



Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme (Chemical composition and effect of liquid and vapor phase of *Lavandula multifida* essential oil on mycelial growth of fungi responsible for the rot of apple)

A. Laghchimi¹, M. Znini¹, L. Majidi*¹, F. Renucci³, A. El Harrak⁴, J. Costa³

¹ Université My Ismail, Laboratoire des Substances Naturelles & Synthèse et Dynamique Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques, BP 509, 52003, Errachidia (Maroc). E-mail:

² Université de Corse, CNRS-UMR 6134, Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, BP 52, 20250 Corti (France).

³ Université My Ismail, Laboratoire de Protection & Amélioration et Ecophysiologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques, BP 509, 52000, Errachidia, Morocco

Received 4 June 2014; Revised 24 July 2014; Accepted 24 July 2014.

*Corresponding author. E-mail: lmajidi@yahoo.fr Tél : (212)535574497; Fax : (212)535574485

Résumé

Ce travail vise l'étude de la composition chimique et de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Lavandulamultifida* de Sud-Est Marocain vis-à-vis de trois champignons responsables de la pourriture des pommes en post-récolte selon deux méthodes : par contact direct en milieu gélosé et par micro-atmosphère. Cette espèce a fourni une huile essentielle avec un rendement de 2.4 %. Les analyses chromatographiques (CG et CG-SM) de cette huile ont permis d'identifier 28 constituants, représentant plus de 90% de la composition globale de l'huile essentielle, dont le carvacrol (57,9 %) est le constituant principal. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de *L. multifida* a manifesté une forte activité antifongique significative ($p < 0,05$) vis-à-vis des phytopathogènes testés. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile est de 0,125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'air contre les trois souches testées lors de l'utilisation de la méthode de microatmosphère. Par contre, les CMI sont de 0,125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour *Alternaria* sp., et de 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour *Penicillium expansum* et *Rhizopus stolonifer* lors de l'utilisation de la méthode de contact direct. Cette activité antifongique est due principalement à la richesse de cette essence en carvacrol connu pour son efficacité contre les agents microbiens.

Mots-clés. *Lavandulamultifida*, hydrodistillation, huile essentielle, composition chimique, activité antifongique, carvacrol, pommes.

Abstract

This work aims to study the chemical composition and the antifungal activity of *Lavandulamultifida* essential oil against three fungal decay of apples in postharvest according to two methods: by direct contact in agar medium and by micro-atmosphere. This species has provided an essential oil with a yield of 2.4%. The chromatographic analysis (GC and GC/MS) of this essential oil has identified 28 constituents, accounting more than 90 % in total oil, which carvacrol (57.9 %) was the most principal component. The results obtained showed that the essential oil has a significant inhibition of the mycelial growth of all strains ($p < 0.05$). The minimum inhibitory concentration (MIC) of this oil is 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of air against the three strains tested when using microatmosphere method. In contrast, MICs are 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for *Alternaria* sp., and 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer* when using the direct contact method. This antifungal activity is due mainly to the richness of this essential oil in carvacrol known for its effectiveness against the microbial agents.

Keywords. *Lavandulamultifida*, hydrodistillation, essential oil, chemical composition, antifungal activity, carvacrol, apples.

Introduction

La pomme (*Malus domestica*) est la troisième culture fruitière la plus cultivée dans le monde, après l'orange (*Citrus sinensis*) et la banane (*Musa paradisiaca*), avec une production totale de 59 059 millions de tonnes couvrant une superficie de 5280 millions d'hectares, en 2004, selon les chiffres de la FAO [1]. Toutefois, les pommes entreposées dans les frigos subissent malheureusement des détériorations suite aux problèmes phytosanitaires engendrant des pertes importantes, occasionnées essentiellement par des maladies d'origine

fongique, ce qui agit sur le prix de vente et la qualité des pommes. Ces agents fongiques, responsables de ces maladies, produisent également des mycotoxines qui peuvent être mutagènes, tératogènes [2].

Pour lutter contre les maladies des pommes en conservation, les fongicides synthétiques sont actuellement utilisés par les unités de conservation de ce fruit. Néanmoins, ces produits ne sont pas considérés comme solution à long terme en raison des risques d'intoxication et de la pollution de l'environnement. En effet, la persistance des résidus toxiques dans les pommes après traitement et le développement des souches résistantes, à ces composés, présentent la limite de leur emploi [3]. Par conséquent, la recherche d'une alternative à ces composés a incité plusieurs équipes de recherche à orienter leurs travaux vers la réduction de leur utilisation [4]. Récemment, l'utilisation des huiles essentielles constitue une alternative potentielle pour contrôler les phytopathogènes dans l'industrie alimentaire [2,5]. Cette orientation trouve son origine du fait que la production des huiles essentielles par les plantes est un moyen de défense contre les pathogènes et les radiations. D'où l'utilisation de ces extraits naturels comme agents antifongiques dans le domaine de la protection des fruits en post-récolte [2,5,6].

Lavandula multifida, de la famille des *Lamiacées*, est une plante vivace semi persistante dont les feuilles sont très multifides et composées de plusieurs petites feuilles [7,8]. Elle pousse spontanément dans le pourtour méditerranéen et l'Afrique tropicale où elle est principalement répartie dans les zones présahariennes de plus en plus sur les affleurements rocheux et sur les sols calcaires plus ou moins drainés [9]. Au Maroc, elle colonise souvent les frontières de rivières et entre des rosiers pour se protéger contre les pucerons. *L. multifida* occupe une place importante dans la médecine traditionnelle Marocaine. En effet, cette plante est utilisée dans le traitement d'environ une vingtaine de maladies, telles que des problèmes gastriques, l'hémorragie, la guérison des plaies, la polyarthrite [10]. En outre, l'huile essentielle de *L. multifida* est préconisée pour son utilisation en phyto-aromathérapie. En effet, elle est dotée d'une activité antibactérienne contre un nombre de bactéries pathogènes pour l'homme [11] et une activité antifongique contre les champignons responsables de la candidose, la méningite et la dermatophytose [9]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée auparavant sur l'effet de cette huile essentielle sur des moisissures responsables des maladies de post-récolte. Par conséquent, l'objectif de cette étude est la caractérisation de la composition chimique de l'huile essentielle de *L. multifida* du Sud-Est Marocain et l'étude de son effet antifongique sur la croissance mycélienne de trois champignons responsables de la pourriture des pommes en conservation dans les frigos de la région de Midelt (Maroc).

Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal, constitué de l'ensemble des parties aériennes de *Lavandula multifida* poussant à l'état spontané, a été récolté au mois de Novembre 2010 dans la région d'Errachidia (Sud-Est du Maroc). Il a été ensuite lavé au laboratoire et séché à l'obscurité dans un endroit bien aéré, à la température ambiante. L'identification de cette espèce botanique a été réalisée au département de biologie de la Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia dont le spécimen de référence y est déposé.

2. Matériel fongique

Trois moisissures, étudiées dans ce travail, ont été isolées à partir des lésions développées sur des pommes en conservation provenant de différentes chambres froides de Midelt (Maroc). Il s'agit de : *Alternaria* sp., *Penicillium expansum* et *Rhizopus stolonifer*. Ces espèces ont été choisies pour les dégâts considérables qu'ils causent aux pommes en conservation [5]. L'identification des espèces fongiques est basée sur l'observation macroscopique (aspect morphologique de mycélium, vitesse de la croissance, couleur et texture de thalle, ...) et l'examen microscopique d'une colonie fongique [12].

3. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle à partir des parties aériennes de *L. multifida* a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger selon la technique décrite par la pharmacopée européenne [13]. En effet, trois distillations ont été réalisées par ébullition de 100 g de chaque matériel végétal imprégné d'une quantité suffisante d'eau pendant trois heures. Le rendement en huile essentielle (volume en ml) a été déterminé par rapport à 100 g de la matière sèche. Ensuite

l'huile obtenue a été séchée sur sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) et conservée à une température de -4°C dans un flacon sombre jusqu'à son usage.

4. Analyse chromatographique

L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été réalisée grâce à un chromatographe Perkin Elmer Autosystem GC (Walton, MA, USA) XL, équipé d'un injecteur unique et de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composés. L'appareil a été utilisé pour l'échantillonnage simultané à deux colonnes capillaires en silice fondue (60 m x 0,22 mm, épaisseur du film 0,25 μm) avec différentes phases stationnaires, respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane). Le gaz vecteur est l'hélium avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur et du détecteur est de 280°C . La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C , à $2^\circ\text{C}/\text{mn}$, puis en un palier de 30 mn à 230°C . L'injection se fait par mode Split avec un rapport de division de 1/80. La quantité de l'huile injectée est de 0,1 μL . Pour chacun des composés, deux indices de retentions polaire et apolaire ($I_r p$ et $I_r a$), peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon de n-alcane (C_5 - C_{30}) avec interpolation linéaire, en utilisant l'équation de Van Den Dool et Kratz [14], et le logiciel de Perkin Elmer. L'analyse par couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CPG/SM) a été réalisée grâce à un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur. La détection se fait par un analyseur quadripolaire directement couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass automatique équipé de deux colonnes (60 m x 0,22 mm ; épaisseur du film : 0,25 μm) polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane). Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindriques. La température de la source est de 150°C . Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da. Le gaz vecteur est l'hélium avec pression en tête de colonne de 43 psi. Le débit dans chaque colonne est de 1 mL/mn. La programmation de la température est identique à celle utilisée précédemment pour la CPG. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité de l'huile injectée est de 0,1 μL .

5. Identification des composés

L'identification des composés de l'huile essentielle est basée sur la comparaison :

- de leurs indices de rétention sur les deux colonnes apolaires ($I_r a$) et polaires ($I_r p$), déterminés par rapport aux indices de rétention d'une gamme étalon d'alcane ; avec ceux des composés de référence. Les pourcentages relatifs de composants ont été calculés sur la base des aires de pic CG sans utiliser de facteurs de correction. Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature ($I_r l$)) [15,16] ;
- de leurs spectres de masse ainsi obtenus avec ceux des produits de référence contenus dans la bibliothèque commerciales et par la comparaison des spectres de masse avec ceux de bibliothèque ou de la littérature des données [16,17].

6. Activité antifongique in vitro de l'huile essentielle de *L. multifida*

L'évaluation de l'activité de l'huile essentielle de *L. multifida* sur la croissance mycélienne des trois champignons isolés des pommes pourries a été entreprise en utilisant la technique de contact direct [18] et la méthode de micro-atmosphère [19] avec de légères modifications.

Technique de contact direct

Cette méthode repose sur l'étude de l'effet de l'incorporation de différentes concentrations de l'huile essentielle dans le milieu de culture sur la croissance des souches fongiques. Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc aux milieux de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une dispersion homogène de l'huile pure à $1/10^6$ dans une suspension stérile d'agar à 0,2 % (m/v) afin d'obtenir le maximum de contact entre l'huile et le micro-organisme à tester (solution mère à 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Ensuite, des dilutions sériées de raison 2 ont été préparées (1,25 à 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) en suspension d'agar stérile, à partir de la solution mère par addition de volumes variables de l'HE.

Dans des tubes à essais contenant chacun 13,5 mL de milieu solide PDA stérilisé à l'autoclave (15 minutes à 115 °C) et maintenus en surfusion à 45 °C, on ajoute 1,5 mL de chacune des dilutions préparées, puis on les agite convenablement à l'aide du vortex avant de les répartir dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre à raison de 20 mL de mélange par boîte de façon à obtenir les concentrations finales de 0,125 à 2 µL/mL. Des témoins, contenant 13,5 mL de milieu de culture PDA plus 1,5 mL de la suspension d'agar stérile à 0,2 % seule, sont également préparés. Après solidification, les boîtes préparées ont étéensemencées au centre de la surface du milieu gélosé des conditions aseptiques dans une chambre à flux laminaire avec un disque de mycélium (6 mm de diamètre) prélevé de manière stérile à l'aide d'une aiguille à partir de la périphérie de cultures âgées de 7 jours, puis incubées à l'obscurité à une température de 25 ± 2°C pendant 3 jours pour *Rhizopusstolonifer* et 6 jours pour *Alternariasp.*, et *Penicillium expansum*. Les durées d'incubations ont été fixées après une étude préliminaire sur les vitesses de croissance des moisissures sélectionnées.

Méthode de micro-atmosphère

Contrairement à la première technique, basée sur le contact direct de l'huile essentielle dans sa globalité avec les champignons, la méthode de micro-atmosphère repose sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de la fraction volatile de cette huile, à une température d'incubation donnée, sur la croissance mycélienne. Les boîtes de pétri de 90 mm de diamètre sont préparées extemporanément par remplissage de 20 mL de milieu PDA en surfusion (20 mL de milieu PDA offre 80 mL d'air dans chaque boîte). L'inoculation est réalisée en surface, sous forme de dépôts du disque mycélien (6 mm) au centre de la boîte, comme décrit précédemment dans le cas de la méthode de contact direct. Des papiers filtre (watmann n° 5, 80 mm de diamètre) sont placés au fond du couvercle de chaque boîte de pétri et imprégnés avec différentes concentrations de l'HE: 0 (témoin), 10, 20, 40, 80 et 160 µL/disque (équivalent à 0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 2µL/mL d'air, respectivement). Immédiatement, les boîtes sont scellées à l'aide de parafilm pour éviter l'évaporation de l'HE, puis incubées à l'obscurité à une température de 25 ± 2°C pendant 3 jours pour *Rhizopusstolonifer* et 6 jours pour *Alternariasp.*, et *Penicillium expansum*. Dans les deux techniques précédentes, pour chaque espèce fongique et chaque concentration, trois répétitions ont été réalisées et trois boîtes sont utilisées par essai. La croissance mycélienne a été suivie en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le centre de chaque boîte. La fongitoxicité, exprimée en terme de pourcentage d'inhibition de la croissance de mycélium (I%), a été calculée selon la formule de Pandey et al.[20].

$$I(\%) = \frac{D_t - D_i}{D_t} \times 100$$

où D_t est le diamètre de la culture de champignons (en mm) dans un milieu sans huile (témoin), D_i est le diamètre de la culture de même champignons dans un milieu en présence de l'huile.

Ces mesures ont été utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) (concentration la plus faible de l'huile essentielle qui va inhiber la croissance visible d'un microorganisme, après la durée d'incubation).

Etude de la nature de la fongitoxicité de l'huile essentielle étudiée

L'étude de la nature de l'inhibition de l'huile essentielle a été réalisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). La distinction entre la concentration minimale fongistatique (CMF) et la concentration minimale fongicide ou létale (CML) est déterminée par le transfert des disques mycéliens à partir des boîtes de pétri, où l'inhibition par l'huile est complète dans les deux techniques utilisées, dans un nouveau milieu PDA dépourvu de cette huile. Il est fongistatique si la croissance du champignon reprend à nouveau et fongicide ou létale s'il n'y a pas de croissance.

7. Analyse statistique

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle sur la croissance mycélienne a été réalisé par une analyse de la variance (ANOVA). La comparaison des moyennes deux à deux a été effectuée par le test de la plus petite différence significative (PPDS) au seuil de $\alpha=5\%$. Les analyses statistiques (moyennes + écarts types) ont été calculées à l'aide du logiciel « R ».

Résultats et discussion

1. Rendement en huile essentielle

Les parties aériennes de *Lavandula multifida* ont fourni une huile essentielle de couleur jaune limpide à odeur phénolique très forte avec un rendement moyen d'environ 2.4%. Ce rendement est appréciable et peut être

rentable à l'échelle industrielle. La comparaison de ce rendement en huile essentielle avec ceux rapportés dans la littérature, montre bien que *L. multifida* de la région de notre étude (Errachidia-Maroc) est plus riche en huile essentielle. En effet, ce taux est supérieur à celui trouvé par Denier et al. [8] (0,02 %), Benbelaid et al. [11] (0,09 %) et Bellakhdaret al.[7](0,02-0,04 %) pour différentes populations de *L. multifida* du Maroc.

2. Composition chimique de l'huile essentielle

Les résultats de l'analyse chromatographique par CPG et CPG/SM de l'huile essentielle extraite des parties aériennes de *L. multifida* sont consignés dans le tableau 1. Au total 29 constituants, représentant plus de 90,6% de la composition globale de l'huile essentielle, ont été identifiés sur la base de la comparaison de leurs spectres de masse et de leurs indices de rétention polaires et apolaires (*I_rp* et *I_ra*) avec ceux de composés authentiques de différentes bibliothèques. En effet, la fraction monoterpénique est plus importante et représente environ 81,1% de la composition chimique globale de l'huile dont les monoterpènes oxygénés (09 composés) représentent 72,9% et les monoterpènes hydrocarbonés (11 composés) constituent 8,2%. Les principaux constituants majoritaires qui caractérisent cette huile essentielle sont les composés phénoliques (69,6%) dont le Carvacrol **23** est le composé majoritaire (57,9%), suivi de l'Ether de carvacrol méthyle **22** (7,6%), *para*-Cymen-8-ol **20** (3,9%) et l'Eugenol **24** (0,2). Cependant, la fraction sesquiterpénique est apparue en faible proportion (7,6%). Elle est principalement composée de 3 sesquiterpènes oxygénés avec un pourcentage de 6,6% dont le Spathulenol **27** (3,8 %) est le constituant principal de cette fraction. Nous remarquons également que cette huile est caractérisée par la présence de trois dérivés oxygénés d'octane : **2**, **3** et **5** (1,9%). Par ailleurs, trois composés absents dans des bibliothèques de référence (**23**, **38**, **39**) ont été détectés avec un pourcentage de 3,7 % de la composition chimique globale de l'huile.

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* collectée à Errachidia (Sud-Est du Maroc)

N° ^a	Composés	<i>I_rt</i> ^b	<i>I_ra</i> ^c	<i>I_rp</i> ^d	% apo ^e
1	α-Pinene	936	930	1007	0,7
2	Oct-1-en-3-ol	962	958	1398	0,8
3	Octan-3-one	969	961	1219	0,6
4	Myrcene	987	977	1132	0,8
5	3-Octanol	981	977	1344	0,5
6	α-Phellandrene	1002	992	1137	0,1
7	2-Carene	1000	1001	1123	0,6
8	3-Carene	1010	1004	1150	0,1
9	<i>para</i> -Cymene	1015	1007	1230	1
10	Limonene	1025	1015	1169	0,7
11	1,8-Cineol	1024	1015	1183	0,3
12	(<i>Z</i>)-b-Ocimene	1029	1019	1201	1,1
13	(<i>E</i>)-b-Ocimene	1041	1029	1214	0,2
14	<i>para</i> -Cymenene	1075	1065	1380	0,3
15	Terpinolene	1082	1071	1242	2,6
16	Linalool	1086	1074	1496	0,3
17	α-Thujone	1089	1078	1372	0,5
18	Camphor	1123	1113	1460	1,7
19	NI 1	-	1119	1415	0,5

20	<i>para</i> -Cymen-8-ol	1169	1153	1790	3,9
21	α -Terpineol	1176	1165	1645	0,5
22	Carvacrolmethylether	1226	1221	1549	7,6
23	Carvacrol	1278	1283	2136	57,9
24	Eugenol	1331	1327	2105	0,2
25	(<i>E</i>)-b-Caryophyllene	1421	1414	1551	0,9
26	α -Sesquisabinene	1435	1434	1600	0,1
27	Spathulenol	1572	1557	2059	3,8
28	Caryophyllene oxyde	1578	1571	1920	2,5
29	β -Eudesmol	1641	1655	2156	0,3
30	NI 2	-	2043	2594	2,4
31	NI 3	-	2346	2981	0,8
				Total	94,3
				Monoterpènes hydrocarbonés	8,2
				Monoterpènes oxygénés	72,9
				Sesquiterpènes hydrocarbonés	1,0
				Sesquiterpènes oxygénés	6,6
				Composés oxygénés dérivés d'octane (2, 3, 5)	1,9
				Composés inconnus (23, 38, 39)	3,7

^aLa numérotation se réfère à l'ordre d'éluion sur colonne apolaire (Rtx-1) ;

^b**Irl** = indice de rétention de littérature mesuré sur colonne apolaire (Rtx-1) ;

^c**Ira** = indice de rétention sur colonne apolaire (Rtx-1) ;

^d**Irp** = indice de rétention sur colonne polaire (Rtx-Wax) ;

^e Les pourcentages relatifs des constituants(%) sont calculés sur la base des aires des pics de CPG mesurées sur la colonne apolaire (Rtx-1) à l'exception des composés dont les **Ira** sont identiques (les concentrations sont données sur la colonne polaire)

Les résultats rapportés dans la littérature montrent que toutes les huiles essentielles de *L. multifida* renferment le carvacrol comme composant majoritaire. Néanmoins, des différences considérables sont observées au niveau de l'analyse qualitative et quantitative. En effet, l'analyse chimique comparative des huiles essentielles de dix populations de *L. multifida* d'origine marocaine, réparties dans des étages bioclimatiques, a montré que le carvacrol est leur constituant principal avec des pourcentages de 18 à 86,2% en fonction de l'échantillon analysé [7]. De même, une étude menée sur les huiles essentielles de différentes populations de *L. multifida*, collectées en Tunisie, a permis d'identifier 21 composés, représentant 81,42% de l'huile totale, dont le carvacrol (34,95%) et le germacrène D (15,19%) sont les composés majoritaires [21]. Une analyse de l'huile essentielle de *L. multifida* d'Espagne, étudiée par Garcia-Vallejo et al., a donné comme composés majoritaires le carvacrol et β -bisabolène [22]. Récemment, une étude menée sur les huiles des parties aériennes de deux échantillons *L. multifida*, collectées au Portugal, a permis d'identifier 33 composés, représentant 93,4-97,9% de totale des huiles, dont le carvacrol (41,5 % et 42,8%) et le cis- β -ocimène (27,0% et 27,4%) sont les constituants principaux [9]. Ces variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, du point de vue qualitatif et quantitatif, peuvent être dues à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et à la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques [23,24]. La présence d'une grande quantité du carvacrol dans les huiles essentielles de *L. multifida* est une caractéristique spécifique de cette espèce, car ce composé se produit dans des quantités plus faibles voire nulles dans d'autres *lavandula* à l'exception de l'huile essentielle des parties aériennes de *L. canariensis* d'origine australienne où le carvacrol est le composé majoritaire avec 23,6% suivi du β -bisabolène avec 20,8% [23].

3. *Activité antifongique in vitro de l'huile essentielle de L. multifida*
Technique de contact direct sur milieu gélosé

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de la concentration de l'huile essentielle de *L. multifida* sur la croissance mycélienne des trois champignons, après une période d'incubation de 3 jours pour *R. stolonifer* et de 6 jours pour d'*Alternariasp.*, et *P.expansum* sont regroupés dans le tableau 2 et la figure 1.

Tableau 2 : Pourcentage d'inhibition (moyenne \pm écarttype*) de la croissance mycélienne d'*Alternariasp.*, de *P.expansum* et de *R. stolonifer* en fonction de la concentration de l'huile essentielle de *L. multifida*

Souche	<i>Alternariasp.</i> ,	<i>P. expansum</i>	<i>R. stolonifer</i>
Durée d'incubation	6 jours 25 \pm 2 ° C	6 jours 25 \pm 2 ° C	3 jours 25 \pm 2 ° C
Concentration(μ L/mL)			
2	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}
1	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}
0,5	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}
0,25	100,00 \pm 0,00 ^{A, a}	87,12 \pm 1,47 ^{B, b}	66,87 \pm 0,24 ^{B, c}
0,125	84,66 \pm 1,39 ^{A, a}	80,78 \pm 2,21 ^{B, b}	18,72 \pm 2,14 ^{C, c}

*Les valeurs moyennes, suivies par une même lettre (majuscule dans chaque ligne ou minuscule dans chaque colonne), ne diffèrent pas significativement ($p < 0,05$) selon le test de la plus petite différence significative (PPDS).

A la lumière des résultats obtenus, il est clair que l'huile essentielle de *L. multifida* présente une activité antifongique significative ($p < 0,05$) vis-à-vis des champignons testés en engendrant des niveaux d'efficacité très élevés. En effet, cette activité inhibitrice est plus marquée sur l'*Alternariasp.*, en inhibant totalement sa croissance à partir de la CMI = 0,25 μ L/mL, alors que la CMI de cette huile pour *P. expansum* et *R. stolonifer* correspond à 0,5 μ L/mL.

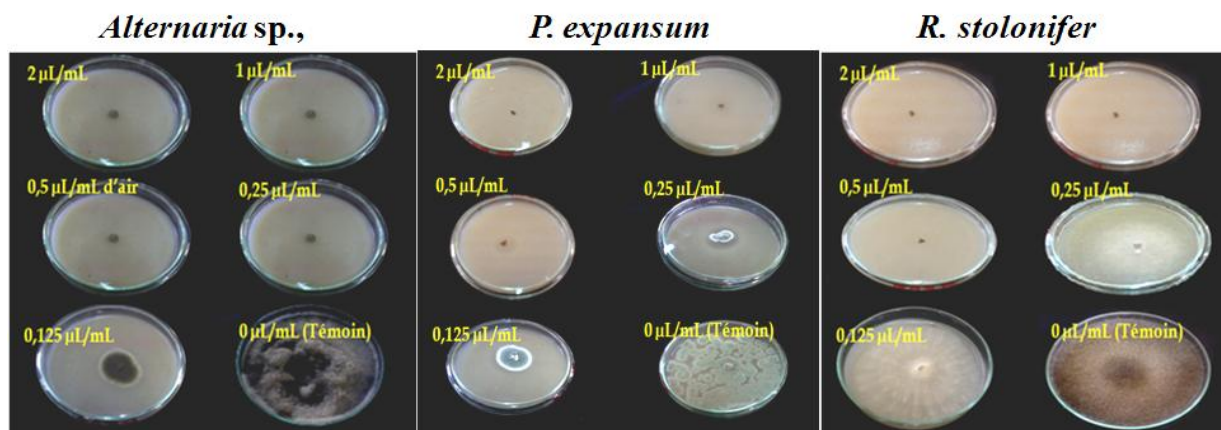


Figure 1 : Effet de la phase liquide de l'huile essentielle de *L. multifida* sur la croissance mycélienne des trois souches fongiques isolées : *Alternariasp.*, *P. expansum* et *R. stolonifer*. Par ailleurs, le caractère fongitoxique de cette huile vis-à-vis de ces trois moisissures a été réalisé et les résultats obtenus (tableau 3) montrent que les souches fongiques testées sont toutes sensibles à cette huile. Cette dernière montre une activité fongicide (létale) à CMI = 0,5 μ L/mL et fongistatique à 0,25 μ L/mL pour *Alternariasp.*, alors que pour les deux autres souches, *P. expansum* et *R. stolonifer*, l'huile présente une activité fongicide à CMI = 1 μ L/mL et un effet fongistatique à 0,5 μ L/mL. Ainsi, il faut au moins le double de la CMI pour obtenir l'effet fongicide sur toutes les moisissures testées.

Tableau 3 :Concentrations minimales inhibitrices (CMI = CMF) et concentrations minimales fongicides (létales) (CML) de l'huile essentielle de *L. multifida* vis-à-vis des souches fongiques testées

Souche	CMI = CMF (µL/mL)	CML (µL/mL)
<i>Alternariasp.</i> ,	0,25	0,5
<i>P. expansum</i>	0,5	1
<i>R. stolonifer</i>	0,5	1

Par ailleurs, *R. stolonifer* exprime une résistance élevée à l'huile essentielle à faibles concentrations (18,72±2,14 % à 0,125 µL/mL). Ce comportement peut être dû au fait que ce champignon neutralise l'effet de cette faible concentration par son métabolisme normal ou la dose appliquée pourrait être insuffisante pour permettre à l'huile de réagir face au pathogène.

Technique de micro-atmosphère

Les résultats obtenus de l'effet de la fraction volatile de l'huile essentielle de *L. multifida* sur la croissance mycélienne des trois souches fongiques isolées sont regroupés dans le tableau 4 et la figure 2.

Tableau 4 :Pourcentage d'inhibition(moyenne ± écarttype*) de la croissance mycélienne d'*Alternariasp.*, de *P.expansum* et de *R. stolonifer* en fonction de la concentration de l'huile essentielle de *L. multifida*

Souche	<i>Alternariasp.</i> ,	<i>P. expansum</i>	<i>R. stolonifer</i>
Durée d'incubation	6 jours 25 ± 2 ° C	6 jours 25 ± 2 ° C	3 jours 25 ± 2 ° C
Concentration (µL/mL d'air)			
2	100,00±0,00 ^{A, a}	100,00±0,00 ^{A, a}	100,00±0,00 ^{A, a}
1	100,00±0,00 ^{A, a}	100,00±0,00 ^{A, a}	100,00±0,00 ^{A, a}
0,5	100,00±0,00 ^{A, a}	100,00±0,00 ^{A, a}	100,00±0,00 ^{A, a}
0,25	100,00±0,00 ^{A, a}	100,00±0,00 ^{A, a}	100,00±0,00 ^{A, a}
0,125	90,71±1,33 ^{A, a}	82,18±1,81 ^{B, b}	82,12±1,73 ^{B, b}

*Les valeurs moyennes, suivies par une même lettre (majuscule dans chaque ligne ou minuscule dans chaque colonne), ne diffèrent pas significativement ($p < 0,05$) selon le test de la plus petite différence significative (PPDS).

Les résultats reportés dans le tableau 4 montrent bien que l'activité de l'huile essentielle de *L. multifida* est plus marquée dans sa fraction volatile. Elle a inhibé complètement la croissance mycélienne de toutes les souches fongiques testées à la CMI égale à 0,25 µL/mL d'air (20 µL/disque). En outre, cette l'huile essentielle, 0,125 µL/mL d'air (10 µL/disque), montre un effet inhibiteur important sur la croissance radiale de tous les phytopathogènes : *Alternaria* sp., (90,71±1,33 %), *P. expansum* (82,18±1,81 %) et *R. stolonifer* (82,12±1,73 %). L'analyse statistique de l'activité antifongique montre que l'*Alternariasp.*, est plus sensible à l'huile essentielle, suivi de *P.expansum* et *R. stolonifer* qui ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$) à toute la gamme de concentration testée.

La nature de la fongitoxicité de l'huile essentielle de *L. multifida* a été étudiée par le transfert des disques mycéliens des souches testées, dont l'inhibition de la croissance est complète, sur le nouveau milieu PDA sans huile essentielle. En effet, les résultats obtenus (tableau 5) ont montré qu'aucune croissance n'a été développée après une durée d'incubation suggérant que l'effet fongicide de l'huile essentielle sur l'*Alternariasp.*, et *P. expansum* à des concentrations 0,25 et 0,5 µL/mL d'air, respectivement. Par contre, l'huile essentielle présente une activité fongicide à 1 µL/mL d'air et un effet fongistatique à 0,5 µL/mL d'air sur *R. stolonifer*. Ainsi, la CML coïncide avec la CMF pour *Alternariasp.*, et *P. expansum*, cependant, il faut au moins le double de la CMI pour obtenir l'effet fongicide sur *R. stolonifer*.

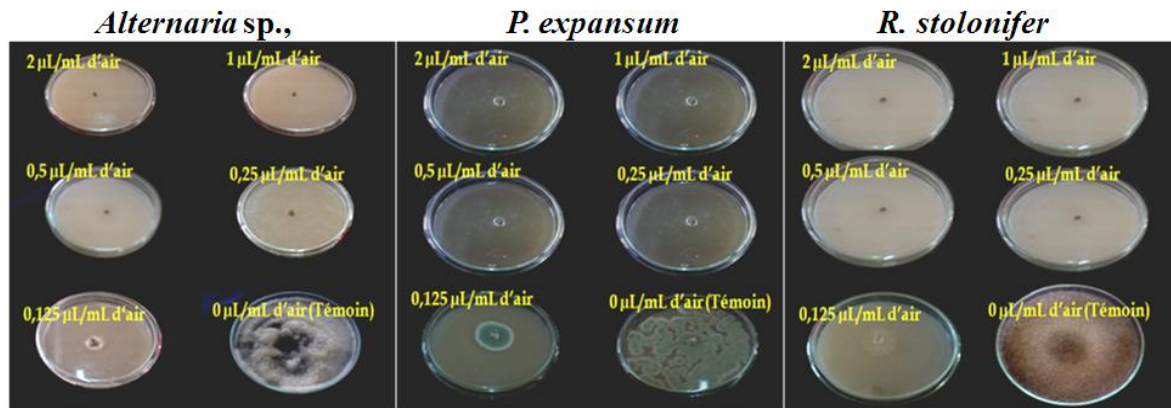


Figure 2 : Effet de la fraction volatile de l'huile essentielle de *L. multifida* sur la croissance mycélienne des trois souches fongiques isolées : *Alternaria* sp., *P. expansum* et *R. stolonifer*

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI = CMF) et concentrations minimales fongicides (létales) (CML) de l'huile essentielle de *L. multifida* vis-à-vis des souches fongiques testées

Souche	CMI = CMF ($\mu\text{L/mL}$ d'air)	CML ($\mu\text{L/mL}$ d'air)
<i>Alternaria</i> sp.,	0,25	0,25
<i>P. expansum</i>	0,5	0,5
<i>R. stolonifer</i>	0,5	1

Généralement, l'activité antifongique d'une huile essentielle est liée étroitement à sa composition chimique. Toutefois, il est probable que cette activité dépend aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique. Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus dans la présente étude montrent que l'huile essentielle de *L. multifida* présente une activité antifongique importante vis-à-vis des champignons testés. Cette activité trouve probablement son origine de sa composition chimique riche en composés phénoliques (69,6 %), en particulier en carvacrol qui est le constituant majoritaire avec 57,9 % de la composition globale de l'huile. Ce composé est connu par son pouvoir d'inhibition de la croissance mycélienne, la germination des conidies et la production des spores des pathogènes [25]. Ainsi, il a été rapporté que la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*, agent responsable de la pourriture grise de la pomme, a été complètement inhibée par l'huile essentielle d'une Labiée Marocaine (*Origanum compactum*), dont le carvacrol (58,1 %) est son constituant principal [26]. L'huile essentielle de la même plante a inhibé complètement les trois étapes de reproduction asexuée (la germination des spores, l'élongation du mycélium et la sporulation) des champignons contaminant les denrées alimentaires (*Aspergillus Niger*, *Penicillium italicum* et *Zygorrhynchus* spp.) [27]. De même, l'huile essentielle de l'espèce *Origanum vulgare* dont le carvacrol (53,9 %) est le constituant majeur présente une efficacité significative sur tous les cultivars de pommiers inoculés avec une suspension conidienne de deux agents pathogènes *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum* [28].

Cependant, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est-à-dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires. En effet, une autre interaction synergique a été mise en évidence entre le carvacrol et son précurseur, le p-cymène. Ce dernier semblerait faciliter la pénétration intracellulaire du carvacrol en potentialisant ainsi son action [29]. L'activité antimicrobienne de la famille de composés phénoliques est due à leur structure (noyau aromatique lié au groupement hydroxyle dans différentes positions). Cette structure leur permet de former des liaisons hydrogène avec les groupes-SH dans les sites actifs des enzymes cibles, ce qui entraîne la désactivation de ces enzymes dans les champignons [29]. Les terpènes phénoliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amines et hydroxylamines des protéines membranaires de la cellule microbienne en provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite de contenus intracellulaires [30].

Au cours de la présente étude, nous avons remarqué que la fraction volatile de l'huile essentielle étudiée montre une meilleure activité antifongique contre les phytopathogènes testés par rapport à la méthode de contact direct sur milieu gélosé. Ce résultat est en bon accord avec les données bibliographiques. En effet, il a été

montré que la fraction volatile des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et d'*Eucalyptus globulus* inhibe fortement la croissance du mycélium de *Mortierellahyalina* var. *Hyaline*, *Penicillium roquefortii* et *Phomaexiqua* isolés à partir des pommes [31]. De même, la fraction volatile des huiles essentielles d'*Origanum syriacum* var. *bevanii*, *Lavandula stoechas* var. *stoechas*, et *Rosmarinus officinalis* présente une toxicité remarquable sur *Botrytis cinerea* que la fraction liquide de contact direct [19]. Sharma et al. ont montré que la vapeur de l'HE de *Citrus sinensis* a une action fongicide sur 3 agents pathogènes de la pomme à savoir *Penicillium expansum*, *Ulocladium chartarum* et *Alternaria mali* [32]. Par ailleurs, les résultats obtenus dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence le potentiel fongistatique de la vapeur de l'huile essentielle de *Warionia saharea* sur l'*Alternariasp.*, et le potentiel fongicide de l'huile essentielle de *Pulicaria mauritanica* sur les trois souches testées dans cette étude [33,34].

L'explication de ces observations peut être attribuée à la faible solubilité des huiles essentielles dans l'eau et par conséquent dans le milieu gélosé, grâce à leur caractère hydrophobe. Ainsi, le caractère volatile et hydrophobe rend ces huiles plus absorbables par le mycélium fongique que par le contact direct sur gélose. Ce comportement peut être du, d'une part, à la nature lipophile du tissu fongique et d'autre part à la forte teneur en eau dans la gélose [35]. D'autre part, dans la phase de contact direct, des concentrations relativement élevées des huiles essentielles sont nécessaires pour inhiber la croissance du mycélium [36]. Cependant, cette concentration plus élevée peut impliquer des effets sur les propriétés organoleptiques de fruit (le goût et la saveur naturels). Ainsi, l'utilisation des huiles essentielles en phase vapeur semble être un protocole de contrôle prometteur qui pourrait être appliqué en fumigation pour le contrôle de certaines maladies de post-récolte dans le domaine agroalimentaire [37].

Conclusion

L. multifida de la région d'Errachidia est très riche en huile essentielle. En effet, le rendement de cette dernière est de l'ordre de 2,4%, ce qui permet l'exploitation éventuelle de cette plante à l'échelle industrielle. En plus, cette huile essentielle contient une quantité importante de carvacrol (57,9%), produit connue par son activité biologique remarquable.

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *L. multifida* étudiée a permis d'identifier 28 constituants, représentant plus de 90 % de la composition globale de l'huile essentielle, dont le carvacrol (57,9 %) est le constituant principal. Ce dernier peut être responsable du fort pouvoir fongicide, à faibles concentrations, de cette huile essentielle sur la croissance mycélienne des trois moisissures testées. Par conséquent, cette huile peut être exploitée comme une alternative idéale aux fongicides synthétiques contre la pourriture des pommes. Cependant, d'autres travaux sur l'influence de l'huile essentielle ou ses composés bioactifs sur la saveur et l'arôme des pommes devraient être menés dans le but de justifier l'application réelle de cette huile essentielle, en particulier, comme un fumigant pour contrôler certaines maladies de post-récolte.

References

1. Mehinagic, E., Prost, C., Demaimay, M. J. *Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 5175-5182.
2. Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Mishra, P.K., Dubey, N.K., Kharwar, R.N. *Food. Res Int.* 44 (2011) 385-390.
3. Commare, R.R., Nandakumar, R., Kandan, A., Suresh, S., Bharathi, M., Raguchander, T., Samiyappan, R. *Crop. Prot.* 21 (2002) 671- 677.
4. Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., Conchello, P. *Food. Res. Int.* 45 (2012) 313–319.
5. Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Mazouz, H., Tomi, P., Paolini, J., Costa, J. *Nat. Prod. Comm.* 6 (2011) 1763-1768.
6. Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H., Kaya, E. *Syst. Ecol.* 33 (2005) 245-256.
7. Bellakhdar, J., Berrada, M., Denier, C., Holeman, M., Ilidrissi, A. *Biruiya*, 1 (1985) 95-106.
8. Denier, C., Bellakhdar, J., Berrada, M., Ilidrissi, A. Actes In: Actes-Colloque. International des Plantes Aromatiques et Médicinales. Maroc. CNCPRST (1985) 219-228.
9. Zuzarte, M., Vale-Silva, L., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Vaz, S., Canhoto, J. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (2011) 1359-1366.
10. Znini M., Paolini J., Majidi L., Desjobert J.M., Costa J., Lahhit N., Bouyanzer A. *Res. Chem. Intermed.* 38 (2012) 669.

11. Benbelaid, F., Bendahou, M., Khadir, A., Abdoune, M.A., Bellahsene, C., Zenati, F., Bouali, W., Abdelouahid, D.E. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2(2) (2012) 244-247.
12. Cahagnier, B., Richard-Molard, D. *Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés*, Ed. Tec & Doc, (1998) 140-158.
13. Council of Europe. *European Pharmacopoeia*. 3rded, Strasbourg. (1997) 121-122.
14. Dool, H., Kratz, P.A. *J. Chromat.* 11 (1963) 463-471.
15. Joulain, D., König, W.A. *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. EbVerlag, Hamburg. (1998).
16. Hochmuth, D., Joulain, D., König, W.A. *Terpenoids and related constituents of essential oils. Library of Massfinder 2*. 1 University of Hamburg, Institute of organic chemistry, Hamburg, (2001).
17. Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gaz chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Allured Publ. Crop., Carol Stream, IL, USA, (2004).
18. Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K., Remmal, A. *J. Ess. Oil Res.* 15 (2003) 286-292.
19. Soyly, E.M., Kurt, S., Soyly, S. *Int. J. Food. Microbiol.* 143 (2010) 183-189.
20. Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D., Dixit, S.N. *J. Plant. Dis. Prot.* 89 (1982) 344-349.
21. Chograni, H., Hadj Ali, I.B., Boussaid, M. *Revue des régions arides.* 2 (2007) 597- 602.
22. Garcia-Vallejo, M.C., Garcia-Vallejo, I., Velasco-Negueruela, A. In: *Proceedings of the eleventh international congress of essential oils*, Frag. Flav, Oxford & IBH Publ. Co, New Delhi, (1989).
23. Palá-Paúl, J., Brophy, J.J., Goldsack, R.J., Fontaniella, B. *Bioch. System. ecol.* 32 (2004) 55-62.
24. Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. *J. Agric. Food. Chem.* 54(12) (2006) 4364-4370.
25. Deferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. *J. Agric. Food. Chem.* 48(6) (2000) 2576-2581.
26. Chebli, B., Achouri, M., Idrissi Hassani, L.M., Hmamouchi, M. *J. ethnopharmacol.* 89 (2003) 165-169.
27. Tataoui-Elaraki, A., Ferhout, H., Errifi, A. *J. Ess. Oil. Res* 5 (1993) 535-545.
28. Lopez-Reyes, J.G., Spadaro, D., Gullino, M.L., Garibaldi, A. *Flav. Fragr. J.* 25 (2010) 171-177.
29. Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. *Appl. Envir. Microb.* 68 (2002) 1561-1568.
30. Lopez-Malo, A., Alzamora, S.M., Palou, E. *Int. J. Food. Microbiol.* 99 (2005) 119-128.
31. Survilienė, E., Valiuškaitė, A., Snieškienė, V., Stankevičienė, A. *Effect of essential oils on fungi isolated from apples and vegetables. Scientific Works Of The Lithuanian Institute Of Horticulture And Lithuanian, University Of Agriculture, Sodininkyst Ir Darininkyst*, 28 (2009) 227-234.
32. Sharma, N., Tripathi, A. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (2006) 587-593.
33. Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., El Harrak, A., Paolini, J., Costa, J. *Food Sci. Biotechnol.* 22(S) (2013a) 113-119.
34. Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Paolini, J., Desjobert, JM., Costa, J. *LWT-Food Sci. Technol.* 54 (2013b) 564-569.
35. Edris, A.E., Farrag, E.S. *Die. Nahrung.* 47 (2003) 117-121.
36. Burt, S. *Int. J. Food. Microbiol.* 94 (2004) 223-253.
37. El-Sayed, H.E., Ziedan, Eman, S.H. *Farrag Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4 (2008) 512.

(2014) ; <http://www.jmaterenvironsci.com>