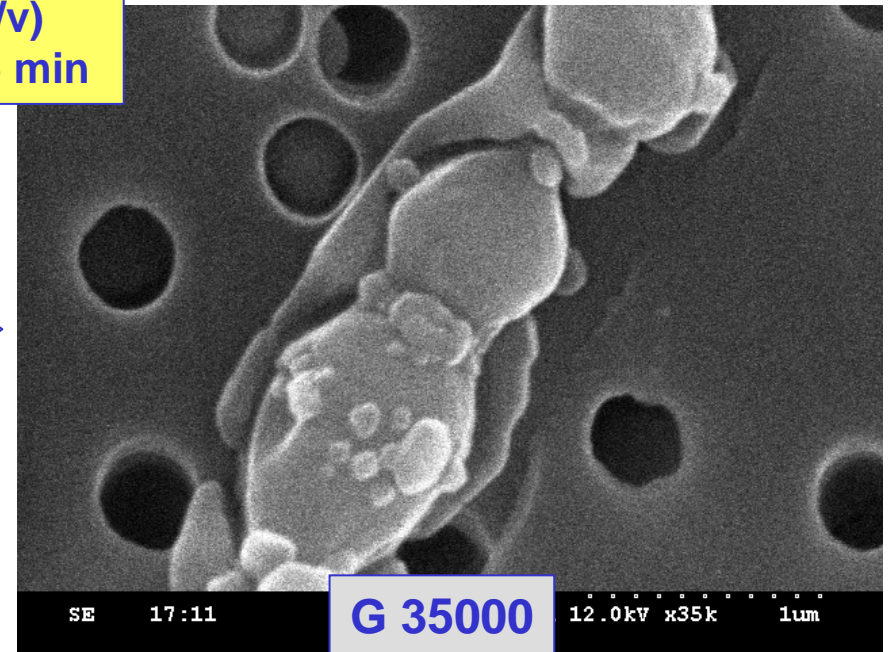
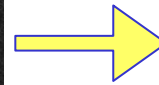
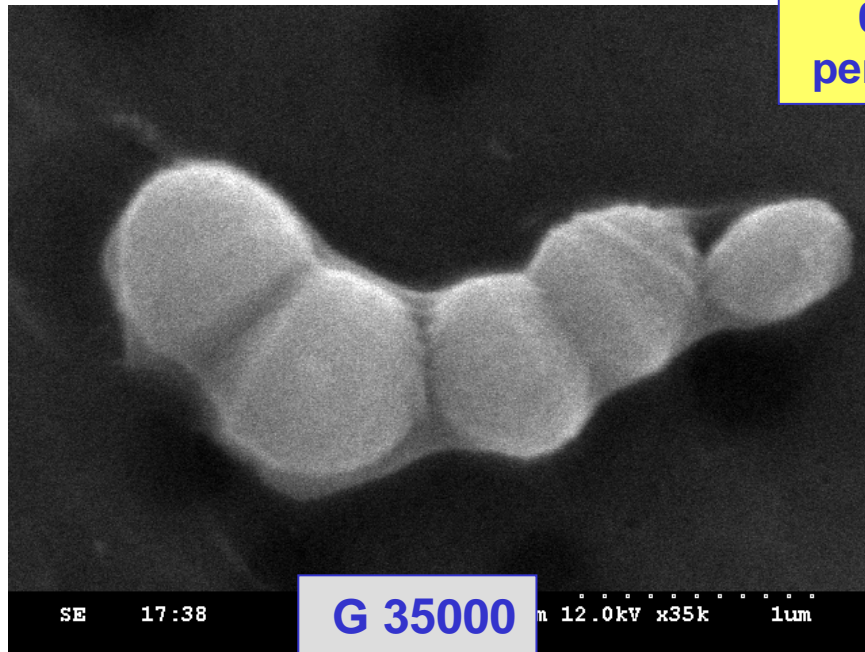
Cannelle écorce
2,5% (v/v)
pendant 15 min



4- MEB

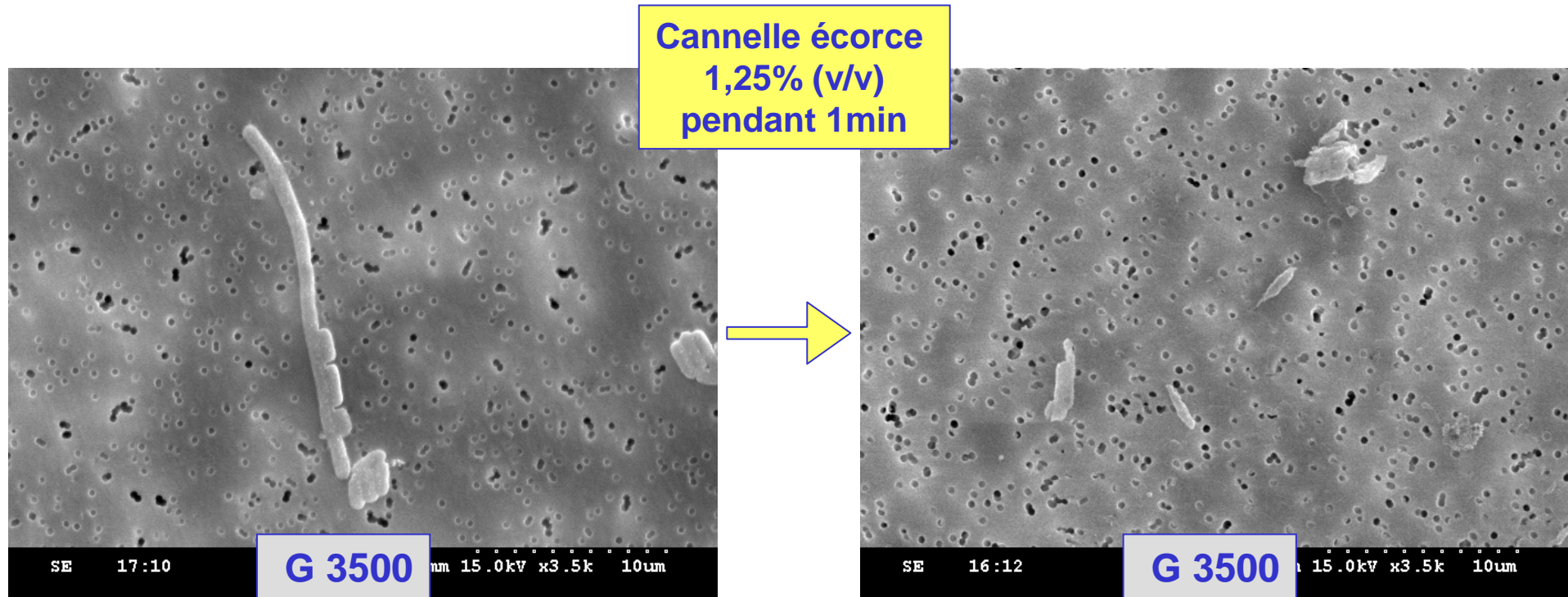
4.2- photographies *S. pyogenes* (3/3)

Cannelle écorce
0,62% (v/v)
pendant 15 min



4- MEB

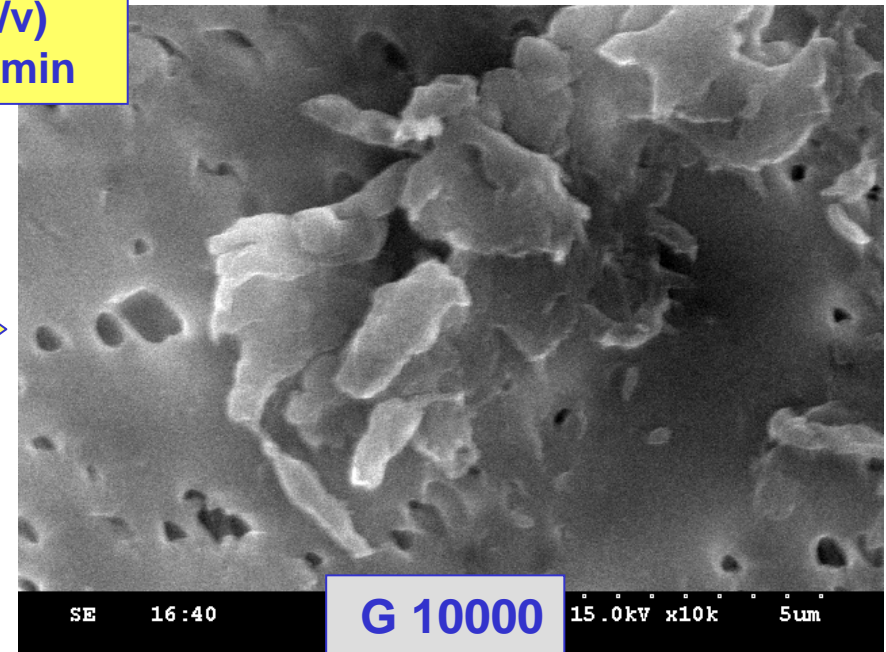
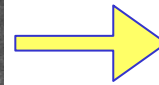
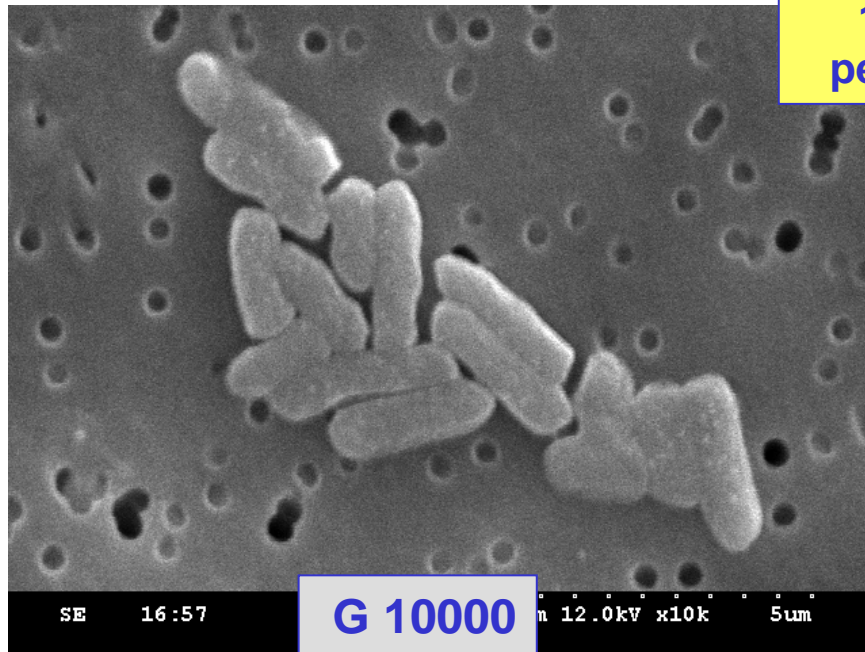
4.2- photographies *E. coli* (1/3)



4- MEB

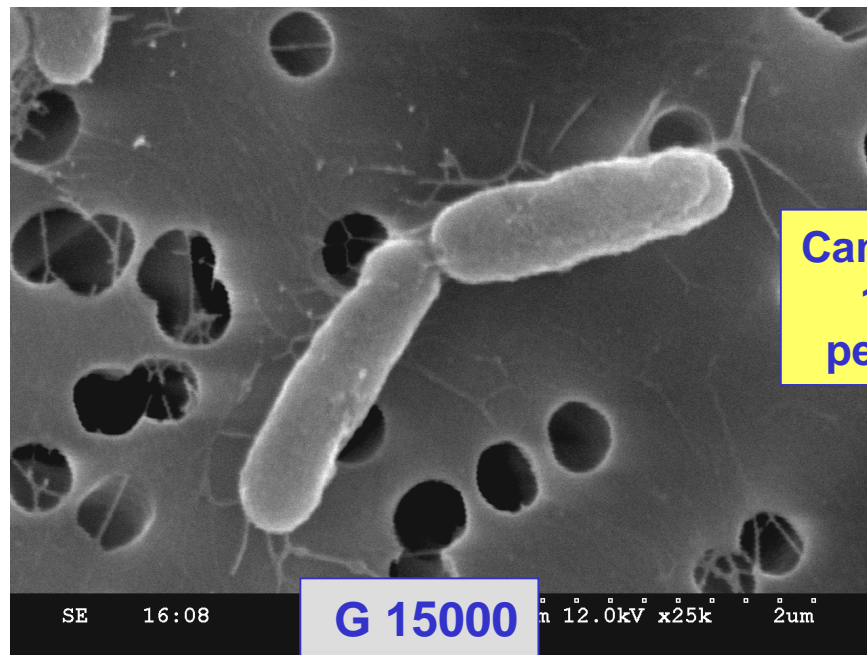
4.2- photographies *E. coli* (2/3)

Cannelle écorce
1,25% (v/v)
pendant 1min

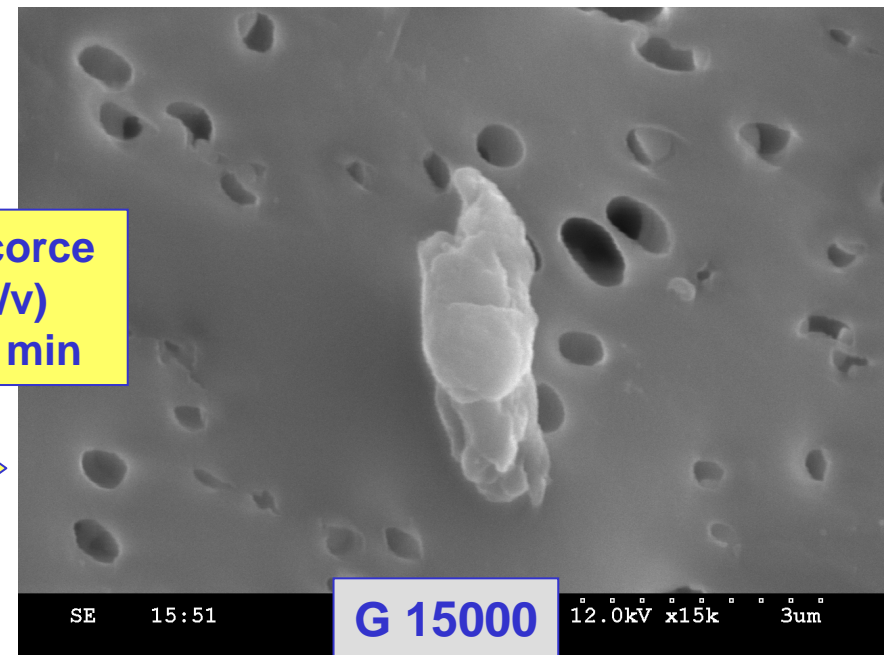
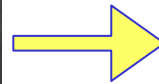


4- MEB

4.2- photographies *E. coli* (3/3)

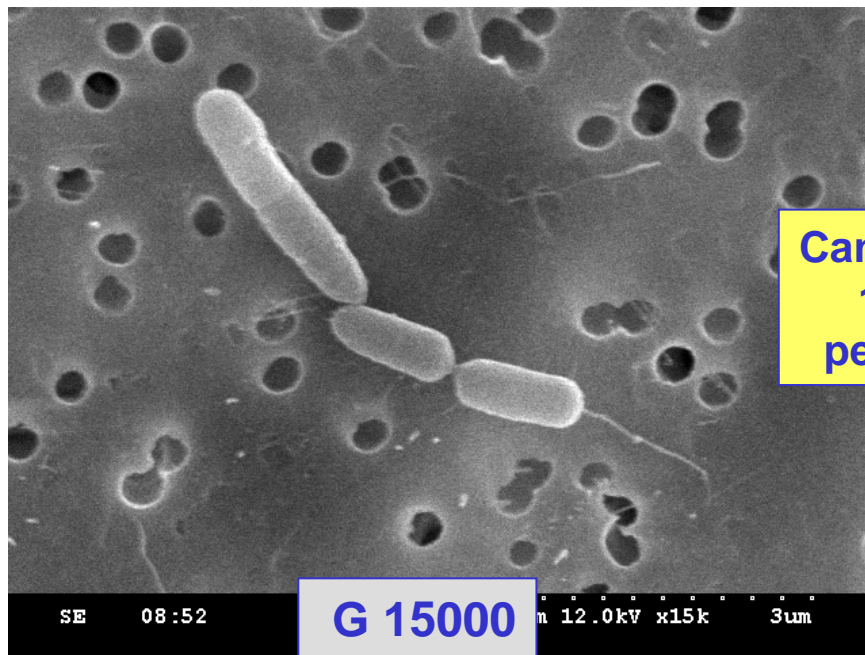


Cannelle écorce
1,25% (v/v)
pendant 1 min

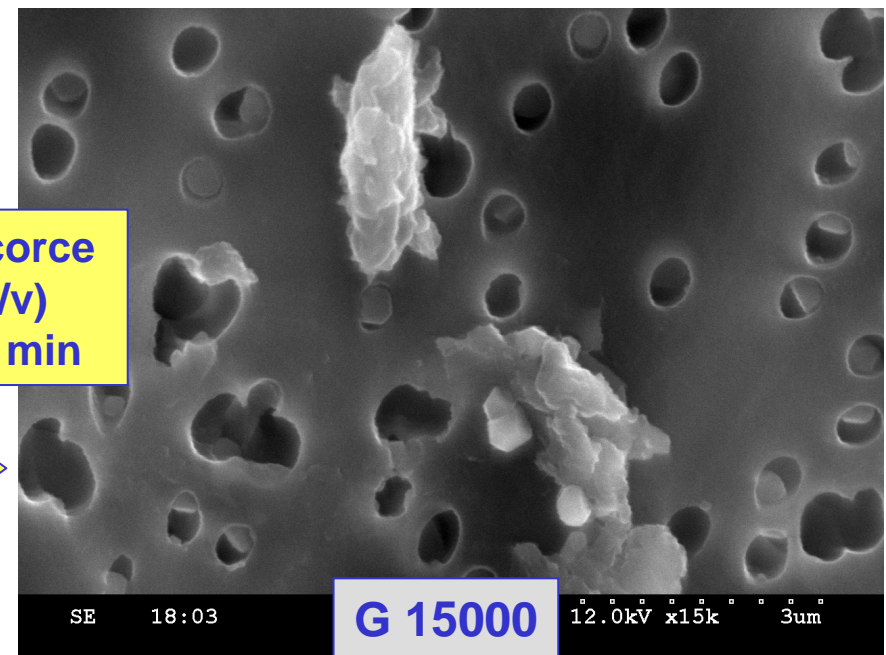
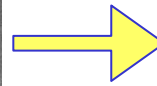


4- MEB

4.2- photographies *P. aeruginosa*



Cannelle écorce
1,25% (v/v)
pendant 1 min





1- Introduction

2- Rappel sur les HE

3- Activité antimicrobienne des HE

3-1 Matériel

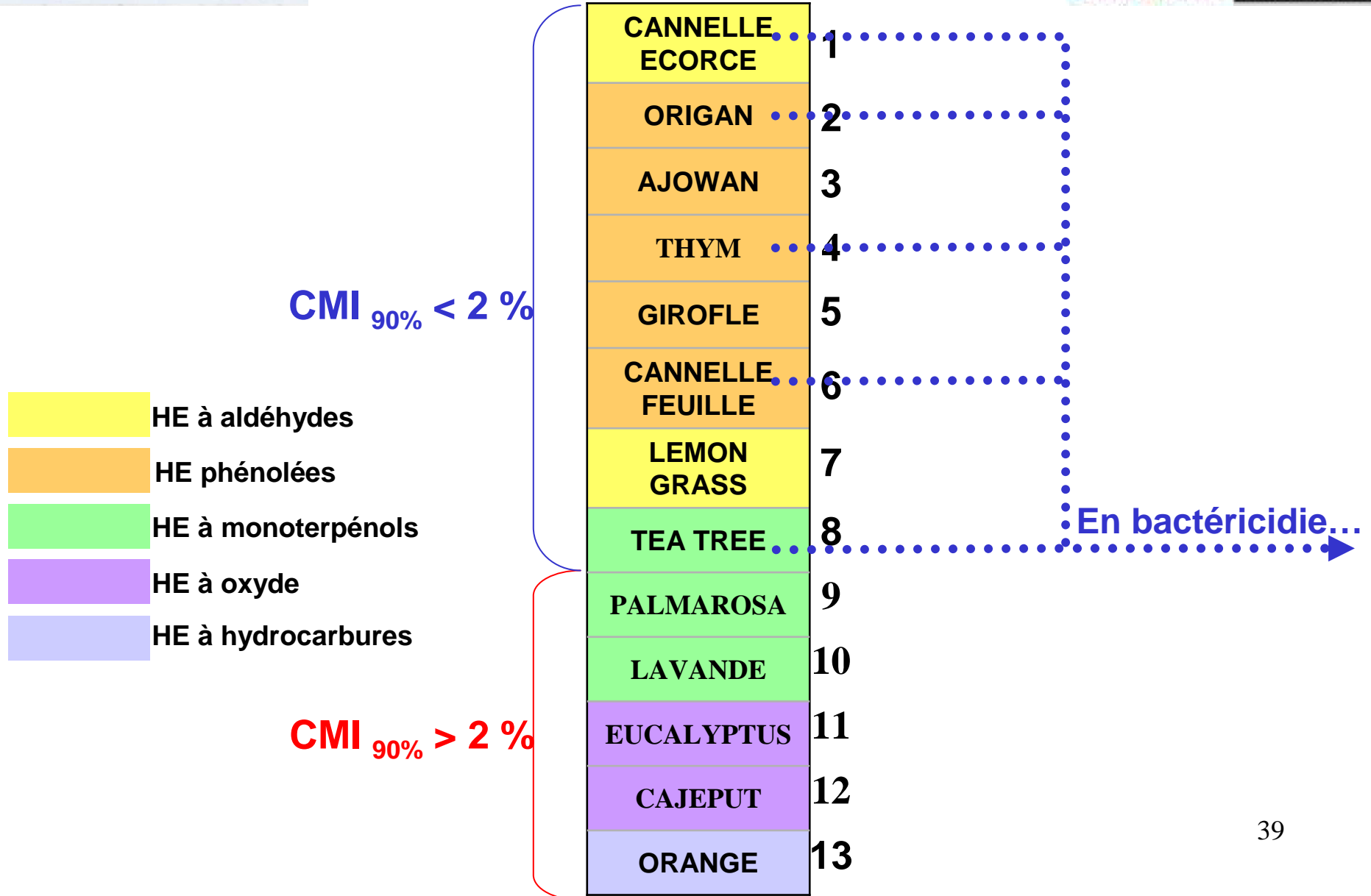
3-2 Activité bactériostatique

3-3 Activité bactéricide

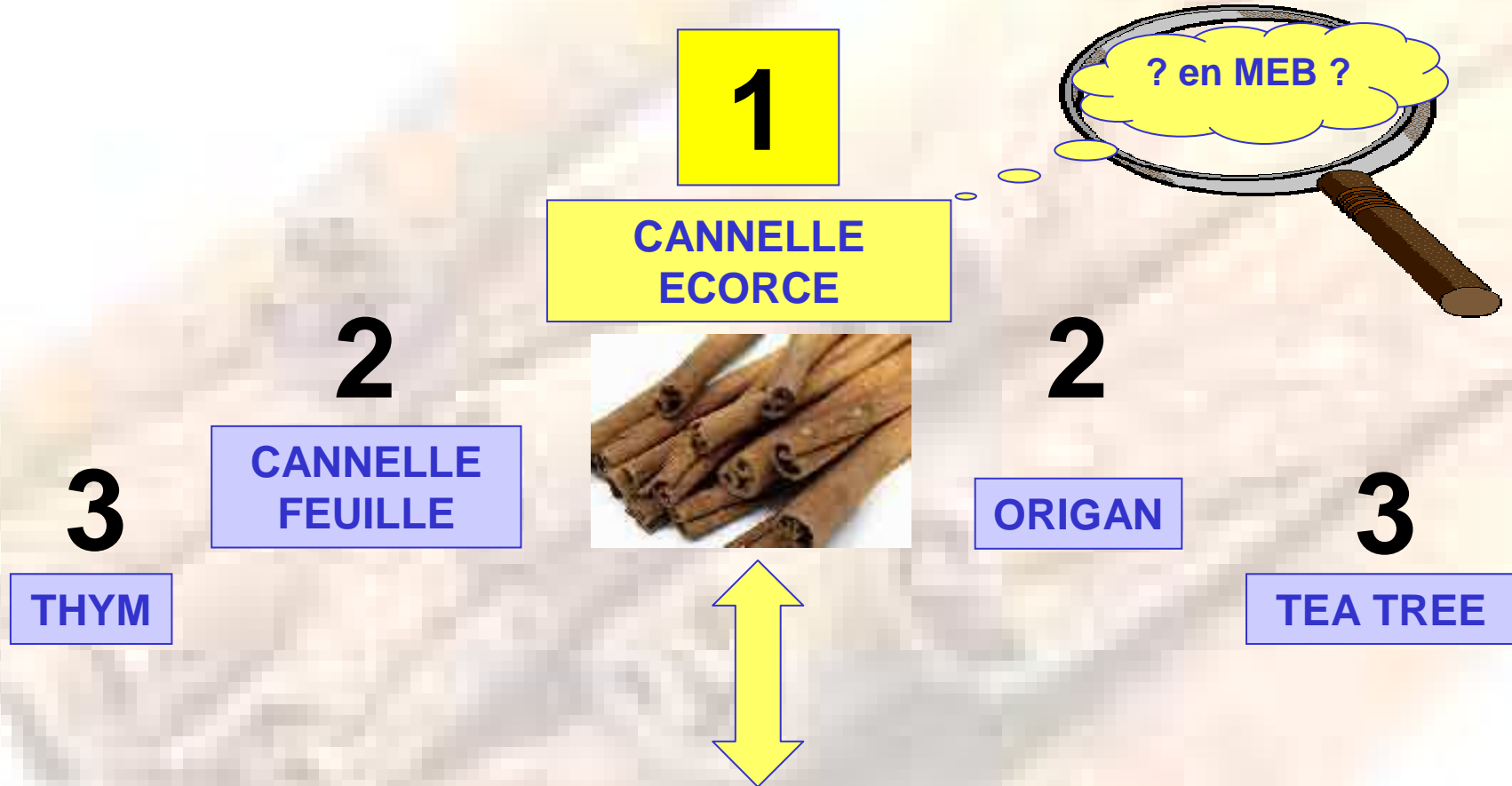
4- Microscopie électronique à balayage

5- Conclusion

8- Conclusion : bactériostase



8- Conclusion : bactéricidie

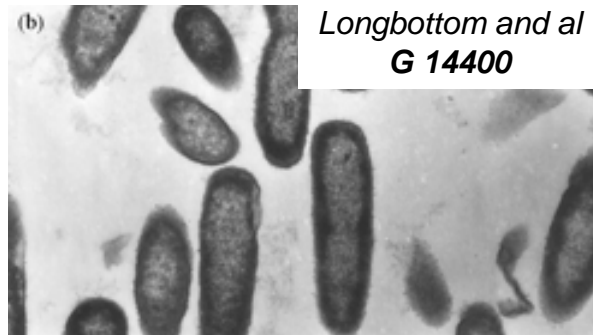


Bactéricidie totale sur *P. aeruginosa*
en 5 minutes à 0,62 %

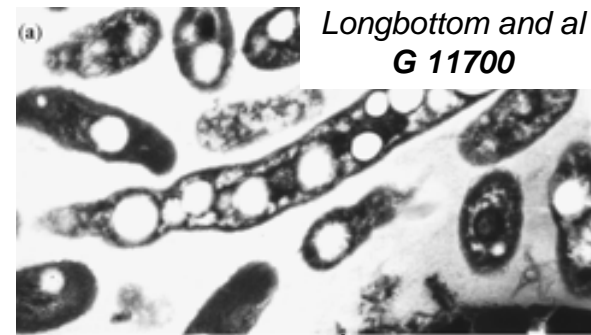
8- Conclusion : MEB

- Observation de l'effet MEMBRANAIRE des HE
(détachements, formation de *vésicules* extra-cellulaires, formation de protoplastes)

-Utilisation complémentaire de la MET
pour observer la morphologie et l'ultra-structure des micro-organismes
(épaississement des membranes, vacuoles osmotiques,
invaginations de la membrane plasmique dans le cytoplasme,
perte de densité cellulaire, coagulation des composants intracytoplasmiques)



P. aeruginosa sans traitement



P. aeruginosa après traitement
par le terpinen-4-ol 2 % (60 min)

-Cinétique de bactéricidie + microscopie électronique + méthode biochimique
= hypothèses sur le mécanisme d'action des HE



REMERCIEMENTS



- **CHU** : LABORATOIRE de BACTERIOLOGIE,
Hôpital Bellevue, 27 boulevard Pasteur, 42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2
G. AUBERT

- **CMES** : CENTRE de MICROSCOPIE ELECTRONIQUE STEPHANOIS,
Faculté de Médecine, 15 rue A. Paré, 42023 SAINT-ETIENNE Cedex
I. ANSELME BERTRAND

- **PRANARÔM** : DIRECTION RECHERCHE et DEVELOPPEMENT
37 avenue des Artisans, 78 222 Ghislenghien, Belgium
A. ZHIRI

JE VOUS REMERCIE POUR VOTRE ATTENTION