

SVT	Thème 2A - De la plante sauvage à la plante domestiquée	Term Spécialité
TP	Chapitre 2 : La plante productrice, de matière organique	ESTHER

TP : Vérifier l'effet antimycosique d'une huile essentielle

Mise en situation et recherche à mener

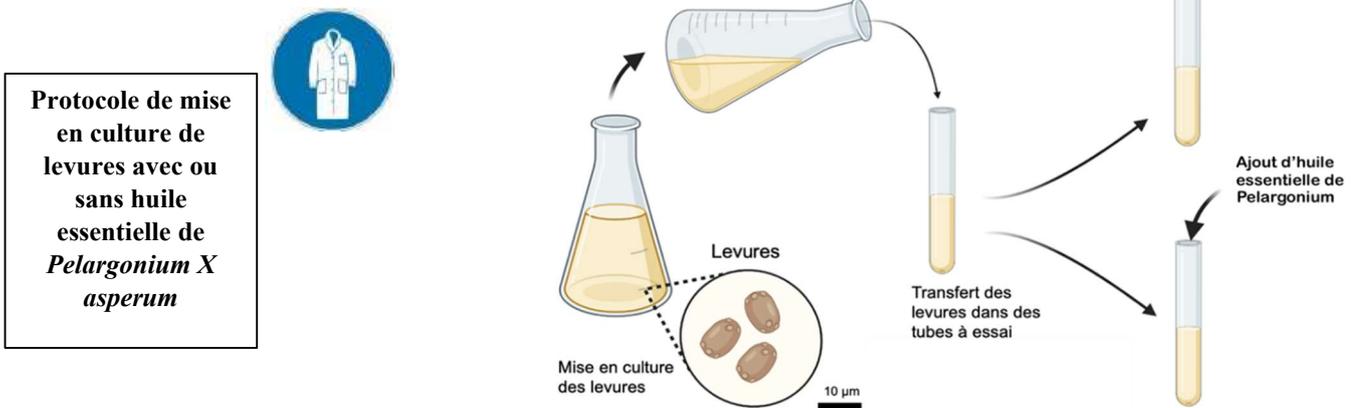
Les huiles essentielles sont vantées pour leurs nombreuses propriétés. L'huile essentielle de Géranium rosat, *Pelargonium x asperum* (Géranium d'Égypte), est commercialisée avec des indications valorisant ses vertus antibactérienne, antivirale, antiparasitaire, antimycosique et anti-inflammatoire.



On cherche à vérifier, par des mesures de croissance de populations cellulaires, les effets antimycosiques de cette huile essentielle de Géranium rosat.

Ressources

Doc - Une technique pour tester la sensibilité d'un champignon (la levure *Saccharomyces cerevisiae*) vis-à-vis d'un ou plusieurs huiles végétales



Rappel : Une solution antimycosique a la capacité de tuer les champignons ou de ralentir leur croissance.

Matériel et protocole d'utilisation du matériel

Matériel :

- suspension de levures cultivées en présence d'huile essentielle de *Pelargonium X asperum* pendant 24 h ;
- suspension de levures cultivées en présence d'une huile d'olive pendant 24 h ;
- microscope avec dispositif de capture d'image
- Micropipette et cônes
- lames, lamelles ;
- **lames de comptage** et leur fiche technique
- logiciel Mesurim2 et son outil de comptage
- fiche technique du logiciel **Mesurim2**
- vortex (pour remettre en suspension les suspensions de levures avant comptage)

Afin de vérifier les effets antimycosiques de l'huile essentielle de Géranium rosat :

- réaliser des préparations de culture de levures sur lame de comptage Kova
- réaliser des comptages de vos préparations à partir de Mesurim 2



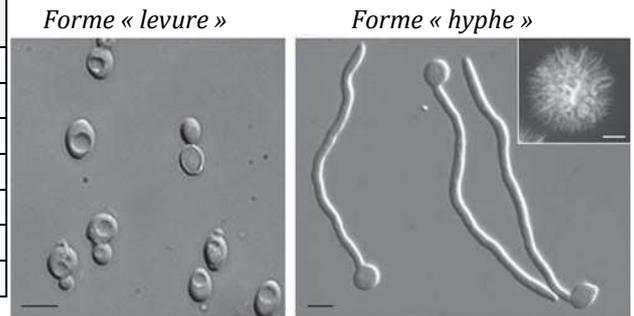
Consignes (type ECE)

- A. **Proposer une stratégie** de résolution réaliste, à partir des ressources, du matériel et du protocole d'utilisation proposés. **Préciser le matériel** dont vous aurez besoin pour mettre en œuvre votre stratégie. **Mettre en œuvre votre protocole** pour obtenir des résultats exploitables.
- B. Sous la forme de votre choix, **présenter et traiter les données brutes** pour qu'elles apportent les informations nécessaires à la résolution du problème. Demandez ensuite de la **ressource complémentaire**. **Exploiter** l'ensemble des résultats pour résoudre la situation problème.

Document complémentaire A

Le champignon *Candida albicans*, qui provoque des maladies de peau notamment, forme des hyphes lorsqu'il est dans des conditions favorables. Les chercheurs de l'Université de Gdansk, ont procédé à une observation microscopique de la formation d'hyphes dans différentes conditions :

Expérience	Contenu des préparations en hyphes (%)	
	Après 2h	Après 24h
Huile essentielle de thym	95	22
Huile essentielle de citron	0	0
Huile essentielle de géranium	0	0
Huile essentielle de cannelle	0	27
Huile essentielle de basilic	5	11
Témoin (eau)	95	22

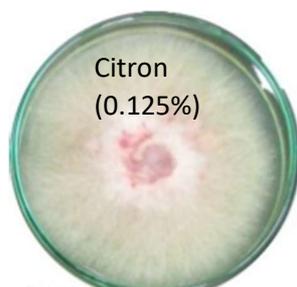


Source : <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/5/1116> □ Étude de l'activité antifongique et du mode d'action des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum* et *Eugenia caryophyllus* ; Département de technologie pharmaceutique et de biochimie, Université technologique de Gdańsk

Document complémentaire B

Les champignons de la famille *Fusarium* provoquent des pathologies chez les végétaux (fusarioses). Des scientifiques ont testé l'efficacité de plusieurs huiles végétales sur la croissance d'une population de champignons *Fusarium graminearum*.

Concentration en huile (%)	Croissance en % des colonies de <i>Fusarium graminearum</i>				
	Témoin	Citron	Bois de rose	Géranium	Romarin
0.125	85	59.67	0	0	54.00
0.25	85	54.33	0	0	19.00
0.5	85	35.67	0	0	4.17
1.0	85	20	0	0	0
2.0	85	0	0	0	0



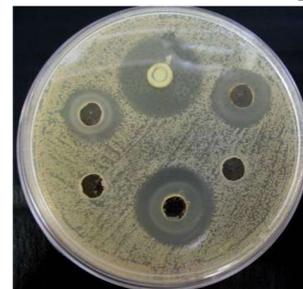
Exemples de résultats pour un témoin (à gauche), pour l'huile essentielle de citron (au centre) et pour l'huile essentielle de géranium à droite

Source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6359302/> → Comparaison de l'activité antifongique de certaines huiles essentielles par rapport aux isolats de *Fusarium graminearum*; Department Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole (Poland)

Document complémentaire C

Les champignons *Candida albicans* et *Candida neoformans* peuvent provoquer des maladies de la peau et des muqueuses nommées candidose. Des scientifiques ont testé l'efficacité de plusieurs antifongiques comparés à l'huile végétale de géranium. Ils ont mesuré le diamètre des disques d'inhibition autour de la pastille du produit testé sur une culture de champignons sur boîte de pétri.

Expérience	Diamètre de la zone d'inhibition (en mm)	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
Clotrimazole (25µg)	0	0
Itroconazole (30µg)	14	19
Amphotéricine (100 U)	0	0
Fluconazole (10µg)	22	0
Huile essentielle de géranium	22	22



Culture de *C. albicans* et test d'efficacité de produits antifongiques

Source : <https://www.researchgate.net/publication/269985912> Antifungal Activity of Rose-Scented Geranium *Pelargonium* Species Essential Oil and its Six Constituents

Fiche méthode - Utiliser une lame de comptage KOVA

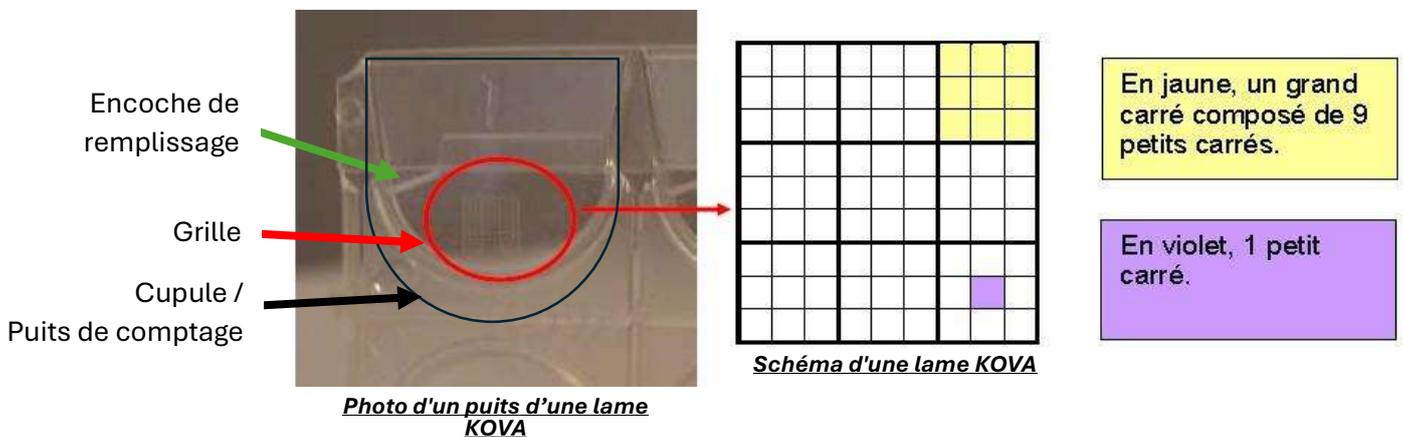
Objectif :

On veut déterminer la concentration cellulaire d'une culture c'est-à-dire le nombre de cellules par unité de volume (exemple 4 500 cellules / mL). Il faut donc compter les cellules dans un volume connu, pour cela on utilise la lame KOVA SLIDE (qui comporte un quadrillage) et un microscope.

Méthode :

Chaque lame comporte 10 puits de comptage. Chaque puits de comptage comprend une grille comportant 9 grands carrés, chacun découpé en 9 petits carrés :

- 9 grands carrés contiennent 1 μL de liquide
- 1 grand carré (formé de 9 petits carrés) contient 0,1 μL
- 1 petit carré contient 0.01 μL



Comment faire :

1. Avant de remplir le puits il faut **agiter impérativement** la culture car les cellules se déposent !
2. Remplir un puits numéroté avec 10 μL de solution en plaçant le cône au niveau de l'encoche et en injectant doucement et **sans déborder** !
3. Compter au microscope. On doit compter plusieurs petits carrés (selon la densité des cellules).
 - Si une cellule est sur une ligne de la grille, elle est comptée uniquement si elle se situe sur la ligne inférieure ou la ligne du côté droit du carré en cours de comptage.

Comment déterminer une concentration cellulaire :

Situation	Peu de cellules	Cellules nombreuses	Cellules très nombreuses
Comptage sur	9 grands carrés	1 seul grand carré	1 seul petit carré
Nombre de cellules comptées	n	n	n
Concentration cellulaire	n cellules / μL	n X 10 cellules / μL	n X 100 cellules / μL

Rappel : 1 $\text{mm}^3 = 1 \text{ mL}$