



COMPOSITION CHIMIQUE ET BIOCONTROLE DE L'HUILE ESSENTIELLE DES GRAINES DE CELERI (*APIUM GRAVEOLENS* L.) CONTRE *BOTRYTIS CINEREA* APRES LA RECOLTE DES POMMES

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOCONTROL OF THE ESSENTIAL OIL OF CELERI SEEDS (*APIUM GRAVEOLENS* L.) AGAINST *BOTRYTIS CINEREA* AFTER APPLES HARVEST

| Ali Lbounhamdi ¹ | Mohamed Znini *¹ | Julien Paolini ² | Jean Costa ² | et | Lhou Majidi ¹ |

¹. Laboratoire des Substances Naturelles & Synthèse et Dynamique Moléculaire | Faculté des Sciences et Techniques | Errachidia, Morocco |

² Université de Corse | UMR CNRS 6134 | Laboratoire de Chimie des Produits Naturels | Faculté des Sciences et Techniques | Corse, France |

| Received | 15 October 2018 |

| Accepted 02 November |

| Published 20 November 2018 |

| ID Article | Ali-ManuscriptRef.12-ajira201018 |

RESUME

Introduction : La pourriture grise, causée par le champignon *Botrytis cinerea*, est une maladie cryptogamique qui attaque les pommes en post-récolte. Ainsi, la méthode la plus utilisée pour lutter contre cette moisissure et réduire ces pertes économiques est l'utilisation des fongicides. Cependant, l'utilisation fréquente de ces molécules synthétiques entraîne l'apparition des souches fongiques résistantes et provoque des dangers sur la santé humaine et sur l'environnement, ce qui a conduit à la recherche d'une nouvelle approche plus respectueuse de l'environnement. Récemment, l'utilisation des huiles essentielles est considérée comme une technique alternative très importante, en raison de leur avantage d'être sans danger pour l'homme et surtout biodégradables. **Objectif** : l'objectif de cette étude est la caractérisation de la composition chimique de l'huile essentielle (HE) des graines d'*Apium graveolens* du Sud-Est Marocain et l'étude de son effet antifongique sur la croissance mycélienne de la moisissure responsable de la pourriture grise des pommes en post-récolte. **Matériel et Méthodes** : La matière végétale séchée a été distillée à l'eau en utilisant un appareil du type Clevenger et L'HE obtenue a été identifiée par les techniques chromatographiques habituelles (CPG/Ir et CPG/SM). L'activité antifongique a été évaluée en utilisant deux méthodes différentes à savoir la méthode de contact direct en milieu gélosé et la technique micro-atmosphère. **Résultats** : Trente constituants ont été identifiés, représentant 99,3 % de la composition globale de l'HE, dont le limonène et β -sélénène sont les principaux composants de cette huile avec des teneurs de 53,3 et 13,3 %, respectivement. Les résultats obtenus ont montré que l'HE étudiée inhibe d'une manière dose-dépendante et significative la croissance mycélienne de la souche fongique testée. La technique micro-atmosphère s'est avérée plus efficace que la technique de contact direct avec des CMI (concentrations minimales inhibitrices) de 2 μ L/mL d'air et > 2 μ L/mL, respectivement. **Conclusion** : L'ensemble des résultats suggère que l'HE de graines d'*A. graveolens* pourrait servir de conservateur antifongique pour lutter contre les maladies post-récolte des pommes.

Mots-clés: *Apium graveolens*, Huile essentielle, Activité antifongique, *Botrytis cinerea*, Pommes.

ABSTRACT

Introduction: Grey mould, caused by *Botrytis cinerea*, is a cryptogamic disease that attacks apples in post-harvest. Thus, the most used method to fight against this mold and reduce these economic losses is the use of fungicides. However, the frequent use of these synthetic molecules leads to the appearance of resistant fungal strains and causes dangers to human health and the environment, which led to the search for a new approach that is environmentally friendly. Recently, the use of essential oils is considered as a very important alternative technique, because of their advantage of being safe for humans and especially biodegradable. **Objective**: the objective of this study is the characterization of the chemical composition of the *Apium graveolens* seeds essential oil from Moroccan South-East and the study of its antifungal effect on the mycelial growth of the fungus responsible for the gray mold of post-harvest apples. **Materials and methods**: The dried vegetal material was water-distilled using a Clevenger-type apparatus and the essential oil obtained have been studied by usual chromatographic techniques (GC/Ir and GC/MS). The antifungal activity of the essential oil was evaluated in vitro by contact direct and micro-atmosphere techniques. **Results**: Thirty compounds were identified, accounting for 99.3 % of the total oil, which limonene and β -selinene are the main components of this oil with 53.3 and 13.3% respectively. The results indicated that the essential oil inhibited significantly ($p < 0.05$) and in a dose-dependent manner the mycelial growth of fungal strain tested. Micro-atmosphere assay was consistently found to be more effective than contact direct technique with MICs (minimum inhibitory concentrations) of 2 μ L/mL air and > 2 μ L/mL, respectively. **Conclusion**: The overall results suggest that *A. graveolens* seeds essential oil could be used as a biofungicide to control post-harvest diseases of apples.

Keywords: *Apium graveolens*, Essential oil, Antifungal activity, *Botrytis cinerea*, Apples.

1. INTRODUCTION

Les infections fongiques sont la principale cause de la pourriture de fruits et de légumes frais lors du stockage et du transport et entraînent des pertes économiques importantes pendant la phase de commercialisation [1]. En effet, elles réduisent la durée de conservation et la valeur marchande des fruits [2]. Elles ont un impact négatif sur la santé humaine en produisant des mycotoxines qui rendent, non seulement, les fruits impropres à la consommation mais également provoquent des effets indésirables sur la santé humaine [3,4].

Botrytis cinerea, responsable de la moisissure grise, est l'un des principaux agents pathogènes capables d'affecter une multitude de fruits, en plein champs ou en conservation, partout dans le monde [1,2,4]. Ce phytopathogène peut infecter les fruits, soit par pénétration directe, soit par des blessures causées par des pratiques culturales. A titre d'exemple, il est responsable des pertes en post-récolte de pommes, en particulier pour sa germination des conidies et sa croissance de mycélium à des températures de stockage aussi basses que 0 °C [5].

En raison de leur valeur sur le plan économique et nutritif, de nombreuses techniques ont été mises en œuvre afin de lutter contre les maladies de post-récolte des pommes. En effet, la lutte chimique par l'utilisation des fongicides est la méthode la plus répandue actuellement pour remédier à la pourriture et réduire les pertes causées par les attaques des pathogènes sur les fruits. Cependant, l'application intensive de ces produits chimiques a des conséquences néfastes sur l'environnement et sur la santé humaine. Elle conduit notamment à la contamination de la biosphère et des fruits, mais surtout à l'apparition des souches résistantes [6,7]. Cet état des lieux conduit la communauté scientifique à réduire l'usage de certains fongicides chimiques via le développement des stratégies alternatives de ces molécules synthétiques. Parmi ces alternatives, l'application des huiles essentielles (HEs) est une méthode très intéressante pour lutter contre les maladies post-récolte. Ces extraits naturels sont généralement considérés comme les plus acceptables à cause de leur respect de l'environnement et moins dangereux que les composés synthétiques grâce à leur non-phytotoxicité et leur biodégradabilité. Elles ont un spectre d'action multi-site, ce qui limite le développement de la résistance des agents pathogènes en raison de leurs compositions complexes. Cette orientation trouve également son origine du fait que la production des HEs par les plantes est un moyen de défense contre les pathogènes et les ravageurs [8]. Elles peuvent donc être utilisées dans le domaine phytosanitaire, comme inhibiteurs de la multiplication des phytopathogènes responsables de la pourriture des fruits en post-récolte.

Apium graveolens L. communément appelé céleri appartient à la famille des Apiaceae. Les feuilles et les racines sont utilisées comme légumes ou épices. Les graines ont des propriétés alimentaires bien connues mais il a également des vertus médicinales. Elles contiennent une HE précieuse utilisée dans les industries du parfum et pharmaceutique. À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée auparavant sur l'effet de cette HE sur des moisissures responsables des maladies de post-récolte des pommes. Par conséquent, l'objectif de cette étude est la caractérisation de la composition chimique de l'huile essentielle des graines d'*Apium graveolens* du Sud-Est Marocain et l'étude de son effet antifongique sur la croissance mycélienne de la moisissure responsable de la pourriture grise des pommes en conservation dans les frigos de la région de Midelt (Maroc).

2. MATERIELS AND METHODES

2.1 Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé, constitué des graines d'*A. graveolens*, a été récolté dans la région d'Errachidia (Sud-Est du Maroc). Après son nettoyage de divers artefacts, il est récupéré puis broyé à l'aide d'un broyeur avant d'être acheminé à l'extraction.

2.2 Matériel fongique :

La moisissure utilisée dans ce travail est le champignon responsable de la pourriture grise des pommes en conservation en l'occurrence : *Botrytis cinerea*. Elle a été isolée à partir des lésions développées sur des pommes en conservation provenant de différentes chambres froides de Midelt (Maroc). Cette espèce a été choisie pour les dégâts considérables qu'elle cause aux pommes en conservation [9]. L'identification de cette espèce fongique 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 [10].

2.3 Extraction de l'huile essentielle :

L'extraction de l'HE à partir des graines d'*Apium graveolens* a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil du type Clevenger selon la technique décrite par la pharmacopée européenne [11]. 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 (Na₂SO₄) et conservée à une température de -4 °C dans un flacon sombre jusqu'à son usage.

2.4 Analyse chromatographique :

L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été réalisée grâce à un chromatographe Perkin Elmer Autosystem GC (Walhton, 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 (Rtw-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 °C/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 (Ir_p et Ir_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 [12], 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 d.i ; épaisseur du film : 0,25 µm) polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtw-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.

2.5 Identification des composés :

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

- de leurs indices de rétention sur les deux colonnes apolaires (Ir_a) et polaires (Ir_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 (Ir_l)) [13,14];
- de leurs spectres de masse ainsi obtenus avec ceux des produits de référence contenus dans la bibliothèque commerciale et par la comparaison des spectres de masse avec ceux de bibliothèque ou de la littérature des données [14,15].

2.6 Activité antifongique in vitro de l'huile essentielle :

L'activité antifongique de l'HE des graines d'*Apium graveolens* vis-à-vis de la croissance mycélienne de champignons isolés a été évaluée en utilisant la technique du contact direct [16] et la méthode de microatmosphère [17] avec de légères modifications.

2.6.1 Technique de contact direct (effet de la phase liquide) :

Cette méthode repose sur l'étude de l'effet de l'incorporation de différentes concentrations de l'HE 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^e 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 µL/mL). Ensuite, des dilutions sériées de raison 2 ont été préparées (1,25 à 20 µL/mL) en suspension d'agar stérile, à partir de la solution mère par addition de volumes variables de l'HE.

Dans des tubes à essai contenant chacun 13,5 mL de milieu solide PDA stérilisés 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 rondes (90x20 mm) 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 été ensemencées 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 11 jours.

2.6.2 Méthode de micro-atmosphère (effet de la phase volatile) :

Contrairement à la première technique, basée sur le contact direct de l'huile essentielle dans sa globalité avec les phytopathogènes, 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 (90×20 mm) 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 chaque HE: 0 (témoin), 10, 20, 40, 80 et 160 µL/disque (équivalent à 0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 µL/mL d'air, respectivement). Immédiatement, les boîtes sont scellées à l'aide de parafilm pour éviter l'évaporation de l'HE (dépôt de produit en position inférieure, sur le couvercle de la boîte de pétri), puis incubées à l'obscurité à une température de 25 ± 2°C pendant 11 jours.

Dans les deux techniques, pour 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 du mycélium (I%), a été calculée selon la formule suivante :

$$I(\%) = \frac{D_t - D_i}{D_t} \times 100 \quad (1)$$

où D_t est le diamètre de la croissance mycélienne (en mm) dans un milieu sans huile (témoin), D_i est le diamètre de la croissance mycélienne 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'HE qui va inhiber la croissance visible d'un microorganisme, après la durée d'incubation).

2.6. 3 Etude de la nature de la fongitoxicité de l'huile essentielle étudiée :

L'étude de la nature de l'inhibition de l'HE a été réalisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) (la plus petite concentration de l'échantillon pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin). 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, dans un nouveau milieu PDA dépourvu de cette huile. Il est fongistatique si la croissance se développe à nouveau et fongicide ou létale s'il n'y a pas de croissance.

2.7 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 SAS (SAS pour Windows. version 9.0).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Rendement :

L'extraction de 100 g des graines d'*A. graveolens* a fourni une HE de couleur jaunâtre et à odeur chaude, épicée et puissante, avec un rendement moyen d'environ 1,4% (v/m) de la masse végétale sèche. Ce rendement est appréciable et peut rendre les graines de cette espèce comme une source importante d'HE à l'échelle industrielle.

La comparaison de ce rendement en HE avec ceux rapportés dans la littérature, montre bien que le rendement de notre échantillon présente une similitude avec celui de l'espèce collectée de la Tunisie 1,5% [18]. Par contre, il est supérieur à celui obtenu dans la région de Thaïlande (1,14%) [19] et inférieur à celui obtenu de l'Inde avec un rendement important de 2% [20]. Cette variation de rendements en HE des graines d'*A. graveolens* peut être attribuée aux plusieurs facteurs tels que : l'origine de la matière végétale, les exigences édapho-climatiques de la plante, la période de la cueillette, la génétique de la plante, l'âge de la plante, le mode de séchage de la plante et la méthode d'extraction utilisée [21,22].

3.2 Composition chimique de l'huile essentielle :

L'identification des composants de l'HE des graines d'*A. graveolens* a été réalisée par les techniques chromatographiques habituelles (CPG/Ir et CPG/SM) selon la méthodologie décrite dans la partie expérimentale. Ainsi, Trente constituants, représentant 99,3 % de la composition globale de l'HE, ont été identifiés sur la base de la comparaison de leurs spectres de masse et de leurs indices de rétention polaires et apolaires (Ir p et Ir a) avec ceux de composés de références (Tableau 1).

Tableau 1: Composition chimique de l'HE des graines d'*Apium graveolens*.

N ^o ^a	Composés	Ir l ^b	Ir a ^c	Ir p ^d	% ^e
1	α-Pinene	936	930	1020	0,3
2	Sabinene	973	964	1118	0,1
3	β-Pinene	978	970	1109	2,9
4	Myrcene	987	981	1156	1,4
5	p-Cymene	1015	1015	1265	1,5
6	Limonène	1025	1023	1203	53,3
7	γ-Terpinene	1051	1050	1242	1,8
8	Fenchone	1069	1068	1388	0,1
9	Linalol	1086	1084	1536	0,7
10	trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1113	1104	1614	0,3
11	Z-Limonene 1,2-époxyde	1126	1116	1436	0,3
12	E-Limonene 1,2-époxyde	1130	1121	1448	0,4
13	Pentyl benzene	1150	1144	1408	1,7
14	Dictyotene	1155	1149	1328	0,4
15	Z-dihydro-Carvone	1172	1171	1589	0,3
16	Estragole	1175	1175	1654	0,3
17	8,9-epoxy p-menthene		1178		0,2
18	Cuminaldehyde		1214	1762	2,9
19	Carvone	1214	1216	1734	0,4
20	α-Terpinen-7-al		1257	1771	0,4
21	E-Anéthole	1262	1262	1807	0,9
22	γ-Terpinen-7-al		1264	1848	0,9
23	Pinocarvyl acetate	1287	1280	1637	0,2
24	E-Caryophyllene	1421	1416	1593	0,4
25	β-Sélinène	1486	1485	1714	13,3
26	α-Sélinène	1494	1492	1717	2,1
27	Caryophyllène oxyde	1578	1569	1963	0,7
28	Butylphthalide	1616	1614	2487	3,3
29	β-Eudesmol	1641	1635	2205	0,6
30	Sencyunolide	1671	1681	2573	4,2
TOTAL					96,3
Monoterpènes hydrocarbonés					61,3
Sesquiterpènes hydrocarbonés					15,8
Monoterpènes oxygénés					8,3
Sesquiterpènes oxygénés					1,3
Composés cycliques non terpéniques (13, 14, 28, 30)					9,6

^a La numérotation se réfère à l'ordre d'éluion sur colonne apolaire (Rtx-1) ; ^b Ir l = indice de rétention de littérature mesuré sur colonne apolaire (Rtx-1) ; ^c Ir a = indice de rétention sur colonne apolaire (Rtx-1) ; ^d Ir p = 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 Ir a sont identiques (les concentrations sont données sur la colonne polaire).

L'analyse des résultats de ce tableau montre que l'HE des graines d'*A. graveolens* est caractérisée par la teneur importante de la fraction monoterpénique (21 monoterpènes) qui présente environ 69,6 % de la composition chimique globale de l'huile dont les monoterpènes hydrocarbonés (7 composés) représentent 61,3% et les monoterpènes oxygénés (14 composés) constituent 8,3 %. Cependant, la fraction sesquiterpénique dans cette HE constitue 17,1 % et principalement composée de 3 sesquiterpènes hydrocarbonés (15,8 %) et 2 sesquiterpènes oxygénés (1,3 %). Les principaux constituants majoritaires qui caractérisent cette HE sont le limonène **6** (monoterpène hydrocarboné) avec une teneur de 53,3 %, suivi du β-Sélinène **25** (sesquiterpène hydrocarboné) avec un pourcentage de 13,3 % (figure 1).

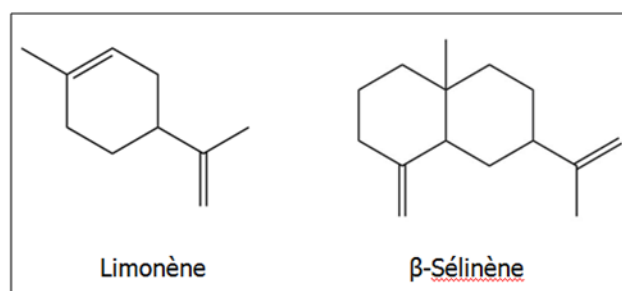


Figure 1: Structures chimiques des principaux constituants de l'HE étudiée.

Cette HE est caractérisé aussi par la présence de 4 composés cycliques non terpéniques (**13, 14, 28, 30**) avec un pourcentage de 9,6 % de la composition chimique globale de l'huile dont le Sencyunolide (**30**) le Butylphthalide (**28**) constituent 4,2 % et 3,3 %, respectivement. Ces composés sont responsables de l'odeur de l'HE d'*A. graveolens*.

Il est clair que l'HE de notre échantillon présente un profil chimique similaire à celui rapporté dans la littérature. Cependant certaines différences qualitatives et quantitatives ont été observées. En effet, l'HE des graines d'*A. graveolens* de l'Inde renferme les mêmes composants majoritaires obtenus dans notre étude à savoir le limonène avec 50 % et le β -Selinène avec 10-15 %. Par contre les teneurs en composés minoritaires sont différentes avec l'absence totale dans notre échantillon de composé sedanolide (2.5 à 3 %) et l'absence totale de composé sencyunolide (4,4 %) dans l'échantillon de l'Inde [20]. Dans le cas de l'échantillon provenant de la Tunisie, la teneur en limonène est moins que celui de notre échantillon (39,4 % vs 53,3 %), alors que sa teneur en β -Selinène est plus importante (15,4 % vs 13,3 %) [18].

3.3 Activité antifongique in vitro de l'huile essentielle :

Technique de contact direct sur milieu gélosé :

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de la concentration de l'huile essentielle des graines d'*A. graveolens* sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*, après 11 jours d'incubation, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2: Pourcentage d'inhibition (moyenne \pm écart type*) de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de la concentration de l'HE étudiée.

Concentration (v/v)	Pourcentage d'inhibition (moyenne \pm écart type*)
0,2% (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	88,14 \pm 1,61 ^a
0,1% (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	73,09 \pm 2,61 ^b
0,05% (0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	65,59 \pm 1,90 ^c
0,025% (0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	30,56 \pm 0,40 ^d

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

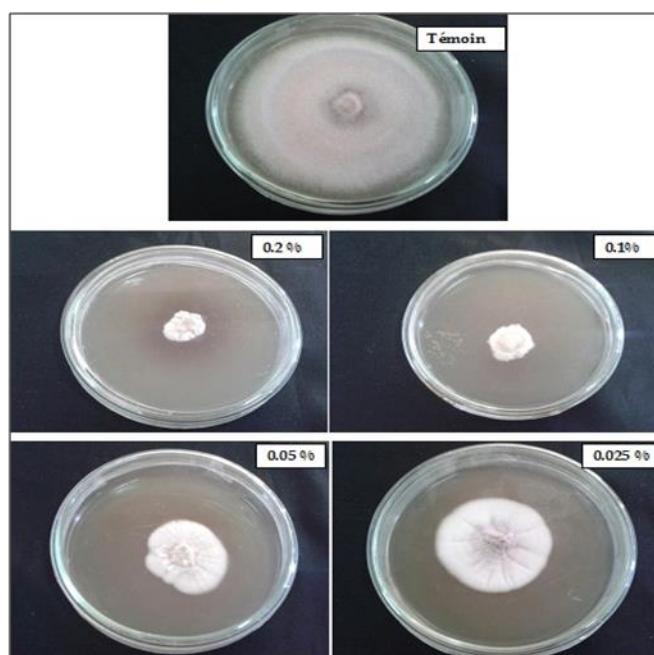


Figure 2 : Effet de différentes concentrations de l'HE étudiée sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* après la durée d'incubation.

À la lumière des résultats expérimentaux obtenus, il est clair que l'effet inhibiteur de la croissance mycélienne de la moisissure testée est proportionnel à la concentration en HE étudiée. Il augmente considérablement avec l'augmentation de la concentration, ce qui signifie que cette HE inhibe la croissance radiale du mycélium fongique d'une manière dose-dépendante et significative ($p < 0,05$). Ainsi, à faibles concentrations (0,05 et 0,1 % (v/v)), l'action de l'HE devient modérée (65,59 \pm 1,90 à 73,09 \pm 2,61 %) pour aboutir à un effet important d'inhibition de la croissance de 88,14 \pm 1,61 % à 0,2 % (v/v) sans atteindre une inhibition complète, ce qui signifie que la CMI est supérieure à 0,2 % ($> 2 \mu\text{L}/\text{mL}$).

Méthodes de micro-atmosphère :

Les résultats de l'activité inhibitrice de la fraction volatile de l'HE de graines d'*A. graveolens* sur la croissance du mycélium de *Botrytis* après 11 jours d'incubation, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sont regroupés dans le tableau 3 et la figure 3.

Tableau 3: Pourcentage d'inhibition (moyenne \pm écart type*) de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de la concentration de la vapeur de l'HE étudiée.

Concentration ($\mu\text{L}/\text{mL}$ d'air)	Pourcentage d'inhibition (moyenne \pm écart type*)
2 (160 $\mu\text{L}/\text{disque}$)	$100 \pm 0,00^a$
1 (80 $\mu\text{L}/\text{disque}$)	$80,19 \pm 0,81^b$
0,5 (40 $\mu\text{L}/\text{disque}$)	$65,71 \pm 0,00^c$
0,25 (20 $\mu\text{L}/\text{disque}$)	$49,42 \pm 0,81^d$
0,125 (10 $\mu\text{L}/\text{disque}$)	$18,28 \pm 0,40^e$

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

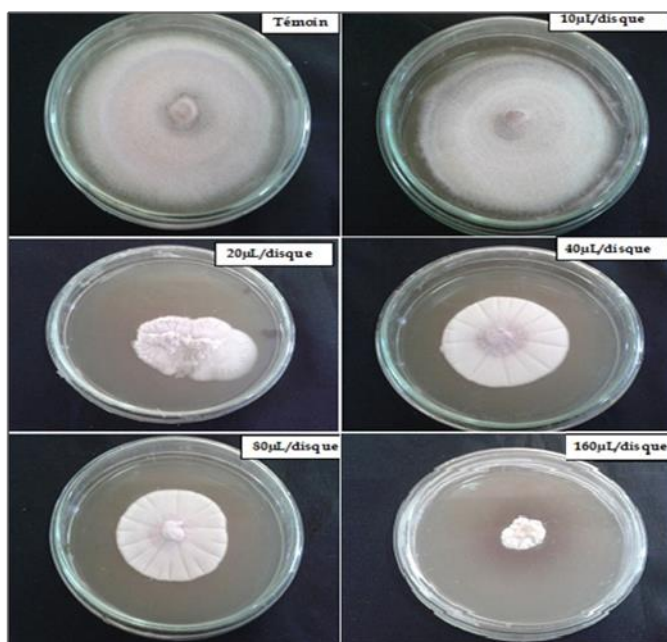


Figure 3 : Effet de différentes concentrations de la vapeur de l'HE d'*A. graveolens* sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* après la durée d'incubation.

Les résultats reportés dans le tableau montrent bien que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration de la vapeur de l'HE étudiée, suggérant que l'inhibition de la croissance mycélienne de la moisissure testée a été évaluée d'une manière dose-dépendante et significative ($p < 0,05$). Les résultats révèlent aussi que l'activité de l'HE d'*A. graveolens* est plus marquée dans sa fraction volatile. Elle a inhibé complètement la croissance mycélienne de la souche fongique testée à la CMI égale à 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'air (160 $\mu\text{L}/\text{disque}$). Par ailleurs, le transfert des disques mycéliens correspondants à cette CMI sur des nouveaux milieux PDA frais (sans HE) a montré qu'une croissance mycélienne de la souche fongique testée a été développée après quelques jours d'incubation suggère un effet fongistatique de la vapeur de l'HE d'*A. graveolens* contre *Botrytis cinerea* à 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'air. Ainsi, pour avoir un effet fongicide, la concentration minimale fongicide ou létale doit être supérieure à 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'air (CMI > 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'air).

D'une manière générale, l'activité antifongique d'une HE est liée étroitement à sa composition chimique, principalement à des groupes fonctionnels des composés majoritaires ou ceux susceptibles d'être actifs. Mais, 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 montre que l'activité antifongique de l'HE d'*A. graveolens* vis-à-vis de *B. cinerea* peut être probablement attribuée aux deux composés majoritaires qui sont des terpènes hydrocarbonés (limonène et β -séselinène) qui constituent 66,6 % de la composition globale de l'huile. En effet, le caractère hydrophobe des constituants hydrocarbonés des HEs permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire microbienne et des

mitochondries, perturbant les structures et les rendant plus perméables [23]. Ainsi, la fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors se produire [24].

Cependant, la valeur d'une HE tient à son « totum », c'est-à-dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires. Ainsi, les composés oxygénés qui constituent 18,8 % de cette huile peuvent être des molécules actives ou peuvent réagir d'une façon synergique avec les composés hydrocarbonés. En effet, le pouvoir antifongique des terpènes oxygénés est dû à leurs interférences avec les réactions enzymatiques lors de la synthèse de la paroi cellulaire induisant des altérations de la perméabilité cellulaire en perturbant la structure des lipides et entraînant ainsi des changements de propriétés des fonctions membranaires (Figure 4) [25,26].

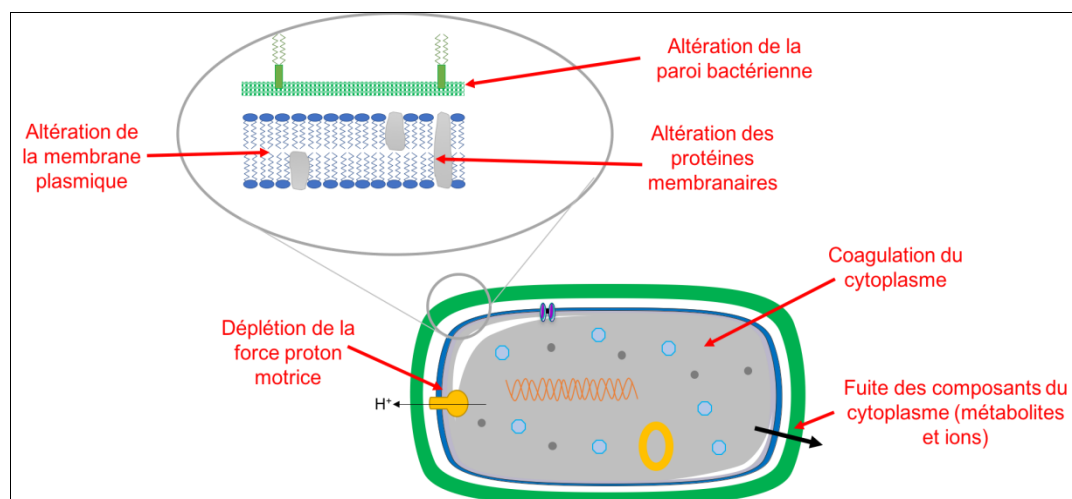


Figure 4 : Mécanisme d'action des huiles essentielles au niveau microbien.

Au cours de cette étude, nous avons remarqué que la fraction volatile de l'HE étudiée a montré une meilleure activité antifongique contre les phytopathogènes testés par rapport à la fraction liquide du contact direct sur milieu gélosé. Ce comportement peut être attribué à leur faible solubilité dans l'eau et par conséquent dans le milieu gélosé, en raison de leur caractère volatil et hydrophobe. Ce caractère rend l'HE plus absorbable par le mycélium fongique de nature lipophile que par le contact direct en milieu gélosé aqueux [27,28]. Par conséquent, l'utilisation de cette HE en phase vapeur semble être prometteuse pour le contrôle de certaines maladies de post-récolte en agroalimentaire [29].

5. CONCLUSION

La pourriture grise, causée par le champignon *Botrytis cinerea*, est parmi les principales maladies qui attaquent les pommes en post-récolte. La méthode la plus utilisée, pour lutter contre ce pathogène et réduire ainsi les pertes causées par ses attaques sur les pommes, est la lutte chimique par l'utilisation des fongicides. Cependant, l'utilisation fréquente de ces molécules chimiques entraîne l'apparition des souches fongiques résistantes et provoque des dangers d'être toxiques et polluant pour l'environnement, ce qui a conduit à rechercher d'autres molécules plus respectueuses de l'environnement et de la santé publique. Ainsi, l'utilisation des huiles essentielles est considérée comme une technique alternative très importante, en raison de leur avantage d'être sans danger pour l'homme et surtout biodégradables.

Dans ce contexte, nous avons évalué le pouvoir inhibiteur de l'HE d'une plante aromatique et médicinale de la région d'Errachidia en l'occurrence : *Apium graveolens* de la croissance mycélienne de cette moisissure. L'analyse chromatographique de cette HE a permis d'identifier 30 constituants, représentant 99,3 % de la composition globale de l'HE, dont le limonène et β -sélinène sont les principaux composants de cette huile avec des teneurs de 53,3 et 13,3 %, respectivement. Ces derniers peuvent être responsables l'activité antifongique de cette HE sur la croissance mycélienne de la moisissure testée. 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'HE 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 HE, en particulier, comme un fumigant pour le contrôle de certaines maladies de post-récolte.

6. REFERENCES

- Gatto M.A., Ippolito A., Linsalata V., Cascarano N.A., Nigro F., Vanadia S., Di Venere D. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 2011; 61:72-82.
- Tripathi P., Dubey N.K., Shukla A.K. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 24:39-46.
- Sharif M., Atiqur R., Yunus A., Sun Chul K. Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. *J. Pest. Biochem. Physiol.* 2010; 96: 86-92.
- Williams H.J., Phillips T.D., Jolly E.P., Stiles K.J., Jolly M.C., Aggrawal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, Potential health consequences, and interventions. *Amer. J. Clin. Nutr.* 2004; 80: 1106-1120.

5. Lahlali R., Serrhini M.N., Friel D., Jijakli M.H. Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 114: 1–9.
6. Suhr K.L., Nielsen, P.V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 94: 665-674.
7. Aguin O. Mansilla J.P., Maria J.S. In vitro selection of an effective fungicide against *Armillaria mellea* and control of white root rot of grapevine in the field. *Pest. Manag. Sci.* 2006; 62: 223–228.
8. Karmen V., Bojana B., Margareta V., Pohleven F. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *Int. Biodet. Biodeg.* 2003; 51: 51–59.
9. Butler M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 2008; 25 (3):475-51.
10. Gamez M.J., Jimenez J., Risco S., Zarzuelo A. Hypoglycemic activity in various species of the genus *Lavandula*. Part 1: *Lavandula stoechas* L. and *Lavandula multifida* L. *Pharmazie.* 1987; 10 (42): 706-707.
11. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 3rd ed, Strasbourg. 1997; 121-122
12. Dool H., Kratz P. A generalization of the retention index including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. *J. Chromat.* 1963; 11, 463-471.
13. Joulain D., König W.A. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. EbVerlag, Hamburg. 1998.
14. 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.
15. Adams R.P. Identification of essential oil components by gaz chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publ. Crop., Carol Stream, IL, USA, 2004.
16. Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., Sendide K., Remmal A. The mechanism of bactericidal action of Oregano and clove essential oils and their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essen. Oil Res.* 2003; 15: 286-292.
17. Soylu E.M., Kurt S., Soylu S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int. J. Food. Microbiol.* 2010; 143: 183–189.
18. Baananou S., Piras A., Marongiu B., Dessì M.A., Falconieri D., Porcedda S., Rosa A., Boughattas N.A. Antiulcerogenic activity of *Apium graveolens* seeds oils isolated by supercritical CO₂. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2012; 6 (10): 756-762.
19. Choochote W., Tuetun B., Kanjanapothi D., Rattanachanpichai E., Chaithong U., Chaiwong P., Jitpakdi A., Tippawangkosol P., Riyong D. Pitasawat B. Potential of crude seed extract of celery, *Apium graveolens* L., against the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *J. Vect. Ecol.* 2004; 29(2):340-346.
20. Hussain M.T.I., Ghufraan A., Nasreen J., Mehar A. Unani description of *Tukhme Karafs* (Seeds of *Apium graveolens* Linn) and its Scientific reports. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 2013; 2 (11): 88-93.
21. Palá-Paúl J., Brophy J.J., Goldsack, R.J., Fontaniella, B. Bioch. Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., an Canary Islands endemic species, growing in Australia. *Biochem. Syst. Ecol.* 2004; 32: 55– 62.
22. Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. J Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agri. Food Chem.* 2006; 54: 4364-4370.
23. Sikkema J., Bont J.A.M., Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 : 8022–8028.
24. Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antim. Agents Chemoth.* 2002; 46 : 1914–1920.
25. Zambonelli A., Zechini d’Aulerio A., Bianchi A., Albasini A. Effects of essential oil on phytopathogenic fungi. *Phytopathol.* 1996 ; 144: 491-494.
26. Inouye S., Tsuruoka T., Watanabe M., Takeo K., Akao M., Nishiyama Y. and Yamaguchi H. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses.* 2000; 43: 17–26.
27. Edris A.E., Farrag E.S. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Die Nahrung.* 2003; 47: 117-121.
28. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 2004; 94: 223-253.
29. El-Sayed, H.E.Z., Eman, S.H.F. Fumigation of Peach Fruits with Essential Oils to Control Postharvest Decay. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 2008; 4: 512-519.



Citer cet article: Ali Lboumhamdi, Mohamed Znini, Julien Paolini, Jean Costa, et Lhou Majidi. COMPOSITION CHIMIQUE ET BIOCONTROLE DE L'HUILE ESSENTIELLE DES GRAINES DE CELERI (*Apium graveolens* L.) CONTRE *BOTRYTIS CINEREA* APRES LA RECOLTE DES POMMES. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences.* 2018; 2(9): 292-300.

This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>