

Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus Nobilis* et *Lavandula Angustifolia*

Kamal ELHARAS¹, Abdelmoula DAAGARE², Abdelhalem MESFIOU¹ et Mohammed OUHSSINE³

¹Unité de Physiologie Nerveuse et Endocrinienne, Laboratoire de Génétique et de Physiologie Neuroendocrinienne, Département de Biologie, Faculté des Sciences.

Université Ibn Tofail, 14000 Kenitra, Maroc

²Laboratoire de Génétique et Biométrie, Département de biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, BP 133, 14000 Kenitra, Maroc

³Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Qualité, Département de Biologie, Faculté des Sciences. Université Ibn Tofail, 14000 Kénitra, Maroc.

* Correspondance, courriel : Kelharas@yahoo.fr

Résumé

Les huiles essentielles des fleurs de *Lavandula officinalis* et les feuilles de *Laurus nobilis* inhibent la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Les CMI sont de 200 µL/mL pour le laurier noble et 500 µL/mL pour la Lavande. L'inhibition est plus faible pour *Escherichia coli* ATCC25921 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC29733.

Mots-clés : *huile essentielle, laurier noble, lavande, activité antibactérienne.*

Abstract

Antibacterial activity of essential oil of inflorescence laurus nobilis and lavandula angustifolia

Essential oils of flowers of *lavandula officinalis* and leaves of *laurus nobilis* inhibit the increase of *staphylococcus aureus* ATCC25923. The CMI are 200 µL/mL for the laurel and 500 µL/mL the lavender. The inhibition is weaker for *Escherichia coli* ATCC25921 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC29733.

Keywords : *essential oils, laurel, lavender, antibacterial activity.*

1. Introduction

Sur plusieurs centaines d'espèces médicinales et aromatiques disponibles au Maroc, seulement quelques dizaines sont exploitées [1] à des fins culinaires, pharmaceutiques et thérapeutiques, surtout dans les zones rurales. Pourtant, il serait nécessaire de développer leur utilisation contre les infections microbiennes en raison de l'émergence des infections nosocomiales et des multirésistances des microorganismes.

La Lavande officinale ou Lavande vraie, est une plante à feuilles étroites. Son nom latin est *Lavandula angustifolia* L. ou *L. officinalis* Chaix = *L. vera* DC. Elle connue en arabe sous le nom de « *huzâma* ». C'est une Lamiacée aromatique, elle est utilisée traditionnellement dans la lutte contre les insectes, l'aromatisation des eaux de boisson et la production de détergents [2-3]. Le Laurier sauce, Laurier noble, *Laurus nobilis* L., ou « a'sâ sîdnâ mûsâ » est une Lauracée méditerranéenne. Elle pousse spontanément au nord du Maroc. Outre ses propriétés médicinales, elle est appréciée par sa capacité à conserver les olives, à préparer des repas à base de viande ou de poisson. Le tagine marocain en est un exemple [3]. A coté de ces propriétés intrinsèques, nous avons essayé à travers le présent travail de vérifier leurs effets antimicrobiens sur trois microorganismes pathogènes très répandues chez les malades de la ville de Kénitra au Maroc.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal n°1

Les fleurs de Lavande *angustifolia* L, ont été récoltées d'un site forestier près d'une lagune connue communément au Maroc sous le nom de Dayat Awa. Ce dernier est à 23 km de la ville d'Ifrane.

- *Echantillonnage*

L'échantillonnage a été effectué pendant le mois de juillet (période de pleine floraison) à partir de 17 heure. Après récolte, les fleurs sont séparées minutieusement du reste de la plante. Elles sont nettoyées puis laissées sécher à l'ombre pendant 9 jours. Suite à cela, 100g des fleurs séchées sont introduites dans un hydrodistillateur (type Clevenger) et laissées distiller pendant 3 heures [4]. Période correspondant à trois cycles de répétitions. Le distillat est entraîné au fond à l'aide d'une ampoule à décanter. La phase organique ainsi obtenue est séchée à l'aide du sulfate du sodium anhydre. L'huile obtenue est conservé dans un réfrigérateur à 5°C.

2-2. Matériel végétal n°2

La plante utilisée à ce niveau est le Laurier sauce. La partie végétale choisie pour l'extraction est les feuilles. Ces dernières ont été récoltées à partir d'un site forestier connu sous le nom de Moulay Abdessalam à 64 km de Tétouan, au Nord du Maroc.

- *Echantillonnage*

L'échantillonnage est effectué pendant le mois de juin à partir de 17heure. Les feuilles sont séparées minutieusement de leurs pédoncules et nettoyées. Elles sont mises par la suite à sécher pendant 12 jours. Après séchage, 100g de feuilles séchées ont subit une hydrodistillation à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger. L'hydro-distillation est arrêtée après 4 heures telle qu'elle a été décrite par Sangun et al [5]. Temps pour le quel quatre cycles de répétitions sont accomplis.

La phase huileuse est séparée de l'aqueuse à l'aide d'une ampoule à décanter. La phase organique est séchée comme précédemment au dichlorure de calcium. Les huiles essentielles obtenues sont mises dans des tubes à vices opaques pour éviter les actions d'oxydation. L'ensemble est conservé dans un réfrigérateur à 4°C.

2-3. Microorganismes

Trois souches de bactéries ont été testées: *Escherichia coli* ATCC25921, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC29733 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

2-3-1. Confrontation bactérie – huile essentielle

Pour chaque essai, on utilise trois boîtes de Petri de 85 mm de diamètre préalablement stérilisées dans un autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Chaque boîte est remplie de 20 mL du milieu TSA (trypcase soja agar). 0,1 mL d'une suspension bactérienne pathogène, d'une unité d'absorbance, est étalé à la surface du milieu de culture pour obtenir une nappe bactérienne. Parallèlement, trois boules de coton de 0,5 mm de diamètre imbibées de l'une des deux huiles préalablement citée. L'incubation est réalisée pendant 24 heures à 37°C. Les auréoles d'inhibitions autour des cotons sont mesurées à l'aide d'une règle transparente au mm près. Chaque essai est répété trois fois et dans chaque essai trois boîtes de pétri sont préparées.

2-3-2. Détermination des CMI

La confrontation entre les souches testées et les huiles essentielles a donné un résultat prononcé avec la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Il en sort que les essais de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice des deux huiles seront limités à la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Le protocole adopté est le suivant :

- incorporation de la fraction de l'huile essentielle (50, 100, 200, 500 ou 1000 µL/L) dans 20 mL du milieu Chapman. Ce dernier est préalablement stérilisé et refroidi progressivement jusqu'à la température d'incorporation de 45°C ;
- ensemencement par une suspension bactérienne de 0,1 mL d'une culture jeune (absorbance d'une unité) ;
- incubation pendant 24 heures à température 37°C. La CMI est la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 24 heures [6 ; 7].

Chaque essai est répété trois fois et dans chaque essai trois boites de pétri sont préparées. La population de la culture jeune est déterminée par dénombrement sur le milieu Chapman. Et ce après la préparation d'une série de dilution allant de 10⁻¹ à 10⁻⁶. L'incubation est faite dans une étuve à température de 37°C pendant 24 heures. Deux séries de tubes à huiles essentielles sont préparés. La première série est soumise à la température de 105°C pendant 20 minutes. Pour le même temps de contact, la deuxième série de tubes est exposée à la température de 120°C. Le but de cette activité est d'évaluer l'efficacité du principe actif sur la croissance de la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 suite au traitement thermique. Les essais de traitement thermiques sont répétés trois fois et pour chaque test trois confrontations sont réalisées.

3. Résultats

Le volume moyen des deux huiles est de l'ordre de 1,5 ml pour 100 g de matière végétale sèche. Ce résultat est le constat des deux plantes étudiées. Pour ce qui est couleur, l'huile essentielle du laurier ne présente aucune couleur caractéristique. Tandis que la couleur de l'huile essentielle de la lavande est jaune claire à orange. Les huiles essentielles de *Lavandula angustifolia* et *Laurus nobilis* présentent un effet inhibiteur sur les trois souches testés (*Escherichia coli* ATCC25921, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC29733 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923). L'inhibition la plus importante est obtenue avec la souche *Staphylococcus aureus* ATCC25923. L'auréole d'inhibition est de 8,5 cm de diamètre pour les deux huiles. Les auréoles d'inhibition ne dépassent pas 2,51 cm de diamètre dans les autres essais (valeur la plus élevée de la moyenne des deux valeurs perpendiculaires que nous avons déterminé). Et ce pour les deux types d'huiles essentielles. Les souches impliquées dans l'évaluation de l'activité biologique des deux huiles sont : *Escherichia coli* ATCC25921 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC29733.

		
Figure 1 : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 Culture pure (témoin).	Figure 2 : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 Culture en présence de l'huile essentielle du Laurier	Figure 3 : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 Culture en présence de l'huile essentielle de la Lavande
		
Figure 4 : <i>Escherichia coli</i> ATCC25921 culture pure (témoin).	Figure 5 : <i>Escherichia coli</i> ATCC25921 culture en présence de l'huile essentielle du Laurier.	Figure 6 : <i>Escherichia coli</i> ATCC25921 culture en présence de l'huile essentielle de la Lavande.
		
Figure 7 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC29733 Culture pure (témoin)	Figure 8 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC29733 Culture en présence de l'huile essentielle de Laurier	Figure 9 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC29733 Culture en présence de l'huile essentielle de la Lavande.

Tableau 1 : Diamètre (cm) des zones d'inhibition de la croissance de trois souches bactériennes. Culture réalisée en présence des huiles essentielles des deux plantes étudiées.

Souches bactériennes	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC29733	<i>Escherichia coli</i> ATCC25921
<i>Laurus nobilis</i>	8,50 ± 0,0 cm	2,12 ± 0,083 cm	2,10 ± 0,086 cm
<i>Lavandula angustifolia</i>	8,50 ± 0,0 cm	2,51 ± 0,078 cm	1,94 ± 0,052 cm

3-1. Dénombrement de *Staphylococcus aureus* ATCC25923

Le dénombrement de la population de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 était dans le but de savoir le potentiel inhibiteur de chacune des deux huiles essentielles testées. Pour ce faire, nous avons réalisé un ensemencement en milieu Chapman solide. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **Tableau 2**. Le nombre, la taille et l'aspect de la colonie sont notés chaque fois que la boîte porte une information nette. La photo 10 en est un exemple.

Il se trouve que la souche *Staphylococcus aureus* ATCC25923, en absence de toutes contraintes : stress, inhibition... , elle pousse naturellement et donne naissance à une population de 10^7 ufc/mL. Qu'en est-il au point de vue comportement quand la population est soumise au contrôle des extraits des deux plantes étudiées (*Lavandula angustifolia* L et *Laurus nobilis*.L).

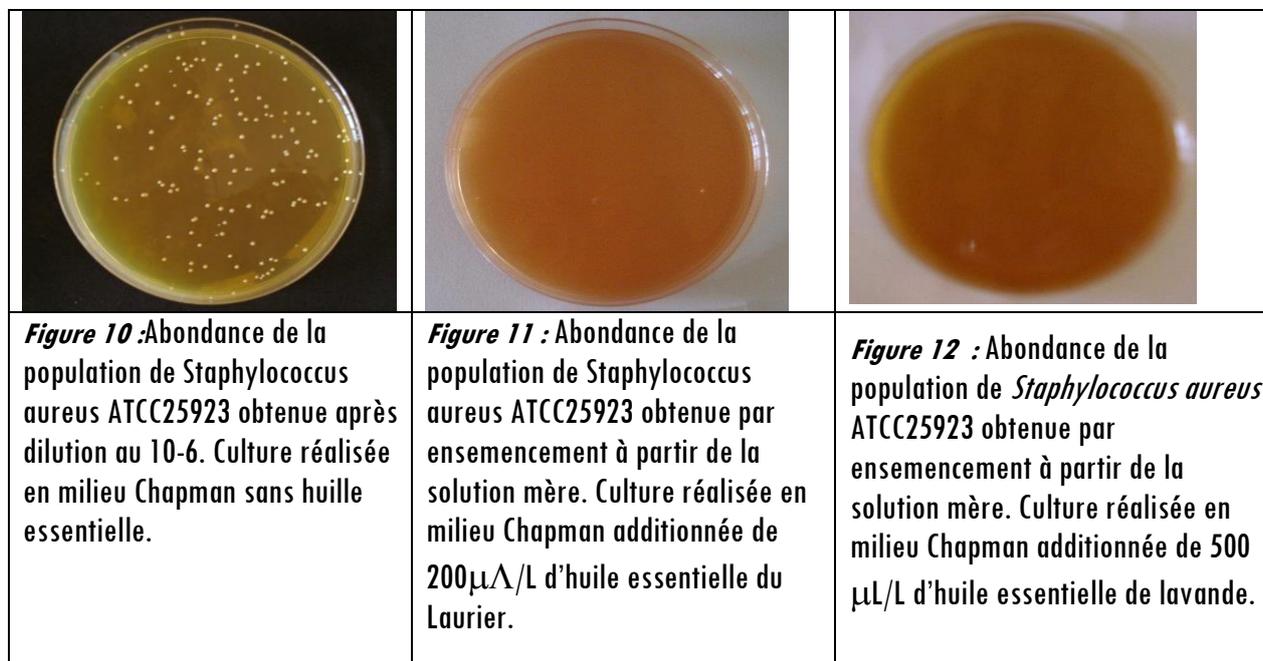


Tableau 2 : Nombre de colonies de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 en fonction de dilutions successives allant de 10-1 à 10-6 sur milieu Chapman après 24 heures à 37°C.

Dilutions	Témoin	Laurier			Lavande		
Volume d'huile ajouté (µL/L)	0	50	100	200	100	200	500
Abondance microbienne (ufc/mL)	10^7	534 ± 5.97	38 ± 3.60	0 ± 0	1071 ± 15.89	632 ± 4.44	0 ± 0

Les résultats de la confrontation de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 aux différentes concentrations de l'huile essentielle étudiée sont consignés au niveau des **Photos 11 et 12** et du **Tableau 2**.

Il sort des résultats obtenus que, à partir de la concentration de 200 µL/L de l'huile essentielle du *Laurus nobilis* et 500 µL/L de l'huile essentielle de la *Lavandula angustifolia*, la croissance la souche *Staphylococcus aureus* ATCC25923 est totalement inhibée. En conséquence, la CMI de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* et celle du *Laurus nobilis* sur la croissance *in vitro* de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 sont respectivement de 500 et 200 µL/L. Pour les deux huiles essentielles étudiées (*Lavandula angustifolia* et *Laurus nobilis*), nous remarquons que la couleur rose du milieu de culture persiste pour les concentrations inhibitrices de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Il n'en est pas de même pour les concentrations faibles. Le milieu de culture change de couleur pour se rendre au jaune.

3-2. Effet de la température sur l'inhibition bactérienne

Les résultats de la confrontation de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 aux différentes concentrations de l'huile essentielle étudiée sont consignés au niveau des **Photos 13 et 14** et du **Tableau 2**. Pour rappel, les huiles étudiées sont préchauffées pendant 20 minutes soit à la température de 105°C ou 120°C.

Les principes actifs contenus dans les deux huiles se trouvent altérés quand elles sont préalablement chauffées. Le constat est le même quelque soit la température (105 ou 120°C) (**Photos 13 et 14**).



Figure 13 : Abondance de la population de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 obtenue par ensemencement à partir de la solution mère. Culture réalisée en milieu Chapman additionnée de 200 µL/L d'huile essentielle du Laurier préalablement chauffée à 105°C pendant 20 minutes.



Figure 14 : Abondance de la population de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 obtenue par ensemencement à partir de la solution mère. Culture réalisée en milieu Chapman additionnée de 200 µL/L d'huile essentielle du Laurier préalablement chauffée à 120°C pendant 20 minutes.

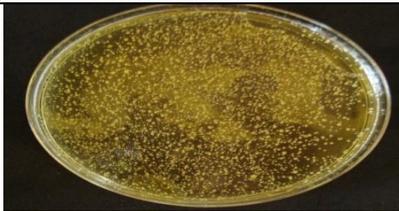


Figure 15 : Abondance de la population de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 obtenue par ensemencement à partir de la solution mère. Culture réalisée en milieu Chapman additionnée de 500 µL/L d'huile essentielle de la lavande préalablement chauffée à 105°C pendant 20 minutes.

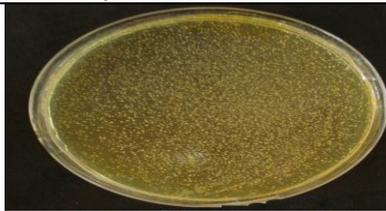


Figure 16 : Abondance de la population de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 obtenue par ensemencement à partir de la solution mère. Culture réalisée en milieu Chapman additionnée de 500 µL/L d'huile essentielle de la lavande préalablement chauffée à 120°C pendant 20 minutes.

4. Discussion

L'essence du *Laurus nobilis* et celle de *Lavandula angustifolia* sont rapportées dans notre travail comme étant des huiles essentielles actives. Il n'en est pas de même au niveau de certains travaux [8]. Cependant, selon d'autres auteurs l'huile essentielle de *Laurus nobilis* possède une forte activité antibactérienne [9]. Une activité qui a même inhibé la croissance de *Bacillus brevis* FMC 3, *Bacillus cereus* FMC 19, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Staphylococcus aureus* Cowan 1, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Candida tropicalis*. RE et al (1987) [10] en travaillant sur l'escargot, ont trouvé que l'huile essentielle de *Laurus nobilis* est efficace contre la croissance de *Biomphalaria glabrata*. L'inhibition est puissante. L'inhibition touche la croissance soit de l'individu à l'état embryonnaire (stade blastula) soit il provoque des malformations chez l'individu à l'état adulte.

Parallèlement, il a été déclaré que les huiles essentielles étudiées agissent comme des antioxydants [11, 12,13]. Elles possèdent également un pouvoir inhibiteur de l'activité enzymatique de l'acétylcholinesterase [14]. A ces effets s'ajoute pour *Lavandula angustifolia* le pouvoir d'accélérer l'élimination de la surcharge hydrique et l'augmentation de l'activité diurétique [15]. L'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* a été déclarée aussi comme étant une huile capable de diminuer l'osmolarité urinaire [15] ainsi qu'elle a un pouvoir antifongique très prononcé [16]. Cet effet a été constaté particulièrement chez *Botrytis cinerea conidia*. Sur la base de ce qui précède, nous pouvons confirmer l'utilisation des plantes testées à des fins alimentaires et médicales. Les huiles essentielles ne doivent pas être préchauffées, sinon aucune inhibition ne sera observée. Cette étude va nous encourager à chercher la molécule ou les molécules microbiologiquement actives.

5. Conclusion

Deux huiles essentielles ont été extraites de plantes marocaines (*Laurus nobilis* et *Lavandula angustifolia*). L'objectif est d'évaluer les potentialités relatives à chaque type d'huile. Nous nous sommes intéressés aux effets biologiques. Les tests sont réalisés sur trois souches dont *Escherichia coli* ATCC25921, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC29733 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Nous avons constaté que l'huile essentielle de Laurier noble est 2,5 fois plus active que celle de la Lavande. L'huile essentielle du *Laurus nobilis* et *Lavandula angustifolia* inhibe la croissance des trois souches bactériennes testées : *Escherichia coli* ATCC25921, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC29733 et *Staphylococcus aureus* ATCC25923. La souche bactérienne *Staphylococcus aureus* ATCC25923 est la plus sensible face aux deux autres espèces étudiées. En effet, la CMI du *Laurus nobilis* vis à vis d'elle est de 200 µL/L. Celle de *Lavandula angustifolia* est de 500 µL/L. Ces résultats sont très motivants. Ils nous ont ouvert la possibilité de chercher la ou les molécules responsables des inhibitions déclarées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Références

- [1] - M. Hmamouchi: Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc. In Heywood (V.H.), Skoula (M.) (Eds.) Identification of wild food and non-food plants of the Mediterranean region. Chania: CIHEAM-IAMC. (1997) 89-108 (= Cah. Options Médit., 23). <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c23/CI011066.pdf>.
- [2] - Jan volák et Jiří soldata: plantes médicinales, dixième édition. (1997) 319pp
- [3] - J. Bellakhdar: La pharmacopée marocaine traditionnelle. (1997) 764 pp.
- [4] - S. Ram Verma, U. Iaiq Rahman, S. Chandan Chanotiya, K. Rajesh Verma, S. Amit Chauhan, Anju Yadav, Anand Singh. and K. Ajai Yadav: Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India., Journal of the serbian chemical society. (2010) 75 (3): 343-348.
- [5] - Mustafa kemal sangun., Ebru Aydin., Mahir Timur., Hatice Karadeniz., Mahmut Caliskan and Aydin Ozkan.: composition of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves and fruit from different region of hatay, Turkey., journal of environmental biology. (2007) 28 (4) 731-733.
- [6] - F. Nejjah, M. Ouhssine, A. Srhiri, M. El Yachoui, Hajjani.: N - Activité inhibitrice de la N-hexadécylbétaine sur *Staphylococcus aureus*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, (2006) 145, 85-90.

- [7] - J.P. Ganière, C. Mangion, Péridy.: Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacine, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. - *Rev. Méd. Vét.*, (2004) 155 (8-9), 411-416.
- [8] - A. Hammer Katherine ., F. Carson Christine. and V. Riley Thomas: in vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia (tea tree)* oil and tea tree oil products, against *Candida spp.*, journal of antimicrobial chemotherapy. (1998) 42,591-995.
- [9] - Metin Diğrak., M. Hakki Alma and Ahmet İlçim: Antibacterial and Antifungal Activities of Turkish Medicinal Plants, *Pharmaceutical Biology*, (2001) 39 (5) 346–350.
- [10] - Liliane RÉ et Toshie Kawano,: effet of *Laurus nobilis* (lauraceae) on *Biomphalaria glabrata* (say,1818). Mem.inst.oswaldo cruz, Rio de janeiro, intern.symp. on Schistosomiasis.suppl.IV, (1987) 315-320.
- [11] - Filomena CONFORTI., Giancarlo STATTI., Dimitar UZUNOV. and Francesco MENICHINI.Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biol. Pharm. Bull.* (2006) 29 (10) 2056-2064.
- [12] - M. Elmastas, I. Gülçin, ö. IŞıldak, ö.l. küfrevioğlu, k. Ibaoglu and H.Y. Aboul-Enein.: radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts.,journal of the Iranian chemical society. (2006) 3 (3) 258-266.
- [13] - S. Dudonné, X.VITRAC., P. Coutière., M. WOILLEZ. AND J.M. Mérillon.: Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays., journal of agricultural and food chemistry. (2009) 57, 1768–1774
- [14] - A. Ferreira, C. Proenc , M.L.M. Serralheiro, M.E.M. Araujo: The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*. (2006) 108, 31–37.
- [15] - Mustapha Elhajili., Khadija baddouri., Saâd elkabbaj., Faïza meiouat.et abdellatif settaf: effet diurétique de l'infusion de fleurs de *Lavandula officinalis*-, , *reprod Nutr.dev.* (2001) 41,393-399.
- [16] - A. Antonov, A. Stewart and M. Walter: inhibition of conidium germination and mycelial growth of *botrytis cinerea* by natural products, 50th N.Z plant protection conf, (1997) 159-164.