

APPLICATIONS BIOLOGIQUES DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Observation des effets antibactériens d'huiles essentielles (HE) chémotypées en microscopie électronique à balayage

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

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

¹laumayaud@yahoo.fr

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

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

1) Introduction

Le travail a été réalisé à Saint Etienne, dans le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Bellevue et au Centre de Microscopie Electronique (CMES) de la faculté de médecine. Nous avons travaillé en collaboration avec l'entreprise Pranarom de Belgique qui a fourni gracieusement les HE.

Etant donné l'émergence de résistance aux antiseptiques et antibiotiques, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de nouvelles molécules, les HE, sur un nombre important de bactéries présentant des degrés divers de résistance aux antibiotiques.

Le travail a été réalisé en deux temps. Dans un premier temps, nous avons déterminé l'activité antimicrobienne de 13 HE avec des techniques standardisées pour l'évaluation des antibiotiques. Dans un deuxième temps, la MEB a permis d'observer et de vérifier l'action antimicrobienne de ces HE à des concentrations déterminées par les techniques de bactériologie.

2) Détermination de l'activité antimicrobienne des HE

- **Principe**

Pour déterminer l'efficacité antimicrobienne des HE, il a fallu tout d'abord évaluer leur activité bactériostatique définie par la concentration d'HE la plus faible qui permet d'inhiber la croissance bactérienne. Cette concentration est appelée CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). Elle est d'autant plus faible que l'HE est plus efficace.

Les 5 HE les plus actives ont été ensuite évaluées en bactéricidie. L'activité bactéricide est déterminée par la CMB (Concentration Minimale Bactéricide) qui est la concentration d'HE la plus basse permettant de détruire les bactéries. Elle est très importante car elle permet de qualifier un produit d'antiseptique ou de désinfectant si elle est obtenue en un temps bref (généralement inférieur à 1 heure).

- **Techniques**

La technique utilisée en bactériostase était la technique de dilution en gélose. En bactéricidie, nous avons réalisé des cinétiques de bactéricidie (*time-killing curves*).

- **Résultats**

Sur 90 % des 64 souches bactériennes testées en bactériostase, excepté *P. aeruginosa*, 8 HE avaient une CMI_{90%} < 2 % (v/v). Ces HE comportent des molécules à fonction aldéhydique, phénolique ou alcoolique.

P. aeruginosa était la plus résistante aux HE, comme aux antibiotiques et antiseptiques. Sur cette bactérie, seules les HE d'Origan et de Cannelle écorce avaient des CMI proches de 2 %.

L'activité bactéricide a été déterminée sur 5 des 8 HE les plus efficaces en bactériostase (Cannelle écorce, Origan, Thym, Cannelle feuille, *Tea tree*) sur 4 souches bactériennes choisies en fonction de leur pouvoir pathogène et de leur résistance particulière aux antibiotiques : *S. aureus*, *E. coli*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*.

Les 5 HE étaient bactéricides en moins d'une heure à des concentrations inférieures ou égales à 10 % sur *S. aureus*, *E. coli*, *S. pyogenes*. Sur *P. aeruginosa*, les 2 seules HE qui étaient bactériostatiques, la Cannelle écorce et l'Origan, avaient une activité bactéricide en 5 minutes à des concentrations inférieures 2 %.

3) Observation au MEB

- **Principe**

Etant donné que la Cannelle écorce est l'HE la plus efficace en bactéricidie, nous avons observé ses effets sur les bactéries en microscopie électronique à balayage. Toutes les photos ont été réalisées au CMES (Centre de Microscopie Electronique de Saint Etienne) à la faculté de médecine sous la direction d'Isabelle Anselme Bertrand, ingénieur au CMES.

- **Techniques**

La préparation des échantillons a été réalisée de la manière suivante :

- Fixation 30 min à température ambiante dans un mélange fixateur volume à volume PBS + glutaraldéhyde à 2 % final
- Post-fixation 30 min à température ambiante dans un mélange volume à volume PBS + tétroxyde d'osmium à 1 % final
- Rinçage 3 fois 10 min dans le PBS
- Séchage à l'air et métallisation à l'or-palladium
- Observation des échantillons au microscope électronique à balayage (HITACHI S 3000 N) en mode haut vide avec le détecteur d'électrons secondaires à des tensions de 12 et 15 KV.

- **Résultats**

Les bactéries ont été observées avant et après traitement par l'HE à une concentration bactéricide pendant un temps fixé. La concentration d'HE et le temps de contact ont été choisis en fonction des résultats de bactéricidie obtenus en cinétique de bactéricidie.

Pour les 4 bactéries précédemment citées et testées en bactéricidie, l'action des HE sur les membranes était évidente : détachement membranaire, libération de vésicules, désagrégation, perte de perméabilité... En effet, selon plusieurs travaux réalisés sur l'HE de *Tea tree*, la cible des HE est avant tout membranaire, comme la plupart des antiseptiques. Les molécules d'HE feraient perdre aux bactéries leur fluidité membranaire en s'infiltrant dans les membranes. De nombreux mécanismes secondaires à cette perte d'intégrité membranaire seraient responsables de la mort cellulaire. La MET est intéressante pour compléter l'observation en MEB. Elle permet de visualiser

tous les effets secondaires au défaut de perméabilité membranaire : présence de vacuoles osmotiques, perte de densité cellulaire, coagulation des protéines intra-cytoplasmiques.

4) conclusion

Le mécanisme d'action des HE reste complexe ; pour bien le connaître, il faut combiner plusieurs techniques d'étude : méthodes biochimiques, bactériologiques et microscopiques. Grâce à l'utilisation concomittente de la cinétique de bactéricidie et à la MEB, des scientifiques ont montré que des bactéries ayant leur membrane intacte étaient déjà mortes. Selon cette observation, la lyse cellulaire serait consécutive à la mort cellulaire.