

Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques marocaines

[Study of the antifungal activity of essential oils of three moroccan aromatic plants]

Rachid Ismaili, Abdeslam Lamiri, and Khadija Moustaid

Laboratoire de Chimie appliquée et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques,
Université Hassan1 Km 3, B.P. 577, Settat, Maroc

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The work we have done has been devoted to study the antifungal activity of essential oils of three moroccan aromatic and medicinal plants towards of three strains of dermatophytes responsible for superinfection of a contact dermatitis. The essential oils of the three plants studied: *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata* and *Citrus limonum*, showed significant inhibitory activities on the three fungi tested. The antifungal activity is linked to inhibition of mycelial growth with particularly high concentrations of essential oils. Thus, the essential oil of *Thymus vulgaris* showed the greatest activity against dermatophytes compared to other oils. According to their sensitivity, the *Trichophyton mentagrophytes* species showed a high sensitivity to essential oils more than other dermatophytes.

KEYWORDS: *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Mentha spicata*, essential oil, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, the antifungal activity.

RESUME: Le travail que nous avons réalisé a été consacré à l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques et médicinales marocaines vis-à-vis de trois souches de dermatophytes responsables de la surinfection de l'eczéma de contact. Les trois essentielles des plantes étudiées : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata* et *Citrus limonum*, présentent des activités inhibitrices significatives sur les trois champignons testés. Cette activité antifongique est liée à l'inhibition de la croissance mycélienne notamment avec de fortes concentrations en essentielles. Ainsi, l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* a montré l'activité la plus élevée contre les dermatophytes par rapport à celle des deux autres huiles. Selon leur sensibilité, l'espèce *Trichophyton mentagrophytes* a montré une sensibilité aux huiles essentielles plus importante que les autres dermatophytes.

MOTS-CLES: *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Mentha spicata*, huile essentielle, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, l'activité antifongique.

1 INTRODUCTION

Historiquement, l'homme a utilisé son environnement et en particulier les plantes médicinales pour traiter différentes maladies. On estime que les deux tiers des médicaments actuels sont d'origine naturelle, obtenue par hémisynthèse ou par modification d'un produit naturel et seulement un tiers des médicaments commercialisés ont une origine purement synthétique.

Le Maroc est doté d'une biodiversité végétale, avec un très grand nombre de plantes utilisées comme herbes, et à des fins thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles ont été identifiées et beaucoup d'entre elles sont utilisées en

médecine traditionnelle, pour la prophylaxie et pour le traitement des maladies. Des études récentes ont montré que les HES et leurs constituants ont un potentiel considérable en tant qu'agent antimicrobien et elles sont utilisées dans de nombreux domaines [3], [7].

Les HES ont trouvé leur place dans l'aromathérapie, la pharmacie, la parfumerie, la cosmétique et la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leur large spectre d'activités biologiques [14], [5], [6], [13], [12], [4]. L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité antifongique des HES de trois plantes aromatiques Marocaines: *M. spicata*, *T. vulgaris* et *C. Limonum* vis-à-vis de trois souches de dermatophytes: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, et *Epidermophyton floccosum*.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les plantes médicinales testées ont été recueillies dans différentes régions du Maroc. Les échantillons de *T. vulgaris* ont été récoltés dans la province de Tafilelt, ceux du *C. limonum* dans la province d'Agadir et ceux du *M. spicata* dans la province de Settat (Guisser). Le choix de ces plantes médicinales, a été pris à la suite d'une enquête et étude statistique menée dans différentes villes du Royaume. Les échantillons de la partie aérienne ont été utilisés pour l'extraction des HES.

2.2 MODÈLE BIOLOGIQUE

Le choix des souches fongiques: *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* et *E. floccosum* comme modèle pour l'étude est basé sur le fait que ces souches sont le plus souvent associées à une surinfection de l'eczéma de contact.

2.3 MILIEUX DE CULTURE FONGIQUE

Pour réaliser notre étude, nous avons utilisé deux types de milieu de culture:

2.3.1 MILIEU SABOURAUD [19]

Les souches fongiques sélectionnées ont été cultivées sur milieu Sabouraud afin d'avoir suffisamment de spores. La composition de ce milieu (pour 1 litre) est:

- Peptone 10 g
- Glucose massé 20 g
- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml
- Vitamines et facteurs de croissance
- pH = 6

2.3.2 MILIEU DEXTROSE DE POMME DE TERRE [2]

La culture finale des souches a été effectuée sur de l'agar de dextrose de pomme de terre contenant les HES à des proportions différentes. Ce milieu de culture a été préparé de la manière suivante:

L'infusion de pomme de terre a été préparée en faisant bouillir 200 g de tranches de pommes de terre (lavées mais non pelées) dans un litre d'eau pendant 30 minutes à 1 heure. Le filtrat du bouillon résultant est ensuite dilué avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final d'un litre. On y ajoute 20 g de dextrose et de gélose sous forme de poudre avant de stériliser à l'autoclave à 100 kPa pendant 15 minutes.

2.4 EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

L'extraction des HES a été réalisée par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger. Les rendements en HES ont été déterminés par rapport à la matière sèche, estimée à partir d'échantillons séchés pendant trois jours à température ambiante. Les HES obtenues ont été stockées à 4°C dans un réfrigérateur jusqu'à l'analyse.

2.5 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CPG/SM)

Les HEs ont été caractérisées en utilisant un chromatographe en phase gazeuse « Trace GC Ultra » équipé d'un auto-injecteur « Triplus » directement interfacé avec un spectrophotomètre de masse muni d'un détecteur à ionisation de flamme (Pdains Q), d'une colonne capillaire DB-5 (à 5% de diphényle et 95% de diméthylpolysiloxane) de 30 m de longueur et 0,25 mm d'épaisseur. La température du four a été programmée comme suit : 50 ° C pendant 2 min, ensuite un gradient de 5 ° C / min jusqu'à 200 ° C. La température du détecteur est maintenue à 220 ° C. Le volume injecté est de 0,1µl. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1,4 ml.min⁻¹.

2.6 TECHNIQUE D'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE [18], [21], [22], [23]

Pour évaluer l'activité antifongique des trois HEs, nous avons adopté la technique de contact direct sur gélose. Les champignons ont été cultivés sur milieu Sabouraud afin d'avoir suffisamment de spores. La culture finale des souches fongiques a été réalisée sur de l'agar de dextrose de pomme de terre (PDA) supplémenté d'huiles essentielles à différentes proportions. Les huiles essentielles ont été utilisées sous forme d'émulsions pour pouvoir être manipulées comme des solutions. L'agar-agar à 0,2 % a été choisi comme agent émulsionnant à la place du Tween 80 du fait qu'il est dépourvu de toute influence sur l'activité des HEs. Les différentes dilutions ont été préparées dans une solution d'agar dans l'eau distillée stérile pour obtenir différentes concentrations en HEs, puis elles étaient rajoutées au milieu de culture dextrose agar contenu dans les tubes.

La solution mère d'huile essentielle doit être au 1/10 et elle a été préparée dans une solution d'agar 0,2 %. À partir des différents tubes contenant des concentrations différentes en HEs, nous avons prélevé 2 ml qu'on a rajouté aseptiquement à 18 ml du milieu dextrose agar. Ainsi, nous avons obtenu différentes concentrations en HEs. Les tubes sont agités au Vortex puis le contenu est coulé dans les boîtes de Pétri. Les concentrations finales obtenues (V/V) d'HEs sont représentées dans le tableau 1.

Tableau 1. Les différentes concentrations en HEs dans les milieux de culture

N° du Tube	Concentration en HEs (%)
S0	10
S1	4
S2	2
S3	1
S4	0,1
S5	0,01

L'ensemencement a été réalisé en utilisant une pipette Pasteur au niveau de la surface du substrat. L'inoculum se présente sous forme d'une suspension dans l'eau physiologique de spores provenant d'une culture de sept jours dans le PDA. Chacune des boîtes a étéensemencée par trois espèces différentes qui ont été testées préalablement par d'autres auteurs quant à l'absence d'effets antagonistes entre elles. Enfin, l'incubation a été réalisée à température ambiante pendant quinze jours. La température d'incubation est de 25°C. Chaque essai est répété trois fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 LES RENDEMENTS EN HUILES ESSENTIELLES

Le tableau 2 montre les rendements en huiles essentielles des trois plantes étudiées.

Tableau 2. Rendements en huiles essentielles des trois plantes aromatiques

Plantes médicinales	Rendements (%)
<i>Citrus limonum</i>	0.75
<i>Mentha spicata</i>	0.72
<i>Thymus vulgaris</i>	0.65

3.2 PRINCIPAUX COMPOSANTS CHIMIQUES DES TROIS HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) afin d'identifier leurs principaux composants chimiques. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 3, 4 et 5.

Tableau 3. Principaux composants chimiques de l'huile essentielle du *M. spicata*

Principaux composants chimiques	Composition en pourcentage massique (%)
<i>Alphapinène</i>	0.32
<i>Sabinène</i>	0.32
<i>Bétapinène</i>	0.60
<i>Myrcène</i>	0.38
<i>Limonène</i>	9.14
<i>1,8 cinéole</i>	3.80
<i>Linalol</i>	0.21
<i>Alphaterpinéol</i>	1.98
<i>Cis carvéol</i>	1.17
<i>Carvone</i>	57
<i>Pipériténone</i>	0.14
<i>Bétaborbonène</i>	2.79
<i>Bétacaryophyllène</i>	2.96
<i>Germacrène-D</i>	8,12
<i>Delta cadinène</i>	0.29
<i>Oxyde de caryophyllène</i>	0.65

Tableau 4. Principaux composants chimiques de l'huile essentielle du *C. limonum*

Principaux composants chimiques	Composition en pourcentage massique (%)
<i>Alpha pinène</i>	2.66
<i>Alpha thujène</i>	2.66
<i>Bétapinène</i>	13.80
<i>Sabinène</i>	2.17
<i>Myrcène</i>	1.59
<i>Limonène</i>	66
<i>Bétaphellandrène</i>	0.29
<i>Gamaterpinène</i>	9,10
<i>Para cymene</i>	0.76
<i>Citronellal</i>	0.06
<i>Linalol</i>	0.15

Tableau 5. Principaux composants chimiques de l'huile essentielle du *T. vulgaris*

Principaux composants chimiques	Composition en pourcentage massique (%)
<i>Bornéol</i>	5,1
<i>Terpinène-4-ol</i>	1.4
<i>Alphaterpinèol</i>	0.5
<i>Thymol</i>	42
<i>Carvacrol</i>	2.4
<i>Alphapinène</i>	1.2
<i>Camphène</i>	1.2
<i>Sabinène</i>	0.6
<i>Myrcène</i>	0.4
<i>p-Cymène</i>	23.7
<i>Gamaterpinène</i>	15.5

Les résultats de l'analyse des trois huiles essentielles sont globalement en accord avec la littérature [10], [8], [16], on note une légère différence dans la composition chimique des principaux composants, ceci peut être dû à des facteurs abiotiques tels que le climat spécifique des régions d'origine des échantillons, des facteurs géographiques comme l'altitude, le type de sol et la saison de la cueillette.

3.3 ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

Pour évaluer l'activité antifongique des trois huiles essentielles, nous avons adopté la technique de contact direct sur gélose. Les résultats ont montré que les HES ont une activité significative contre les dermatophytes testés. Les trois champignons ont continué de croître sur les milieux sans essences et aussi sur les milieux dont la concentration en HES est de 0,01%.

- L'HEs de thym inhibe complètement la croissance des dermatophytes à des concentrations égales ou supérieures à 2% ;
- L'HEs de la menthe inhibe totalement la croissance à des concentrations égales ou supérieures à 4% ;
- L'HEs du citron inhibe la croissance de la totalité des dermatophytes à des concentrations égales ou supérieures à 10%.

Les tableaux 6, 7 et 8 résument les résultats de l'inhibition de la croissance des dermatophytes par les HES. Ainsi, en fonction de leur sensibilité, l'espèce *T. mentagrophytes* a montré la sensibilité la plus importante par rapport aux autres dermatophytes étudiés, tandis que la souche *E. floccosum* a montré une sensibilité plus faible aux HES.

Tableau 6. Activité d'inhibition de l'HE du thym sur la croissance des dermatophytes

Concentration en HE (%)	0,01	0,1	1	2	4	10	Témoin
Dermatophytes							
<i>T. rubrum</i>	+++	-	--	---	---	---	+++
<i>T. mentagrophytes</i>	+++	-	---	---	---	---	+++
<i>E. floccosum</i>	+++	+++	--	---	---	---	+++

Tableau 7. Activité d'inhibition de l'HE de la menthe sur la croissance des dermatophytes

Concentration en HE (%)	0,01	0,1	1	2	4	10	Témoin
Dermatophytes							
<i>T. rubrum</i>	+++	+++	--	--	---	---	+++
<i>T. mentagrophytes</i>	+++	-	-	--	---	---	+++
<i>E. floccosum</i>	+++	+++	--	--	---	---	+++

Tableau 8. Activité d'inhibition de l'HE du citron sur la croissance des dermatophytes

Concentration en HE (%)	0,01	0,1	1	2	4	10	Témoin
Dermatophytes							
<i>T. rubrum</i>	+++	+++	-	-	--	---	+++
<i>T. mentagrophytes</i>	+++	-	--	--	--	---	+++
<i>E. floccosum</i>	+++	+++	+++	-	--	---	+++

- : inhibition faible; -- : inhibition moyenne ; --- : inhibition forte; +++ : forte croissance.

Plusieurs études ont été effectuées sur l'activité antifongique des HEs de *T. vulgaris*, *M. spicata* et *C. limonum* [1], [9], [17], [20]. Cependant, rares sont ceux qui ont été consacrés à leur activité contre les dermatophytes responsables de la surinfection de l'eczéma de contact.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré une inhibition significative des HEs sur la croissance des dermatophytes. L'HE du thym a montré l'activité la plus élevée par rapport à celle des deux autres espèces, cette activité antifongique est liée à la substance active: thymol. Tandis que l'HE du citron a montré l'activité la plus faible. Ces résultats sont cohérents avec la classification établie par plusieurs auteurs [11], [15].

L'évaluation de l'activité antifongique de ces HEs a montré que les variations d'inhibition est en fonction de nombreux facteurs, notamment la nature et la concentration de l'huile essentielle, ainsi que la souche fongique étudiée. Ainsi, les différences observées entre les activités antifongiques des différentes HEs étudiées peuvent être attribuées à des différences dans leurs fractions actives. En outre, les concentrations d'HEs nécessaires pour inhiber la croissance sont très faibles. Cependant, il convient de noter qu'il existe une sensibilité différentielle des dermatophytes testés vis-à-vis des trois HEs étudiées.

4 CONCLUSION

Ce travail a été consacré à l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques et médicinales marocaines vis-à-vis de trois souches de dermatophytes impliqués dans la surinfection de l'eczéma de contact. Les trois huiles essentielles testées présentent des activités inhibitrices significatives sur la croissance des dermatophytes testés.

Toutefois, les différences entre les résultats peuvent être expliquées par la composition des huiles essentielles et la nature des dermatophytes. Sur la base de l'efficacité contre les souches fongiques, le thym a montré l'efficacité la plus élevée par rapport aux autres plantes étudiées.

REFERENCES

- [1] BENJILALI B, TANTAOUI-ELARAKI A, ISMAÏLI-ALAOUI M, ET AL. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie* 20 (2): 155-67.
- [2] *Bacteriological Analytical Manual*, Potato Dextrose Agar, 8th Edition, Revision A, 1998. Food and Drug Administration (États-Unis).
- [3] BASER (K.H.C.), DEMIRCI (B.), DEMIRCI (F.), KOÇAK (S.), AKINCI (Ç.), MALYER (H.), GULERYIIZ (G.) - Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. - *Planta Med.*, 2002, 68(10), 941-943.
- [4] CIMANGA K. & AL., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacology*, 79, 213-220.
- [5] CACCIONI D.R.L. & GUIZARDI M., 1994. Inhibition of germination of fruit and postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *J. Essent. Oil Res.*, 6, 173-179.

- [6] COWAN M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 564-582.
- [7] DORMAN (H.J.D.), & DEANS (S.G.) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. - *J. Appl. Microbiol.*, 2000, 88, 308-316.
- [8] G. BERTUZZI, B. TIRILLINI, P. ANGELINI AND R. VENANZONI (2012). Antioxidative action of Citrus limonum. 3(1): 1-9.
- [9] GUELDNER RC, WILSON DM, HETDT A (1985). Volatile compounds inhibiting *A. flavus*. *J Agric Food Chem* 33: 441-3.
- [10] HABIBA BOUKHEBTI, ADEL NADJIB CHAKER, HANI BELHADJ, FARIDA SAHLI, MESSAOUD RAMDHANI, HOCINE LAOUER & DAOUD HARZALLAH, 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. 3 (4) 267-275.
- [11] KURITA N, MIYAJI M, KURANE R, ET AL. (1979). Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agric Biol Chem* 43: 2365-71.
- [12] LAMIRI A., LHALOUI S., BENJILALI B. & BERRADA M., 2001. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola Destructor* (Say). *Field Crops Res.*, 71, 9-15.
- [13] NIELSEN P.V. & RIOS R., 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food Microbiol.*, 60, 219-229.
- [14] PASTER N. & AL., 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on molds and foodborne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 11, 33-37.
- [15] LEE KA, HURANG ES, PIANTADOSI C, ET AL. (1971). Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones. *Cancer Res* 31: 1649-54.
- [16] M. BENAZZEDINE S. 2010. Insecticidal activity of five essential oils against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera; Curculionidae) et *Tribolium confusum*.
- [17] PELLECUER J, ROUSSEL JC, ANDRARY C, ET AL. (1979). Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. *Rivista Italiana, EPPOS* 11: 10-1.
- [18] REMMAL A, TANTAOUI-EL ARAKI A, BOUCHIKHI T, ET AL. (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oil in Agar medium. *J Essenti Oils Res* 5: 179-84
- [19] SABOURAUD, R. 1892. *Ann. Dermatol. Syphilol.* 3:1061.
- [20] THOMPSON DP (1986). Effect of essential oils on spore germination of *Rhizopus*, *Mucor* and *Aspergillus* species. *Mycologia* 78 (3): 482-5.
- [21] FARAH A., B. SATRANI, M. FECHTAL, A. CHAOUCH & M. TAIBI, (2001). Chemical composition, antibacterial and antifongic activities of essential oils from *Eucalyptus camaldulensis* and its natural hybrid leaves (clone 583). *Acta Botanica Gallica*, 148 (3), 183-190.
- [22] REMMAL A, TANTAOUI-EL ARAKI A, BOUCHIKHI T, ET AL. (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oil in Agar medium. *J Essenti Oils Res* 5: 179-84.
- [23] D. OURAÏNI, A. AGOUMI, M. ISMAÏLI-ALAOUI, K. ALAOUI, Y. CHERRAH, M.AMRANI , M.-A. BELABBAS. (2005). Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes.