

Soumis le : 09 Octobre 2012

Forme révisée acceptée le : 16 Avril 2014

Email de l'auteur correspondant :

biomeriem@hotmail.com

Nature & Technology

Composition chimique et activité anti-fongique de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. sur milieu de laboratoire et sur les fruits du fraisier.

Meriem TOUAIBIA

Département de biologie. Université SAAD DAHLEB, Algérie. Email: biomeriem@hotmail.com

Résumé

Le but de ce travail est d'étudier la composition chimique et l'activité anti-fongique de l'huile essentielle extraite à partir des rameaux feuillés de l'espèce méditerranéenne *Myrtus communis* L. contre deux souches de champignons phytopathogènes et contaminants des fruits: *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* L'huile essentielle, analysée à l'aide de la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), est caractérisée par la présence de fortes teneurs en monoterpènes hydrocarbonés (α -pinène:15,93%, limonène:16,22%) en tant que composants chimiques principaux. L'activité anti-fongique de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. contre *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.*, a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats obtenus ont montré un effet inhibiteur prometteur contre les deux pathogènes testés. L'huile essentielle a également été testée in vivo sur des fraises, cet effet était très évident surtout lorsqu'elle est utilisée pure, montrant des différences significatives avec les échantillons non traités. Les données obtenues suggèrent l'utilisation de cette huile essentielle comme un potentiel agent naturel de conservation, pour améliorer la durée de vie des fraises en post-récolte.

Mots clés : *Myrtus communis* L, huile essentielle, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, activité anti-fongique, fraise.

Abstract

The aim of this work is to study the chemical composition and antifungal activity of the essential oil extracted from the leafy branches of the Mediterranean species *Myrtus communis* L. against two strains of phytopathogenic fungi and fruit contaminants: *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* The essential oil, analyzed using the technique of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), is characterized by the presence of high concentrations of hydrocarbon monoterpenes (α -pinene: 15,93 % limonene: 16,22%) as the main chemical components. The antifungal activity of the essential oil of *Myrtus communis* L. against *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.*, was evaluated using the agar diffusion method. The results showed promising inhibitory effect against both pathogens tested. The essential oil was also tested in vivo on strawberries, this effect was very obvious especially when used pure, showing significant differences against the untreated samples. The data obtained suggest the use of this essential oil as a natural and potential preservative agent to improve the shelf life of post-harvest strawberries.

Keywords: *Myrtus communis* L essential oil, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*; antifungal activity, strawberry.

1. Introduction

L'application excessive des fongicides de synthèse a été avverti suite à leur toxicité et à la pollution résiduelle qui en

découlent ainsi que leurs propriétés cancérigènes. De même, beaucoup de microorganismes pathogènes peuvent développer une résistance à ces fongicides. Pour cette raison, plusieurs travaux de recherches ciblent

actuellement la mise en évidence de nouvelles méthodes de lutte dite biologiques.

Cependant, plusieurs chercheurs ont mis le point sur les propriétés que possèdent certaines des huiles essentielles des plantes aromatiques, notamment contre différentes espèces fongiques [1,2]. Pour le conditionnement des fruits, différentes technologies ont été utilisées dans le but de ralentir l'accélération du processus de maturation et minimiser les détériorations microbiennes en post-récolte, comme l'application des rayonnements UV contre les moisissures, l'utilisation des polyamines exogènes afin de concurrencer l'éthylène, modifier l'atmosphère des lieux d'entreposage, etc. Mais, il semble que ces technologies ne sont pas suffisamment efficaces.

Actuellement, les huiles essentielles représentent un outil très intéressant pour allonger la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles riches en composés anti-microbiens et anti-oxydants peuvent être considérées comme alternative afin de résoudre les problèmes d'altération post-récolte liées aux contaminants et d'éviter la perte des qualités organoleptiques des fruits pendant l'entreposage [3]. Actuellement, dans le domaine du conditionnement des fruits destinés à couvrir le marché local européen ou bien destinée à l'exportation, plusieurs travaux de recherche portent sur l'utilisation de ces composés volatils comme un moyen de base dans les emballages actifs capables de les laisser diffuser lentement avec le temps [3]. Ce présent travail vise à évaluer l'effet anti-microbien *in vitro* de l'huile essentielle extraite à partir de *Myrtus communis* L. contre deux souches fongiques appartenant aux principaux genres de contaminants responsables de l'altération des denrées alimentaires notamment les fruits (*Aspergillus niger* et *Penicillium sp*), et enfin, optimiser l'étude *in vitro* par une application *in vivo* sur un fruit très sensible aux altérations d'origine fongique qui est la fraise.

2. Matériels et méthodes

2.1. Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle utilisée dans cette étude est une huile essentielle 100 % pure et naturelle du myrte (*Myrtus communis* L) extraite par entraînement à la vapeur, à partir d'un matériel biologique fraîchement récolté dans la région de Zaccar de la wilaya de Ain defla. L'essence récupérée est conservée à 4°C dans des flacons stériles en verre brun, hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière. L'identification de sa composition chimique a été réalisée par analyse chromatographique couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) selon la méthode décrite par Djenane et al [4].

2.2. Les souches fongiques

Les souches utilisées dans cette étude appartiennent à deux genres de moisissures: *Aspergillus* (*Aspergillus niger*) et *Penicillium* (*Penicillium sp*). Ces souches proviennent du laboratoire de mycologie de l'université SAAD DAHLEB de BLIDA. Les souches ont été reçues dans des boîtes de pétri sur milieu PDA.

2.3. Evaluation *in vitro* de l'activité anti-fongique

Les spores des jeunes cultures (cultures de 3 jours) de chaque souche sont récupérées dans un volume de 5 ml d'eau physiologique stérile, à partir de cette suspension mère, on prépare les différentes dilutions dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile.

La détermination de la densité optique (DO) de la suspension fongique est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm dans le but de standardiser la suspension de spores à 10⁷ spores/ml. On estime qu'une DO de 0,04 correspond à une concentration de 10⁷ spores/ml.

L'aromatogramme est une technique qualitative qui permet la détermination de la sensibilité des micro-organismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne. Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les disques d'antibiotiques sont remplacés par des disques stériles imprégnés par les substances à tester. Cette méthode, repose sur le pouvoir migratoire de ces substances sur milieu gélosé solide.

On ensemence des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, contenant le milieu gélosé Sabouraud additionné de chloramphénicol à partir des suspensions contenant 10^7 spores/ml (l'ensemencement est fait par l'étalement de 100 μ l de cette suspension dans chaque boîte), puis on les incube à 30°C pendant 15 à 20 minutes.

Des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre sont chargés avec des volumes croissants de l'huile essentielle (20, 30, 40 et 60 μ l) à l'aide d'une micropipette, puis déposés sur la gélose inoculée préalablement avec les suspensions fongiques. Les boîtes de pétri sont incubés à 30°C pendant 3 jours. La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions (exprimés en mm). Chaque diamètre est représenté par la moyenne de trois mesures.

2.4. Application de l'huile essentielle sur la fraise

Avant de tester l'effet d'huile essentielle, on a d'abord testé la sensibilité des fraises aux souches fongiques étudiées (*Penicillium sp* et *Aspergillus niger*) avec la même méthode que celle de la préparation des échantillons témoins dans ce test in vivo. Le protocole utilisé est celui décrit par Alilou et al [5] sur les fruits de clémentine.

Après lavage avec l'eau javellisée diluée à 10% et rinçage (trois fois) avec de l'eau distillée stérilisée, les fruits bien égouttés sont inoculés par inondation avec des souches fongiques de 10^7 spores/ml, préparées de même façon que le test in vitro et toujours à partir des jeunes cultures âgées de trois jours, cela est fait par trempage des fruits dans un bécher contenant la suspension fongique,

ensuite laisser s'égoutter. Chaque fruit inoculé de suspension fongique a été déposé dans une boîte de Pétri, puis inondé d'huile essentielle (brute et diluée à 1/2 dans l'éthanol à 50%) à l'aide d'une pipette Pasteur (1ml d'extrait sur chaque fruit). L'observation est prolongée pendant 5 jours. Des témoins sont aussi préparés et inoculés par chaque souche fongique mais sans addition d'huile essentielle. Chaque essai est répété six fois.

3. Résultats et discussions

3.1. Composition chimique de l'huile essentielle

Les analyses chromatographiques de l'huile essentielle ont permis d'identifier 62 composés avec un taux de reconnaissance de 95,98%, caractérisée par les pics majoritaires suivants (tableau 1):

On note la présence d'une forte proportion en monoterpènes hydrocarbonés, caractérisée par la présence de deux fractions majoritaires: le limonène et l' α -pinène avec des valeurs respectives de 16,22% et 15,93%. Un autre composé majoritaire est observé, il s'agit de l'octadiénol avec un taux de 15,04%, suivi par le 1,8 cinéole (9,12%). Trois sesquiterpènes hydrocarbonés: le bornylène, l' α -caryophyllène et l' α -patcoulène ont été identifiés avec des valeurs respectives de 4,64 %, 4,14% et 1,38 %. Trois alcools monoterpéniques ont été détectés dans cette huile essentielle, il s'agit du linalool (7,49%), du bergamiol (3,13%) et de l' α -terpinéol (4,30%).

3.2. Résultats du test de sensibilité à l'huile essentielle

Les résultats du test de sensibilité d'*Aspergillus niger* à l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. par la méthode d'aromatogramme sont représentés dans la figure 1. Alors que ceux relatifs au test de sensibilité de *Penicillium sp* à l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. sont représentés dans la figure 2 ainsi que dans le tableau 2.

Tableau 1

Composés majoritaires de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L.

N°	Composé identifié	Pourcentage (%)	IK (Indice de Kovàts)
1	α -pinène	15,93	09.12
2	Limonène	16,22	11.04
3	1,8 cinéol	09,12	12.10
4	Octadienol	15,04	16.66
5	Bornylène	04,64	20.63
6	α -terpinéol	04,30	21.40
7	Linalool	07,49	24.97
8	Bergamiol	03,13	32.75
9	α -caryophyllène	04,14	35.88
10	α -patcoulène	01,38	43.55
Classes biochimiques des composés identifiés dans l'huile essentielle			
	Monoterpènes	32,150	
	Esters terpéniques	08,520	
	Sesquiterpènes	10,160	
	Cétones	00,077	
	Oxydes terpéniques	03,480	
	Alcools terpéniques	39,080	
	Aldéhydes terpéniques	02,513	
TOTAL		95,980	
Chémotype étudié		<i>Limonène/α-pinène</i>	

Tableau 2

Effet de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. sur la croissance des souches étudiées (exprimée en diamètre de la zone d'inhibition^{*})

Souche fongique	20 μ l	30 μ l	40 μ l	60 μ l
<i>Aspergillus niger</i>	14,33 \pm 0.2	58,50 \pm 1.7	70,25 \pm 0.3	78,0 \pm 0.8
<i>Penicillium sp</i>	34,16 \pm 0.6	46,50 \pm 0.3	47,82 \pm 1.08	49,77 \pm 2.01

^{*}Le diamètre moyen \pm écart type en mm.

Les deux souches se sont montrées sensibles à tous les volumes testés de l'huile essentielle, sauf vis-à-vis de

Aspergillus niger qui a montré une sensibilité moyenne au volume 20 μ l. Cette activité anti-fongique peut être attribuée à ses constituants majoritaires: 1,8 cinéol (éthers), α -pinène et limonène (monoterpènes) mais aussi à ses constituants minoritaires: α -terpinéol, linalool, bergamiol (alcools terpéniques) et l' α -caryophyllène (sesquiterpènes).

Les monoterpènes tels que l' α -pinène et le limonène sont parmi les composants majeurs qui contribuent à une forte activité anti-microbienne du *Myrtus communis* [6].

Selon Randrianarivelo [7], les constituants minoritaires sont également connus pour leur activité anti-microbienne.

Les alcools, les aldéhydes et les esters peuvent contribuer à l'effet anti-microbien global des huiles essentielles [8].

Selon Derwich et al [8], l'activité anti-microbienne des monoterpènes est expliquée par la présence des groupes d'hydroxyles phénoliques capables de former des liaisons hydrogènes avec les emplacements actifs des enzymes de la cellule ciblée.

On constate qu'il y a une relation proportionnelle entre le volume administré et l'effet anti-microbien, plus on augmente le volume, plus le diamètre de la zone d'inhibition augmente, ceci peut être dû à la présence de plus de composés actifs avec l'accroissement du volume d'huile essentielle. Des résultats similaires ont été rapportés par les travaux de Degryse et al [9].

3.3. Résultats de l'activité antifongique sur la fraise

Les résultats du test anti-fongique sur les fraises montrent que l'huile essentielle pure de *Myrtus communis* a exercé un effet inhibiteur très important vis-à-vis des

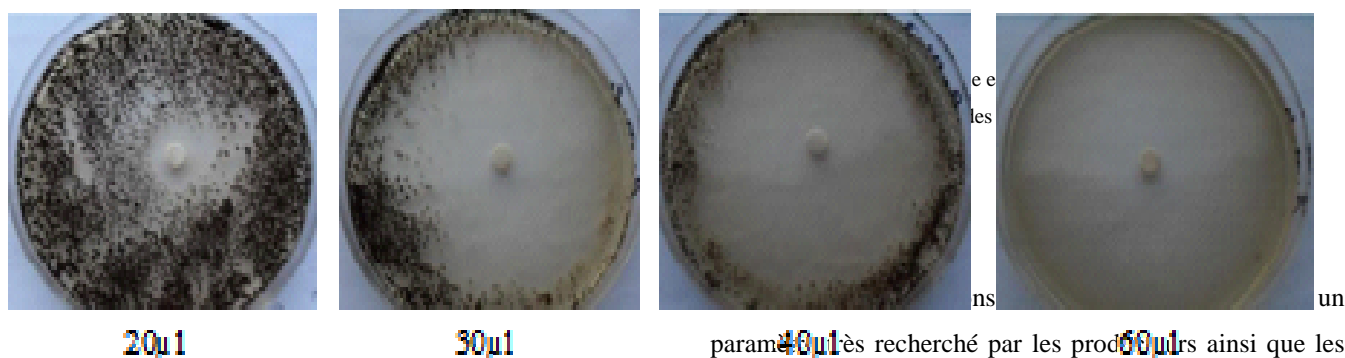


Figure 1 : Photos montrant les zones d'inhibition provoquées par les différents volumes de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. sur *Aspergillus niger*.

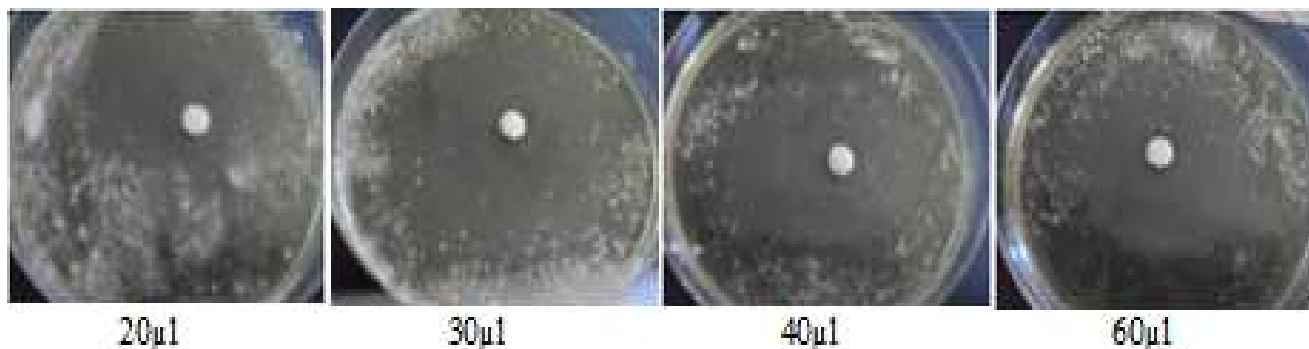
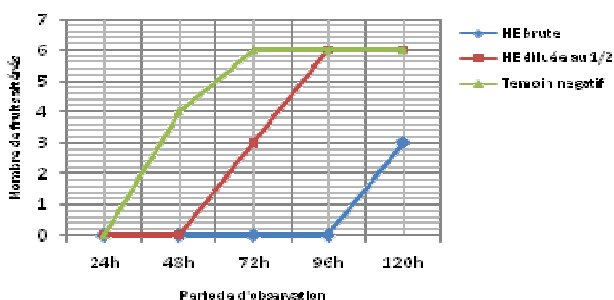


Figure 2 : Photos montrant les zones d'inhibition provoquées par les différents volumes de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. sur *Penicillium sp.*

deux souches étudiées (*Aspergillus niger* et *Penicillium sp.*) et cette activité a été maintenue même après 72h (figure 3).

Donc cette huile est très efficace pour la protection des fraises contre l'altération rapide en post-récolte. Cette efficacité peut être due à la nature du fruit qui est pauvre en éléments gênants de l'activité des huiles essentielles comme les protéines et les lipides d'une part, et à la présence des quantités limitées en oxygène d'autre part.

Les résultats de notre étude, nous ont permis de prédire que les substances naturelles telles que l'huile essentielle de *Myrtus communis* L peuvent constituer une source très efficace de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer les infections d'origine fongique, et conserver certains fruits qui s'altèrent rapidement en post-récolte comme les fraises.



Références bibliographiques

- [1] C.O Adebayo et B.L Aderiyi. Antifungal activity of bacteriocins of lactic acid bacteria from some Nigerian fermented foods. Research Journal of Microbiology. (2010). 5, 1070-1082.

- [2] M.N Nagendra Prasad, S Shankara Bhat et M.Y Sreenivasa. Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*: the causative agent of die-back disease of neem. Journal of Agricultural Technology. (2010). 6, 127-133.
- [3] M.A Serrano, D Martinez-Romero, F Guillen, J.M Valverde, P.J Zapata., S Castillo et D Valero. The addition of essential oils to MAPas a tool to maintain the overall quality of fruits. Trends in Food Science & Technology. (2008). 19, 464-471.
- [4] D Djenane, J Yanguela, L Montanés, M Djerbal et P Roncales. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media; efficacy and synergistic potential in minced beef. Food Control. (2011). 22, 1046-1053.
- [5] H Alilou, M Akssira, L.M Idrissi Hassani, A El Hakmoui, F Mellouki, R Rouhi, H Boira, A Blasquez et B Chebli. Chemical composition and antifungal activity of *Bubonium imbricatum* volatile oil. Phytopathologia Mediterranea. (2008) 47, 3–10.
- [6] I Rasooli, M.L Moosavi, M.B Rezaee et K Jaimand. Susceptibility of microorganisms to *Myrtus Communis* L. essential oil and its chemical composition. Journal of Agricultural Science and Technology. (2002). 4, 127-133.
- [7] R Randrianarivelo, S Sarter, E Odoux, P Brat, M Lebrun, B Romestand, C Menut, H.S Andrianoelisoa, M Raherimandimby et P Danthu. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. Food Chemistry. (2008). 114, 680-684.
- [8] E Derwich, A Manar, Z Benziane et A Boukir. GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. World Applied Sciences Journal. (2010). 8, 1267-1276.
- [9] A.C Degryse, I Delfa et M.A Voinier. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique. (2008). 94, 8-11.