

## Comment étudier en classe de seconde l'effet biologique des huiles essentielles sur un champignon ?

Par les élèves de seconde 11 du lycée Jean Calvin de Noyon : Brimeux Charlotte, Champenois Eva, Flameng-Rivol Kyllian, Fleury Emilie, Gedda-Thiesset Lara, Huang Mélissa, Jouan Lou-Anne, Kaya Valentine, Louasse Clara, Ntangu Cloé, Pietrzak Manon, Vandentorren Rayan, Visse Laure.

### Encadrés par :

- Mme Danglot Karine professeur de SVT
- Mme Moja Sandrine, Maitresse de conférences au Laboratoire BVpam UMR CNRS 5079 - Université Jean Monnet – Saint Etienne

**Mots clés :** plante, huile essentielle, levure, défense, écologie chimique

### Résumé

Les élèves de la classe seconde 11 du lycée Jean Calvin de Noyon se sont demandés comment les plantes pouvaient se protéger contre une attaque de champignons. C'est une question qui relève du domaine de recherche de l'écologie chimique. Pour cela ils ont choisi de travailler avec un champignon, la levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*). Cette espèce est un organisme unicellulaire avec un noyau (eucaryote), elle est un modèle de laboratoire en biologie cellulaire. Côté plante ils se sont tournés vers les huiles essentielles (HE) de lavande vraie (*Lavandula angustifolia*) et de romarin officinal (*Rosmarinus officinalis L. cineoliferum*) connues pour leur effet antimicrobien. La levure a été cultivée sur de la gélose nutritive dans des boîtes de pétri et en condition stérile. Deux protocoles de contact levure - huiles essentielles ont été mis en place. Le premier a consisté à cultiver les levures 8 jours à 30 °C puis à appliquer pendant 8 jours les disques de papier imbibés d'HE à différentes concentrations (0, 25%, 50 % ou 75 %). Suite aux résultats ne montrant aucune différence de l'état des levures entre les conditions testées un deuxième protocole a été suivi. Les huiles essentielles ont été appliquées de la même façon mais dès l'étape d'ensemencement de la gélose nutritive. Après une semaine de culture, une inhibition de la croissance des levures autour des disques était visible sur toutes les cultures en présence d'HE.

### Introduction :

Dans beaucoup de sites internet, les huiles essentielles sont conseillées pour lutter contre les champignons notamment dans l'air respiré. Comment vérifier si les plantes peuvent se protéger avec leurs huiles essentielles face aux champignons ? Les HE sont des mélanges de molécules appelées composés organiques volatils (COV). Ces molécules sont produites par de nombreuses plantes et extraites par distillation. Dans la nature, les COV permettent aux plantes de communiquer chimiquement avec les autres organismes de leur environnement. C'est une forme de langage qui permet par exemple d'attirer des pollinisateurs sur les fleurs (pour la reproduction de la plante) ou au contraire de repousser les herbivores ou les pathogènes (champignons, bactéries) et ainsi défendre la plante de divers agresseurs. Les élèves ont observé que beaucoup de produits dans le commerce contiennent de la lavande et du romarin, d'où le choix de ces huiles essentielles dans leur étude sur la levure de boulanger vivante cultivée en condition stérile.

### Matériels et méthodes

#### Culture des levures en conditions stériles

- Toutes les manipulations sont réalisées en condition stérile sur une paillasse nettoyée à l'éthanol, dans la zone de 20 cm autour d'un bec bunsen, en respectant les règles d'hygiène et de sécurité (mains lavées, port d'une blouse, manches relevées et cheveux attachés). La solution de levure est préparée à température ambiante avec 0,5 g de levures déshydratées (marque Chabrior) remise en suspension avec un agitateur stérile dans 100 mL d'eau stérile puis divisée dans des tubes stériles de 1 ml. Le milieu de culture est préparé avec 0.5 g de bouillon de bœuf (marque Maggie), 0.7 g de glucose (Sordalab) et 0.5 g d'agar-agar (Sordalab) dissous avec un agitateur dans 25 mL d'eau distillée préalablement chauffée (figure 4), le mélange est porté à ébullition puis versé dans une boîte de pétri stérile (figure 5). 50 boîtes de pétri sont préparées afin de disposer de 5 répétitions par condition. Après refroidissement les boîtes sont ensemencées avec une goutte de suspension de levures, déposée avec une pipette pasteur stérile et étalée avec un étaleur stérilisé à l'éthanol (figure 6). Les boîtes sont placées à 30°C dans une étuve pendant une semaine.

#### Application des huiles essentielles sur les levures

- Toutes les manipulations sont réalisées en condition stérile. Deux protocoles expérimentaux de contact des levures avec les HE sont réalisés. Dans les deux cas des disques de papier wattman imbibés de solution d'HE concentrées ou diluées dans de l'huile d'olive sont déposés dans la boîte de pétri. Le premier protocole correspond à un contact sur des cultures de levure âgées d'une semaine. Le second correspond à une mise en contact lors de l'ensemencement. Dans les deux cas le temps d'application du traitement est d'une semaine à 30 °C. Les huiles essentielles de lavande (*Lavandula angustifolia* de chez Pranarom composé de Linalol et d'acétate de Linalyle) et de romarin à cinéanol (*Rosmarinus officinalis L. cineoliferum* de naturactive composé de 1,8-cinéole, camphre,  $\alpha$ -pinène) sont utilisées pures ou diluées dans de l'huile d'olive aux concentrations suivantes : 0 ; 25 ; 50 ; 75 %. Après une semaine de culture, les résultats sont lus, les boîtes sont photographiées et le nombre de colonies est mesuré avec le logiciel « mesurim » (Logiciel réalisé par Jean-François Madre, enseignant associé à l'équipe ACCES)



Figure 1 : Préparation du milieu de culture



Figure 2 : Répartition du milieu de culture dans une boîte de Pétri



Figure 3 : prélèvement de culture mère de levures



Figure 4 : étalement des cellules sur la gélose

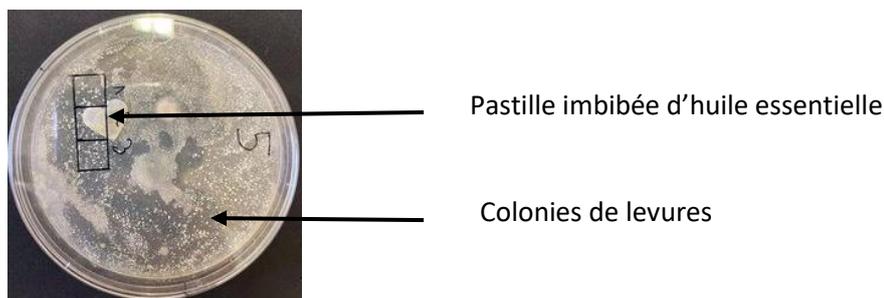
## Résultats

### Effet des huiles essentielles de romarin et lavande sur des colonies de levure formées (figure 5)

Des colonies de levure se sont formées sur toute la surface de gélose après une semaine de culture. Certaines boîtes étaient contaminées par des colonies de petite taille (probablement des bactéries) et n'ont pas été utilisées par la suite. Chaque boîte a été prise en photo sans être ouverte avant et après application des HE (figure 5).

Conditions	Répétitivité de l'expérience	Résultats Présence ou absence de halo d'inhibition
Boîtes témoin sans huile essentielle	N = 3	Absence de halo d'inhibition
Boîtes avec un support diffusant de l'huile essentielle de romarin	N = 3	
Boîtes avec un support diffusant de l'huile essentielle de romarin diluée à 25 %	N = 3	
Boîtes avec un support diffusant de l'huile essentielle de romarin diluée à 50 %	N = 3	
Boîtes avec un support diffusant de l'huile essentielle de romarin diluée à 75 %	N = 3	
Boîtes avec un support diffusant de l'huile essentielle de lavande	N = 3	
Boîtes avec un support diffusant de l'huile essentielle de lavande diluée à 25 %	N = 3	
Boîtes avec un support diffusant de l'huile essentielle de lavande diluée à 50 %	N = 3	
Boîtes avec un support diffusant de l'huile essentielle de lavande diluée à 75 %	N = 3	

**Figure 5 : résultats du premier protocole**



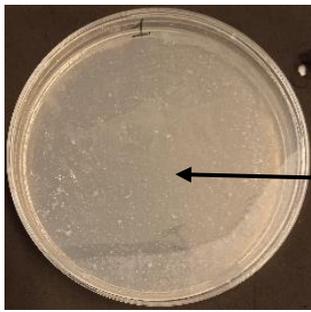
**Figure 6 : exemple de résultat après une semaine de mise en contact avec les huiles essentielles**

### Effet des huiles essentielles de romarin et lavande sur la croissance de la levure de boulanger (figure 7)

Les résultats sont présentés sur la figure 7. Après une semaine à 30 °C les levures se sont multipliées sur toutes les boîtes en formant un tapis plus ou moins uniforme avec parfois quelques colonies isolées. Sur toutes les boîtes avec un disque imprégné d'HE un halo d'inhibition apparaît nettement autour du disque, c'est une zone de quelques mm sans cellule. Cette zone n'est jamais observée sur les boîtes témoins sans disque et celles avec disque imprégné d'huile d'olive qui sert de diluant des HE.

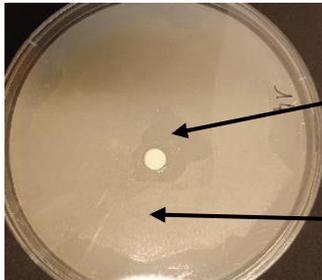
Conditions	Répétitivité de l'expérience	Résultats Présence ou absence de halo d'inhibition
Boîtes témoin sans huile essentielle	N = 3	Absence
Boîte avec un support diffusant de l'huile essentielle de romarin	N = 3	Présence
Boîte avec un support diffusant de l'huile essentielle de romarin diluée à 25 %		
Boîte avec un support diffusant de l'huile essentielle de romarin diluée à 50 %		
Boîte avec un support diffusant de l'huile essentielle de romarin diluée à 75 %		
Boîte avec un support diffusant de l'huile essentielle de lavande	N = 3	Présence
Boîte avec un support diffusant de l'huile essentielle de lavande diluée à 25 %		
Boîte avec un support diffusant de l'huile essentielle de lavande diluée à 50 %		
Boîte avec un support diffusant de l'huile essentielle de lavande diluée à 75 %		
Boîte avec un support diffusant de l'huile d'olive	N = 3	Absence

**Figure 7 : résultats du second protocole**



Développement de colonies de levures

**Figure 8 : exemple de résultat en l'absence d'huile essentielle**



Halo d'inhibition

Pastille imbibée d'huile essentielle

**Figure 9 : exemple de résultat en présence d'huile essentielle**

### Discussion :

Les résultats obtenus avec le premier protocole sur colonies formées ont été traités avec le logiciel mesurim. Les comptages ont été très difficiles en raison du grand nombre de colonies formées après une semaine de croissance. Aucun changement n'a été observé suite à l'addition d'HE sur les colonies par la méthode du disque de papier imprégné et cela quelle que soit la concentration (0, 25, 50, 75 et 100%) et le type d'HE (lavande, romarin). Ces résultats indiquent que les traitements aux huiles essentielles appliqués sur les colonies de levure de boulanger n'ont pas modifié la croissance cellulaire ou que la méthode ne permet pas de mesurer cette variation de croissance. Cette seconde hypothèse a conduit à l'élaboration d'une deuxième expérience. Les élèves ont décidé de revoir le protocole, et de mettre en même temps la levure et les huiles essentielles et d'ajouter une condition pour tester l'impact de l'huile d'olive seule sur la croissance des levures. Après une semaine de culture un halo d'inhibition est apparu autour des disques quelle que soit la dilution (25, 50, 75 et 100%) et le type d'HE (lavande, romarin). Les résultats montrent que la culture de levure n'a pas pu se développer au contact des huiles essentielles de lavande ou de romarin. Par ailleurs les résultats indiquent que les huiles essentielles agissent même très diluées. Cette méthode n'est pas quantitative et il est difficile d'établir le lien entre le diamètre d'inhibition de croissance et la concentration en HE. En effet ces dernières étant de nature lipophile (hydrophobe), leur diffusion dans la gélose (hydrophile) n'est pas mesurable ce qui pourrait expliquer pourquoi les élèves n'ont pas observé d'auréole plus ou moins importante autour du disque en fonction de la dilution d'HE. Les élèves ont également montré que l'huile d'olive n'a aucune action contre la croissance des levures de boulanger. Les huiles essentielles de lavande et romarin sont riches en monoterpènes, petites molécules à 10 carbones portant différents groupements chimiques (F. Mayer, 2012). Chaque espèce ou variétés d'une même espèce produit un mélange spécifique qui conduit à la composition de l'HE. Les HE de lavande sont extraites par distillation à partir des inflorescences, celles du romarin à partir des feuilles. Les HE sont vendues dans de nombreux espaces commerciaux et en officine. Celle de lavande est la plus vendue par les pharmaciens (A. Gaynard, 2016).

### Conclusion :

Les résultats de cette étude mettent en évidence que le protocole expérimental doit être adapté à la question biologique. Ici les données de la seconde expérience s'ajoutent à la liste des travaux qui ont montré que de nombreuses huiles essentielles empêchent le développement des champignons. Les données de la première expérience tendent à montrer qu'une fois que ceux-ci se sont développés, les huiles essentielles n'ont plus d'efficacité sur leur croissance ou elle est plus faible.

Les élèves sont arrivés à imaginer une suite à leurs travaux. Afin de compléter ces résultats, il serait intéressant de travailler avec plusieurs huiles en même temps afin de voir si à plusieurs, elles ont une meilleure efficacité, tester les huiles sur d'autres champignons ou organismes vivants. Ces idées et le concept d'effets synergiques ou antagonistes des HE s'inscrivent dans les champs disciplinaires de la phytothérapie, de l'écologie chimique et de la lutte contre les pathogènes des cultures animales ou végétales.

### Bibliographie :

- Audrey Gainard. Lavandes et lavandin, utilisation en aromathérapie : enquête auprès des pharmaciens d'officine. Sciences pharmaceutiques. 2016. ffdumas-01304457f
- Florence Mayer. Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite. Sciences pharmaceutiques. 2012. ffhal-01734464f