

---



---

Soumis le : 26 Mars 2011

Forme révisée acceptée le : 19 Juin 2011

Email de l'auteur correspondant :

mdi3zhr@gmail.com

---



---

## Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L.

MOHAMMEDI Zohra\*, ATIK Fawzia\*

\*Laboratoire des Produits Naturels, Université Abou Bakr Belkaid, BP 119, Tlemcen 13000, Algérie

---

### Résumé

L'huile essentielle de *Lavandula stoechas* obtenue par hydrodistillation a été testée contre sept moisissures appartenant à sept genres différents. Cette huile a démontré une bonne activité antifongique où l'inhibition totale de la croissance a été marquée contre essentiellement *Rhizopus* et *Mucor* les plus sensibles (1.6µg/ml). Les propriétés antioxydantes ont été évaluées en utilisant le test du piégeage du radical libre DPPH. L'huile a révélé un pouvoir de capter les radicaux libres, la concentration efficace qui réduit de 50% le DPPH en solution est de l'ordre de 1,85 mg/ml.

Mots clés : *Lavandula stoechas*, DPPH, huile essentielle, activité antifongique

---

### 1. Introduction

*Lavandula* est un sous-arbrisseau de la famille des Labiées abondant dans le bassin méditerranéen, il pousse spontanément dans la région de Tlemcen (Algérie). Le genre se compose d'environ 28 espèces, qui sont dans la plupart d'origine méditerranéenne [2 ; 9]. Ce sous-arbrisseau est à tige et feuilles persistantes, il peut atteindre une longueur de 1 mètre, étroit vert pâle, s'étend du gris bleuâtre profond au vert à brun pâle, fleurs de couleur bleu – violet. D'autres variétés sont à fleurs blanches et roses. L'ensemble de la plante est très aromatique comprenant fleurs et feuilles [1 ; 3].

*L. stoechas* est une plante tendre, qui préfère les endroits ensoleillés et les sols riches, les tiges étroites sont quadrangulaires à feuilles opposées, à son extrémité une inflorescence terminée par un toupet de longues bractées violettes [3]. Largement distribuée dans les îles canari, Islande et à travers tout le tell méditerranéen, l'Afrique du Nord, Sud ouest de l'Asie, Afrique tropicale avec une disjonction vers l'Inde [10 ; 15].

Les composants majoritaires des huiles de Lavande présentent une variation quantitative importante dépendante de la biodiversité génétique de cette plante. C'est ainsi que L'huile essentielle de différentes populations biogénétiques de *Lavandula* de la Grèce, analysées au stade de pleine floraison ont  $\alpha$ -pinène,

fenchone, camphre et acétate de myrtenyl comme principaux constituants avec une variation quantitative considérable entre les différentes populations, trois d'entre elles étant de type fenchone/camphre et une de type 1,8-cineole/fenchone [12]. Dans une autre étude, 51 composés ont été décrits, les principaux étant fenchone, acétate de pinocarvyl, camphre, eucalyptol et myrthenol, formant 63.4% de l'huile [7].

La Lavande a une longue histoire en usage médicinal [3], employée comme expectorant, antispasmodique, carminative, désinfection des plaies [6], contre les problèmes dermatiques, psoriasis [4], possède des propriétés antimicrobiennes et anti-carcinogènes [6], sédatif, antidépresseur, antioxydant, anti-inflammatoire et insecticide, aujourd'hui, la Lavande est généralement utilisé dans la préparation des parfums et les savons [3].

Notre objectif dans ce travail est d'étudier l'activité antifongique de l'huile essentielle sur la croissance de sept moisissures et d'évaluer la capacité de cette huile volatile à piéger les radicaux libres.

### 2. Matériel et Méthodes

#### 2.1. Matériel végétal

La plante "*Lavandula stoechas*" a été récolté durant la période allant du mois de Novembre jusqu'au Juin, de la région de *Oum el Alou* (Tlemcen, Algérie). Le matériel

végétal a été lavé au laboratoire et séché à l'obscurité dans un endroit bien aéré, à la température ambiante. Les feuilles isolées du reste de la plante se sont conservées dans des sacs propres dans un endroit aéré.

## 2.2. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles des feuilles de la Lavande (100g) a été obtenue par hydrodistillation pendant 2 heures d'extraction dans un appareillage de type Clevenger.

## 2.3. Analyse par CPG et RMN-13C de l'huile essentielle

Les analyses ont été faites par la méthode développée et optimisée par l'équipe de chimie et biomasse, université de Corse. L'utilisation de la RMN-<sup>13</sup>C en tant qu'outil d'analyse des huiles essentielles, sans séparation préalable en association avec la CPG permet d'identifier jusqu'à 24 composés [14]. Expérimentalement, l'analyse de l'huile essentielle de *L. stoechas* s'est effectuée par chromatographe Perkin Elmer Autosystem, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires (50 x 0.22 mm d.i.; épaisseur du film : 0.25 mm), polaire (BP20), polyéthylène glycol) et apolaire (BP1, diméthylsiloxane) et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes: gaz vecteur: Hélium, pression en tête de colonne: 20psi, programmation de température: de 60 à 220°C à 2°C/min avec un palier de 20 min à 220°C, température de l'injecteur: 250°C, température des détecteurs : 250°C, injection : mode split. Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un appareil Bruker400 MHz, équipé d'une sonde de 5 mm opérant à 100 MHz pour le carbone-13, dans le chloroforme deutérié. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm ( $\delta$ ) par rapport au TMS pris comme référence interne.

## 2.4. Test Antifongique

### 2.4.1. les souches :

*Aspergillus flavus* de référence 99.4294 (Muséum National d'Histoire Naturelle MNHN; Paris - France), *Rhizopus stolonifer*; *Mucor spp.*, *Trichoderma spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* et *Penicillium spp.* (Laboratoire produits naturels; faculté des sciences, Tlemcen - Algérie).

### 2.4.2. Le milieu de culture:

Milieu PDA "potatoes dextrose agar" (Par Litre: Extrait de pomme de terre 4g; Dextrose 20g; Agar 15g).

### 2.4.3. Méthode:

La méthode de contact direct a été appliquée pour tester la sensibilité des moisissures vis-à-vis de l'huile essentielle. La technique consiste à additionner l'huile à différentes concentrations au milieu de culture encore liquide à la température de 56°C. Après solidification du milieu de culture, pour chaque moisissure, un disque mycélien de 6 mm de diamètre est déposé aseptiquement à la surface du milieu gélosé au centre de la boîte de pétri de 9 cm de diamètre en verre. Le volume du milieu utilisé est de 20 ml/boîte de pétri. En parallèle des témoins composés de PDA sans huile servent de contrôle. L'incubation a été effectuée dans une étuve à la température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 48 heures pour *R. stolonifer*, 4 jours pour *Mucor spp.*; *Alternaria spp.*; *Trichoderma spp.* et 7 jours pour *Fusarium spp.*; *Penicillium spp.* et *Aspergillus flavus*.

## 2.5. Test Antioxydant

Le test antioxydant a été réalisé par la méthode au DPPH [8] avec quelques modifications. Ce radical libre (2,2'-Diphenylpicrylhydrazyl,  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ ; M : 394.33) possède une coloration violet foncé, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle. Le DPPH est solubilisé dans du méthanol pour en avoir une solution de 0.3 mM. Un millilitre (1ml) de cette solution est ajouté à 2.5 ml de l'extrait en solution dans du méthanol à différentes concentrations (0.002 ; 0.01 ; 0.02 ; 0.1 ; 0.3 ; 0.4 ; 0.5 ; 0.6 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7 ; 9 ; 11 et 13 mg/ml). Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 518 nm par un spectrophotomètre (6405UV/Vis. Spectrophotometer). Pour chaque dilution, on prépare un blanc. Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution DPPH (0.3 mM) et de 2.5 ml de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique et le Trolox (acide 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-Tetraméthylchroman-2-Carboxylique " $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ") dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test. Les résultats ont été exprimés en activité antioxydante ( $\text{AA \%} = 100 - \frac{(\text{Abs}_{\text{test}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}}$ ) et les valeurs de l'EC50 ont été déterminé graphiquement.

## 2.6. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés par la moyenne et l'écart type, les comparaisons statistiques ont été faites au moyen du test de *student* et la valeur  $p < 0.05$  a été considérée significative.

### 3. Résultats et Discussion

La teneur en huile de *L. stoechas* varie de 0.77 à 1.2% [11]. La plante a donné un bon rendement en huile essentielle : 2.01g ± 0.02 obtenu d'une prise d'essai de 100g constituée par des feuilles sèches. Cette huile est d'une couleur jaune, limpide, d'une odeur forte et de densité moyenne de 0.813.

La technique de séparation des constituants de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse associée à la résonance magnétique nucléaire du carbone 13, nous a permis de séparer 21 composés dont 11 espèces chimiques ont été identifiées (Tableau 1). L'huile des feuilles de *L. stoechas* est riche en monoterpènes, les constituants majoritaires sont : Fenchone (27.6%), Cineole (18.9%) et Camphre (18.1%). On rencontre aussi de l'acetate de Bornyl (1.3%), du Camphène (3.2%) et du Viridiflorol (1.1%). Beaucoup de travaux ont révélé la dominance de fenchone, Cineole et Camphre dans les huiles des Lavandes de différentes origines à titre d'exemple les travaux de Garcia Vallejo et al. [5] qui ont noté les principes actifs suivants : fenchone (42.1%) > camphre (23%) > 1,8 cineole (9.4%), par ailleurs *L. stoecha* ssp *stoechas* de la Turquie est dominé par la pulégone (40.37%) [6].

La lavande possède in vitro l'activité contre les bactéries et les mycètes [3]. Notre huile volatile a manifesté un très bon pouvoir antifongique. Les moisissures ont montré une sensibilité accrue à l'augmentation de la concentration de l'huile dans leur milieu de culture où le diamètre de la colonie se réduit à chaque fois qu'on augmente la dose jusqu'à une inhibition totale où aucune croissance n'est observée (Tableau 2). Cet effet est attribué au contenu de l'huile et qui peut être relié aux composés majoritaires, essentiellement au Cineole et camphre.

Toutes les moisissures ont été inhibées à 100% à des doses faibles. Cependant, l'activité antifongique dépend de l'huile essentielle et de la moisissure. L'huile de *L. stoechas* s'est montrée très active envers *Rhizopus stolonifer* et *Fusarium spp.* qui sont inhibées totalement où aucune croissance n'a été observée à la dose de 1.6µg/ml. En revanche la moisissure *Aspergillus flavus* a manifesté une certaine résistance par rapport à toutes les autres moisissures où l'inhibition à 100 % a été atteinte à 5µg/ml mais vue la dose administrée au milieu de culture, cette moisissure reste sensible à l'action de l'huile. Pour *Mucor*, *Alternaria* et *Trichoderma* toutes les trois se sont inhibées à la dose de 4 µg/ml, alors que *Penicillium* a été inhibé à 4.5 µg/ml. L'activité de cette huile sur les moisissures tests est de nature fongistatique, que nous l'avons prouvé expérimentalement (Tableau 3).

Tableau 1

Composition chimique de l'huile essentielle

Les composés	RI	Proportion (%)
α-pinène	931	0.5
camphène	942	1.3
delta-3-carène	1005	0.9
NI	1008	0.5
p-cymène	1011	0.8
cinéole	1021	18.9
Fenchone	1069	27.6
Fenchol	1098	0.7
Camphre	1122	18.1
NI	1128	0.4
NI	1138	0.8
Borneol	1148	0.6
NI	1154	2.1
NI	1158	1.4
NI	1180	1.1
acétate de Bornyl	1269	3.2
NI	1274	-
NI	1304	0.8
NI	1357	0.8
NI	1582	1.9
Viridiflorol	1593	1.1
NI	1826	1.8

RI : Indice de rétention

NI : Composé non identifié

Tableau 2

Effet de l'huile essentielle de *L. stoechas* sur la croissance des moisissures (diamètre moyen ± écart type en mm)

[ ] µg/ml	0 (Témoin)	0.2	0.4	0.8	1.6	4	4.5	5
<b>Les souches</b>								
<i>Rhizopus stolonifer</i>	80 ± 0.0	80 ± 0.0	68.7 ± 0.6	34.2 ± 0.3	0	0		
<i>Mucor spp</i>	64.7 ± 0.6	41.7 ± 2.5	37.3 ± 0.6	38.3 ± 2.9	14.7 ± 0.6	0		
<i>Trichoderma spp</i>	80 ± 0.0	77.7 ± 2.5	56.7 ± 1.5	28.7 ± 1.5	11 ± 0.0	0		
<i>Alternaria spp</i>	44 ± 2.6	30 ± 1.0	32.2 ± 0.8	21.8 ± 1.0	10 ± 0.0	0		
<i>Aspergillus flavus</i>	39.7 ± 2.1	37.3 ± 0.6	32.7 ± 2.1	26.2 ± 0.8	15.5 ± 5.0	9 ± 1.0		0
<i>Fusarium spp</i>	20.3 ± 1.2	32 ± 1.0	20.5 ± 0.5	15.2 ± 0.3	0	0		
<i>Penicillium spp</i>	23.2 ± 4.4	26.3 ± 1.0	20.7 ± 0.6	13 ± 2.0	11.7 ± 0.6	6 ± 0.0	0	

(T) : Témoin constitué de milieu PDA sans huile essentielle.

Tableau 3

Résultat du test fongistatique / fongicide

Durée (heures)	24	48	72	96	120
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+	+	+	+	+
<i>Mucor spp</i>	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma spp</i>	-	+	+	+	+
<i>Alternaria spp</i>	-	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	+	+	+	+
<i>Fusarium spp</i>	-	+	+	+	+
<i>Penicillium spp</i>	-	+	+	+	+

+ : croissance

- : absence de croissance

L'huile essentielle de *L. stoechas* présente des effets bénéfiques contre le stress [13]. Une réduction de l'absorbance du DPPH en solution est observée avec l'augmentation de la dose de l'huile essentielle et l'antioxydant standard (fig. 1a, 1b et 1c). Les extraits ont manifesté un pouvoir antioxydant en piégeant les molécules du radical libre DPPH mais cette capacité est

d'une puissance accrue avec l'acide ascorbique, alors que l'huile essentielle, la capacité est faible en comparaison avec les standards. Les valeurs EC50 déterminées en µg/ml expriment la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de moles de DPPH en dissolution dans du méthanol (Tableau 4).

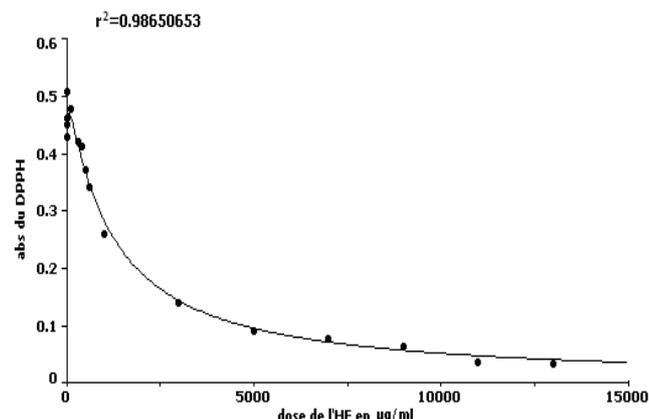


Fig. 1a : réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'huile essentielle de *L. stoechas*

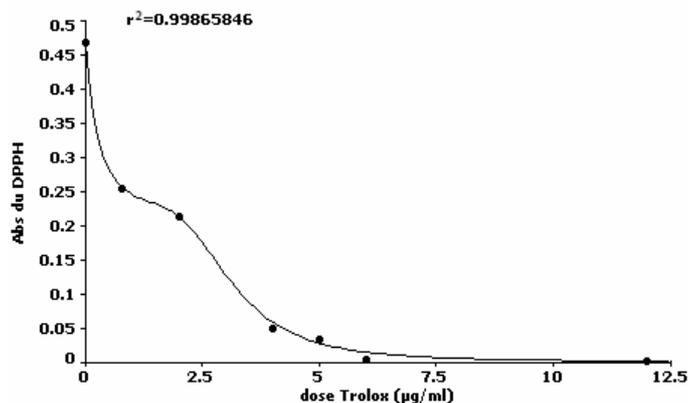


Fig. 1b : réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose du Trolox

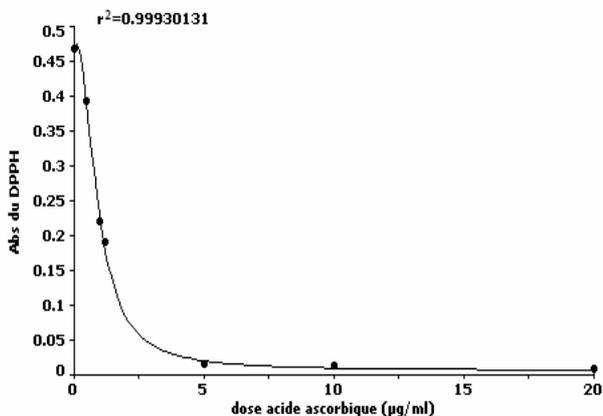


Fig. 1c : réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'acide ascorbique

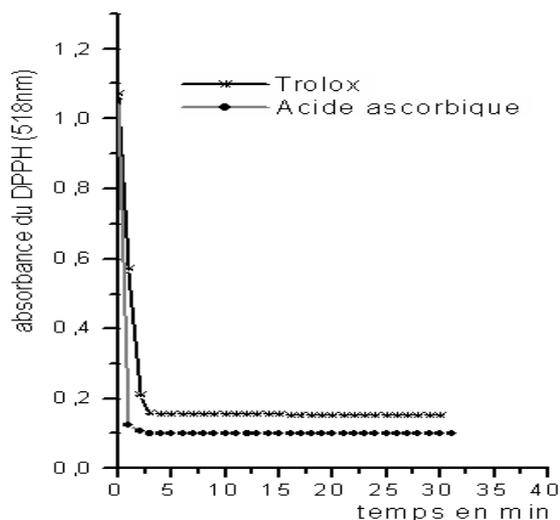


Fig. 5b: Cinétique de la réaction de réduction du DPPH (standards)

Tableau 4

Résultat du test Antioxydant exprimant la concentration efficace 50% en µg/ml

Extrait/substance chimique	EC50 ± écart type
Huile Essentielle des feuilles de <i>L. stoechas</i>	1852.76 ± 55.749
Acide ascorbique	1.04 ± 0.1361
Trolox	2.06 ± 0.1360

Selon les résultats enregistrés, l'huile de *Lavandula* est dotée d'un pouvoir antioxydant mais reste d'une efficacité très distante aux standards où EC50 est en moyen de 1.85 mg/ml alors qu'avec l'acide ascorbique, une puissante activité de l'ordre de quelques microgrammes a été enregistrée dont l'EC50 est de 1.04 µg/ml. De même, le suivi de la cinétique de la réaction de réduction du DPPH en solution dans le temps (fig. 5a et 5b) nous renseigne sur l'efficacité et la puissance de l'agent antioxydant.

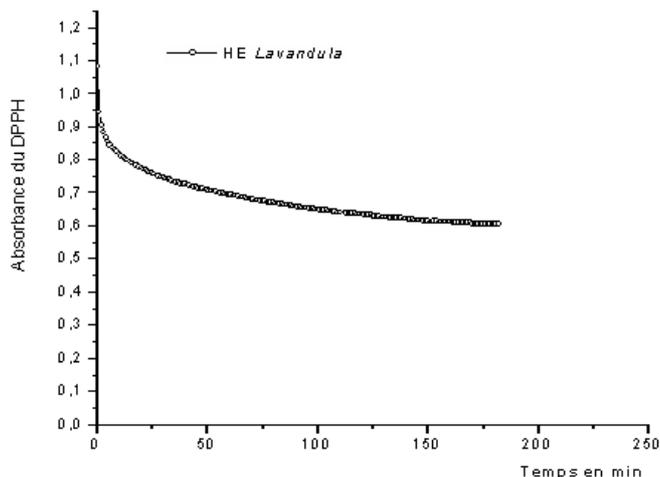


Fig.5a: Cinétique de la réaction de réduction du DPPH (huile essentielle)

Pour les antioxydants standards : l'acide ascorbique et le trolox, la réaction est rapide et instantanée, le changement de couleur, qui exprime le passage du DPPH de forme radical (DPPH•) à la forme réduite stable non radical (DPPH-H) se fait dans un laps de temps extrêmement court où l'état d'équilibre est atteint immédiatement et la réduction est presque complète. Pour l'acide ascorbique, l'état d'équilibre est atteinte à 2 min ; le trolox à 3 min, alors pour l'huile essentielle, la réaction est lente et nécessite un temps prolongé pour atteindre l'état d'équilibre. En comparant les résultats obtenus avec les huiles de *Lavandula* et les standards, on classe l'activité et la puissance antioxydante suivant l'ordre :

Acide ascorbique > Trolox >> H.E. *Lavandula stoechas*

#### 4. Conclusion

Les huiles essentielles de *L. stoechas* sont des antifongiques naturels très efficaces et peuvent être une source très importante de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer les infections d'origine fongique. Malgré l'activité faible par rapport à l'antioxydant le plus puissant des milieux aqueux ; l'acide ascorbique, l'huile essentielle peut être employé comme complément antioxydant vue sa liposolubilité. De même, il serait intéressant d'envisager l'utilisation de cette huile pour protéger les silos de céréales contre une dégradation par les champignons contaminants au cours de leur conservation.

#### Remerciement

On remercie profondément, le professeur J. Casanova (université de Corse) pour son aide à la réalisation des

analyses de la composition chimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas*.

## Références

- [1] Allaby M. (1992) The Concise Oxford Dictionary of Botany, Oxford University Press.
- [2] Barrett P. (1996) Growing and using lavender. a Storey Country wisdom bulletin. US.
- [3] Chu C. J. et Kemper K. J. (2001) Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force. 32p.
- [4] Esiyok D. et al. (2004) Herbs as a Food Source in Turkey. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 5, 334-339.
- [5] Garcia Vallejo M. C., Garcia Vallejo I. et Valasco Negueruela A. (1989) Essential Oils of Genus *Lavandula* L. in Spain 11TH International Congress of Essential Oils. Fragrance and Flavour. New Delhi. 4, 15-26.
- [6] Gören A. C., Topçu G., Bilsela G., Bilsela M., Aydoğmuş Z. et Pezzuto J. M. (2002) The Chemical Constituents and Biological Activity of Essential Oil of *Lavandula stoechas* ssp. *Stoechas*. Z. Naturforsch. 57c, 797-800.
- [7] Kokkalou E. (1988) The constituents of the essential oil from *Lavandula stoechas* growing wild in Greece. *Planta Medica*. 54, 58-59.
- [8] Leitão G. G., Leitão S. G. et Vilegac W. (2002) Quick Preparative Separation of Natural Naphthopyranones with Antioxidant Activity by High-Speed Counter-Current Chromatography. Z. Naturforsch. 57c, 1051-1055.
- [9] Maganga A. (2004) Influence of Variety and Organic Cultural Practices on Yield and Essential Oil Content of Lavender and Rosemary in Interior BC. (STOPA). Ecorational Technologies. Kamloops. BC. 23p.
- [10] Quezel P. et Santa S. (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. C.N.R.S. Paris.
- [11] Sharma S. D., Bhan M. K., Kaul M. K. et Dhar P. L. (1983) Morphological and oil content variation in Lavender introduced in Kashmir. *Indian Perfumery*. 27, 28-31.
- [12] Skoula M., Abidi C. et Kokkalou E. (1996) Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*. 24 (3), 255-260.
- [13] Tisserand R. (1992) Success with stress. *International journal of Aromatherapy*. 4, 14-16.
- [14] Tomi F. et Casanova J. (2000) Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 93, 313-330.
- [15] Upson T. M., Grayer R. J., Greenham J. R., Williams C. A., Al-Ghamdi F. et Chen F. H. (2000) Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28, 991-1007.