



Biologie et pathologie végétales/Plant biology and pathology

Efficacité des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales contre la pourriture grise de la tomate au Maroc



Effectiveness of aqueous extracts of aromatic and medicinal plants against tomato grey mould in Morocco

Manal Kasmi^{*}, Mohammed Aourach, Mohammed El Boukari, Said Barrijal, Haiat Essalmani

Laboratoire de valorisation biotechnologique des microorganismes, génomique et bioinformatique, département des sciences de la vie, faculté des sciences et techniques, université Abdelmalek-Essaadi, B.P. 416, Tanger, Maroc

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 21 mars 2016

Accepté après révision le 25 juillet 2017

Disponible sur internet le 23 août 2017

Mots clés :

Botrytis cinerea

Extrait aqueux

Plantes médicinales et aromatiques

Activité antifongique

Tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Keywords:

Botrytis cinerea

Aqueous extract

Medicinal and aromatic plants

Antifungal activity

Tomato (*Lycopersicon esculentum*)

RÉSUMÉ

La pourriture grise est l'une des principales maladies menaçant la tomate marocaine. Cette maladie est contrôlée souvent par des fongicides. Or, ces derniers constituent un véritable danger pour la santé humaine et l'environnement. Ainsi, cette étude s'inscrit dans le cadre de recherche des alternatives, inoffensives et non polluantes, telles les extraits de plantes aromatiques et médicinales. Dans la présente étude, les extraits de quatre plantes médicinales et aromatiques (*Lavandula officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* et *Melissa officinalis*) ont été testés pour leur pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* sur *Botrytis cinerea*. Les résultats obtenus révèlent qu'*in vitro*, les extraits aqueux de *Lavandula officinalis*, *Thymus vulgaris* et *Cymbopogon citratus* possèdent tous une activité antifongique importante, alors que *Melissa officinalis* se montre la moins efficace. Par ailleurs, les extraits aqueux de *Cymbopogon citratus* et de *Thymus vulgaris* sont les plus efficaces sur les plantes, tandis que ceux de *Melissa officinalis* et *Lavandula officinalis* n'ont aucun effet sur le pathogène. Sur le fruit, seul l'extrait aqueux de *Cymbopogon citratus* s'avère le plus efficace contre *B. cinerea*. Par conséquent, les extraits aqueux de *Cymbopogon citratus* et de *Thymus vulgaris* sont les plus envisageables pour le contrôle biologique de la pourriture grise.

© 2017 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Grey mould is a major disease threatening the Moroccan tomato; this disease is often controlled by fungicides. However, the latter are a real danger to human health and environment. Thus, this study is part of the research of harmless alternatives such extracts of aromatic and medicinal plants (*Lavandula officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus*, and *Melissa officinalis*). In this study, the extracts of four medicinal and aromatic plants were tested for their antifungal potency *in vitro* and *in vivo* in order to select the most effective. The results show that, *in vitro*, the *Lavandula officinalis*, *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon citratus* aqueous extracts all possess significant antifungal activity, whereas

^{*} Auteur correspondant.

E-mail addresses: manal_kasmi@yahoo.fr (M. Kasmi), hessalmani@hotmail.com (H. Essalmani).

Melissa officinalis shows the least effective. Also *in vivo* only the aqueous extract of *Cymbopogon citratus* proves most effective against *B. cinerea* on tomato fruit. The test of the plants confirms that aqueous extracts of *Cymbopogon citratus* and *Thymus vulgaris* are most effective, while the aqueous extracts of *Melissa officinalis* and *Lavandula officinalis* always seem to be the least effective. Therefore, the aqueous extracts of *Cymbopogon citratus* and *Thymus vulgaris* are the most envisaged for the biological control of grey mould.

© 2017 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abridged English version

Gray mould is a fungal disease caused by *Botrytis cinerea*, which is a parasitic fungus of many higher plants. This fungus has the distinction of being able to address various plants as soon as weather conditions are favourable. It is able to grow both in saprophyte on plant debris, that parasite at the expense of a living plant. The damages caused by this fungus are economically important, as it destroys each year a portion of strawberries, cucumbers, and tomato crops. In Morocco, this disease is listed among the most dreaded diseases of tomato in the greenhouse. Besides, grey mould is present in 96% of Moroccan exploitations.

Botrytis cinerea is mainly controlled by fungicides. However, the use of chemicals is not without consequences on the environment and human health; in addition, it promotes the emergence of resistant pathogenic strains. Therefore, alternatives have become increasingly planned against this pathogen. These alternatives are generally biopesticides or biocontrol agents, which can be defined as pesticides whose active ingredient is a living organism or one of its derivatives. They can also be substances of natural origin such as plant extracts, pheromones, etc. Thus, the crude extracts of the plants start to have a lot of interest as potential sources of natural bioactive molecules. They showed antifungal activity against a wide spectrum of pathogenic fungi. In this context, the objective of this work is to test *in vitro* and *in vivo* the effect of aqueous extracts of four medicinal and aromatic plants (*Cymbopogon citratus*, *Lavandula officinalis*, *Thymus vulgaris* and *Melissa officinalis*) against tomato grey mould, and also to analyse their chemical composition.

In vitro aqueous extracts were tested for their inhibitory effect on the three life stages of *B. cinerea*: spore germination, mycelial growth, and sporulation.

These aqueous extracts were tested *in vivo* for their antifungal potency for the plant and the fruit of the tomato.

Our *in vitro* results show that all studied aqueous extracts inhibited the three stages of development of *B. cinerea*, but to different degrees and are dose dependent. On spore germination, the aqueous extract of *Lavandula officinalis* was the most effective in inhibiting $79.65\% \pm 2.17$ of spore germination at a concentration of 1 mg/mL. As for the effect on mycelial growth and sporulation of *Botrytis cinerea*, the aqueous extract of *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris* have proven most effective, while the aqueous extract of *Melissa officinalis* has proved less effective, in particular on mycelial growth and sporulation of *Botrytis cinerea*. Generally, comparing the effect of the aqueous extracts studied on the three life stages of *Botrytis*

cinerea, it is noted that they all exert a significant inhibitory effect, especially on spore germination and sporulation, which reaches for some aqueous extracts $98.99 \pm 1\%$ and $85.99 \pm 1.52\%$, respectively, rather than on the growth or percent inhibition of all the studied aqueous extracts, which does not exceed 50%. These results are encouraging because some studies have shown that epidemics caused by *Botrytis cinerea* are initiated largely by conidia produced locally within the culture, which allows the fungus to infect the different parts of the plant including the fruits.

As for *in vivo* tests on the plant, the aqueous extract of *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon citratus* gave high inhibitory effects that are similar statistically, while the extracts of *Lavandula officinalis* and *Melissa officinalis* have no inhibitory effect on *Botrytis cinerea*. On the fruit, the *Cymbopogon citratus* aqueous extract shows a high inhibitory power on *Botrytis cinerea*, relative to the aqueous extract of *Thymus vulgaris* and *Lavandula officinalis*; the *Melissa officinalis* extract still remains without marked inhibitory effect.

By analysing the chemical composition of the aqueous extracts studied, it appears that all the studied aqueous extracts contain gallic tannins with a higher concentration in aqueous extracts of *Thymus vulgaris* and *Melissa officinalis*. About saponins, all the studied aqueous extracts contain these metabolites, except the aqueous extracts of *Melissa officinalis*. The presence of saponins in a more concentrated way is noticed in aqueous extracts of *Thymus vulgaris* and *Lavandula officinalis*. The assay of total polyphenols shows that there is a significant difference between the content of total phenols in the aqueous extract of *Melissa officinalis* (0.78 ± 0.09 mg/g) compared with other aqueous extracts. As for the flavonoids, they represent 97.9% of total phenols in aqueous extracts of *Cymbopogon citratus*, while flavonoids rates in other aqueous extracts studied do not exceed 25%. In the light of the results obtained and as a result of their antifungal effects demonstrated *in vivo* against *B. cinerea*, it appears that aqueous extracts of *Cymbopogon citratus* and *Thymus vulgaris* are the most effective and feasible for biological control against grey mould.

In conclusion, it appears that the use of aqueous extracts of plants in the fight against *B. cinerea* is promising given their effectiveness and environmental safety. The aqueous extracts are also cheaper and cost-effective compared with essential oils that contain volatile substances, therefore, having a temporary effect.

1. Introduction

La pourriture grise est une maladie causée par *Botrytis cinerea*, un champignon parasite de très nombreux

végétaux supérieurs [1]. Ce champignon a la particularité d'être polyphage et ainsi de s'attaquer à diverses plantes dès que les conditions climatiques lui sont favorables [2]. Il est capable de se développer aussi bien en saprophyte, sur des débris végétaux, qu'en parasite, aux dépens d'une plante vivante. La pourriture grise due à ce champignon est économiquement importante, car elle détruit chaque année une partie des récoltes viticoles et horticoles (fraises, concombres, tomates...). Au Maroc, la pourriture grise est répertoriée parmi les maladies les plus redoutables en culture de tomate sous serre. D'ailleurs la pourriture grise est présente dans 96 % des exploitations marocaines [3]. *Botrytis cinerea* est contrôlée essentiellement par des fongicides. Cependant le recours aux produits chimiques n'est pas sans conséquences sur l'environnement et la santé de l'homme, en outre, il favorise l'apparition de souches pathogènes résistantes [4]. Par conséquent, d'autres alternatives sont de plus en plus envisagées pour lutter contre ce pathogène. Ces alternatives sont généralement des biopesticides ou des agents de lutte biologique, qui peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent aussi être des substances d'origine naturelle telles que des extraits végétaux, phéromones, etc. [5]. Ainsi, les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils ont montré une activité antifongique contre un large spectre des champignons pathogènes [6,7].

Dans ce cadre, l'objectif de ce travail consiste à tester *in vitro* et *in vivo* l'effet des extraits aqueux de quatre plantes médicinales et aromatiques contre la pourriture grise de la tomate, et aussi à analyser leur composition chimique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Agent pathogène

Des plants de tomate infectés par la pourriture grise ont été collectés de la région de Chichaoua (Marrakech). Neuf isolats de l'agent pathogène *B. cinerea* ont été isolés des différentes parties de la plante. Ils ont été purifiés et identifiés, puis testés pour leur pouvoir pathogène. Parmi les neuf isolats, l'isolat *Bt1* s'est avéré le plus pathogène, et a par conséquent retenu pour l'expérimentation.

2.1.2. Plantes médicinales et aromatiques

Quatre plantes médicinales et aromatiques (*Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis*, *Lavandula officinalis*, *Cymbopogon citratus*) ont été collectées dans la pépinière de la faculté des sciences et techniques de Tanger, puis identifiées par le professeur M. Bakkali selon le catalogue des plantes vasculaires et les manuels de détermination de ces dernières [8].

2.1.3. Plants de tomate

La variété Campbell 33 a été choisie pour l'expérimentation. Les pépinières de tomate ont été réalisées dans le sable stérile, selon la méthode décrite par Mouria et al. [9]. Les plantes obtenues sont arrosées régulièrement et

maintenues dans une chambre de culture sous des conditions déterminées et contrôlées (21 °C, photopériode de 16 h), pour servir à l'expérimentation.

2.2. Préparation des extraits aqueux

Les plantes médicinales ont été séchées à l'abri de la lumière, puis broyées pour préparer des infusions en portant à ébullition, pendant 15 min, 16 g de la poudre de chaque plant dans 100 mL d'eau distillée. L'extrait obtenu a été filtré, puis centrifugé pour éliminer les débris des plantes. Le surnageant a été récupéré et filtré sous vide, puis conservé à l'obscurité à 4 °C.

2.3. Effet antifongique, des extraits aqueux, in vitro

L'activité antifongique des extraits aqueux a été étudiée, selon la méthode de contact direct, sur la germination des spores, la croissance mycélienne et la sporulation.

2.3.1. Effet des extraits aqueux sur la germination des spores

Les extraits aqueux sont ajoutés au milieu gélosé en surfusion (45 °C), à des concentrations de 1, 2, 4, 8 mg/mL. Après sa solidification, 10 µL d'une suspension de spores (10⁴ spores/mL d'eau distillée stérile) sont étalés aseptiquement à la surface de ce milieu. Après 48 h d'incubation à 21 ± 2 °C et à l'obscurité, le comptage des spores germées est effectué sous microscope, sur un total de 100 spores.

2.3.2. Effet des extraits aqueux sur la croissance mycélienne et la sporulation

Des quantités appropriées de chaque extrait aqueux sont ajoutées au milieu de culture stérile encore liquide pour obtenir des concentrations finales de 1, 2, 4 et 8 mg/mL. Après solidification, un explant mycélien de *B. cinerea* âgé de 14 j est déposé au centre de chaque boîte. La croissance mycélienne est évaluée après cinq jours d'incubation à 23 ± 2 °C par mesure du diamètre moyen du thalle.

Tous les thalles ayant servi pour évaluer la croissance mycélienne et ayant été incubés pendant 14 jours ont été utilisés pour l'évaluation de l'intensité de la sporulation. Dix disques de 5 mm de diamètre ont été prélevés de la bordure d'un même thalle, écrasés et agités dans 1 mL d'eau distillée stérile. L'intensité de la sporulation est évaluée par comptage des spores à l'aide d'une cellule de Malassez.

2.3.3. Évaluation de l'activité inhibitrice

Dans chaque test l'indice antifongique (IAF) de chaque extrait est déterminé par la formule suivante :

$$\text{IAF} (\%) = [(X - X_i) / X] \times 100$$

Avec X l'estimation de la germination, de la croissance ou de la sporulation en absence des extraits aqueux et X_i l'estimation de la germination, de la croissance ou de la sporulation en présence des extraits aqueux.

2.4. Efficacité des extraits aqueux sur *Botrytis cinerea*, in vivo

2.4.1. Essai sur les plantes

Des plantules de tomate âgées de 30 j ont été traitées par pulvérisation de 1 mL d'extrait aqueux sur les feuilles.

Après 24 h, un explant mycélien de 2 mm de diamètre a été déposé sur l'une des jeunes feuilles de chaque plante. Les plantules ont été ensuite placées dans une chambre de culture à 23 ± 2 °C. Une humidité élevée a été assurée par la couverture des feuilles traitées et inoculées par des housses en plastique. Après 15 j, l'efficacité des extraits aqueux des plantes médicinales est évaluée par la mesure du diamètre moyen de la pourriture au niveau des feuilles.

2.4.2. Essai sur le fruit

Des fruits de tomate, de la variété Campbell 33, uniformes et sains, ont été stérilisés par l'éthanol à 70°, puis rincés avec de l'eau distillée stérile et séchés avec du papier filtre stérile. Des blessures de 3 mm de profondeur ont été réalisées avec des aiguilles de 2 mm de diamètre en trois points différentes de la zone équatoriale. Une goutte de 20 µL de chaque extrait est placée dans les blessures. Après 2 h, un explant mycélien de 2 mm de diamètre a également été déposé dans celles-ci. Les fruits sont ensuite placés à l'obscurité dans des conditions d'humidité élevée en les couvrant par des housses en plastique. Après une période de 7 j d'incubation dans une chambre de culture à 21 ± 2 °C, le diamètre moyen de la pourriture a été mesuré.

2.5. Tests phytochimiques

Les extraits aqueux étudiés ont été soumis à des analyses qualitatives et quantitatives de certains métabolites secondaires, celles-ci étant basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation.

2.5.1. Analyses qualitatives

2.5.1.1. Recherche des tanins. Les tanins ont été mis en évidence en mélangeant 1 mL de l'extrait avec quelques gouttes de FeCl_3 (1 %, préparé au méthanol). Après agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence des tanins galliques et au brun verdâtre en présence des tanins catéchiques [10].

2.5.1.2. Recherche des saponines. Les saponines ont été mises en évidence en agitant 10 mL d'extrait placé dans un tube à essais pendant 15 s. Après 15 min de repos, la hauteur de la mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponines [11].

2.5.2. Analyses quantitatives

2.5.2.1. Dosage des phénols totaux. La teneur en phénols totaux des extraits aqueux étudiés a été déterminée par la méthode de Folin–Ciocalteu [12]. Un volume de 200 µL d'extrait aqueux a été mélangé avec 1 mL du réactif de Folin–Ciocalteu récemment préparé (dilué 10 fois) et 0,8 mL de Na_2CO_3 à 7,5 %. L'ensemble a été incubé à température ambiante pendant 30 min et la lecture a été effectuée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche.

2.5.2.2. Dosage des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes des extraits aqueux a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium

[13]. Un volume de 100 µL de l'extrait aqueux a été mélangé avec 0,4 mL d'eau distillée, puis avec 0,03 mL d'une solution de nitrite de sodium NaNO_2 à 5 %. Après 5 min, 0,02 mL d'une solution d' AlCl_3 à 10 % a été ajouté. Après 5 min, 0,2 mL d'une solution de Na_2CO_3 1 M et 0,25 mL d'eau distillée ont été ajoutés au mélange. L'ensemble a été agité à l'aide d'un vortex et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de catéchine par gramme de matière végétale sèche.

2.6. Analyse statistique

Toutes les expériences réalisées ont été répétées deux fois avec trois répétitions pour les tests *in vitro* et sept répétitions pour les tests *in vivo*. Les résultats obtenus ont subi une analyse de la variance (Anova) selon le test Post-hoc de Tukey ($p=0,05$) en utilisant le programme de statistique STATISTICA 8 (version 5,1 Edition 2008, STATSOFT).

3. Résultats

3.1. Effet *in vitro*, des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales

Tous les extraits aqueux étudiés ont inhibé les trois stades de développement de *B. cinerea*, mais à des degrés différents et les effets sont dépendants de la dose (Fig. 1). En ce qui concerne la germination des spores, l'extrait aqueux de *Lavandula officinalis* s'est montré le plus efficace, avec une inhibition de $79,65 \pm 2,17$ % à la concentration de 1 mg/mL. Quant à l'effet sur la croissance mycélienne et la sporulation de *Botrytis cinerea*, les extraits aqueux de *Cymbopogon citratus* et de *Thymus vulgaris* se sont révélés les plus efficaces, tandis que l'extrait aqueux de *Melissa officinalis* s'est révélé moins efficace. D'une manière générale, en comparant l'effet des extraits aqueux étudiés sur les trois stades de vie de *Botrytis cinerea*, on remarque que les effets inhibiteurs les plus importants concernant la germination et la sporulation, atteignent pour certains extraits aqueux, soit $98,99 \pm 1$ % et $85,99 \pm 1,52$ % respectivement. En revanche, sur la croissance, le pourcentage d'inhibition de tous les extraits aqueux étudiés ne dépasse pas 50 %.

3.2. Effet *in vivo* des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales

Les résultats de l'effet antifongique des quatre extraits aqueux sont reportés dans le Tableau 1. Sur la plante, au niveau des feuilles, les extraits aqueux de *Thymus vulgaris* et de *Cymbopogon citratus* se sont révélés avoir des effets inhibiteurs élevés et statistiquement similaires. En revanche, les extraits aqueux de *Lavandula officinalis* et de *Melissa officinalis* n'ont pratiquement pas d'effet inhibiteur sur *Botrytis*, puisqu'il n'y a pas de différences significatives avec le témoin positif.

Sur le fruit, l'extrait aqueux de *Cymbopogon citratus* montre un pouvoir inhibiteur élevé sur le développement de la pourriture, suivi par l'extrait aqueux de *Lavandula*

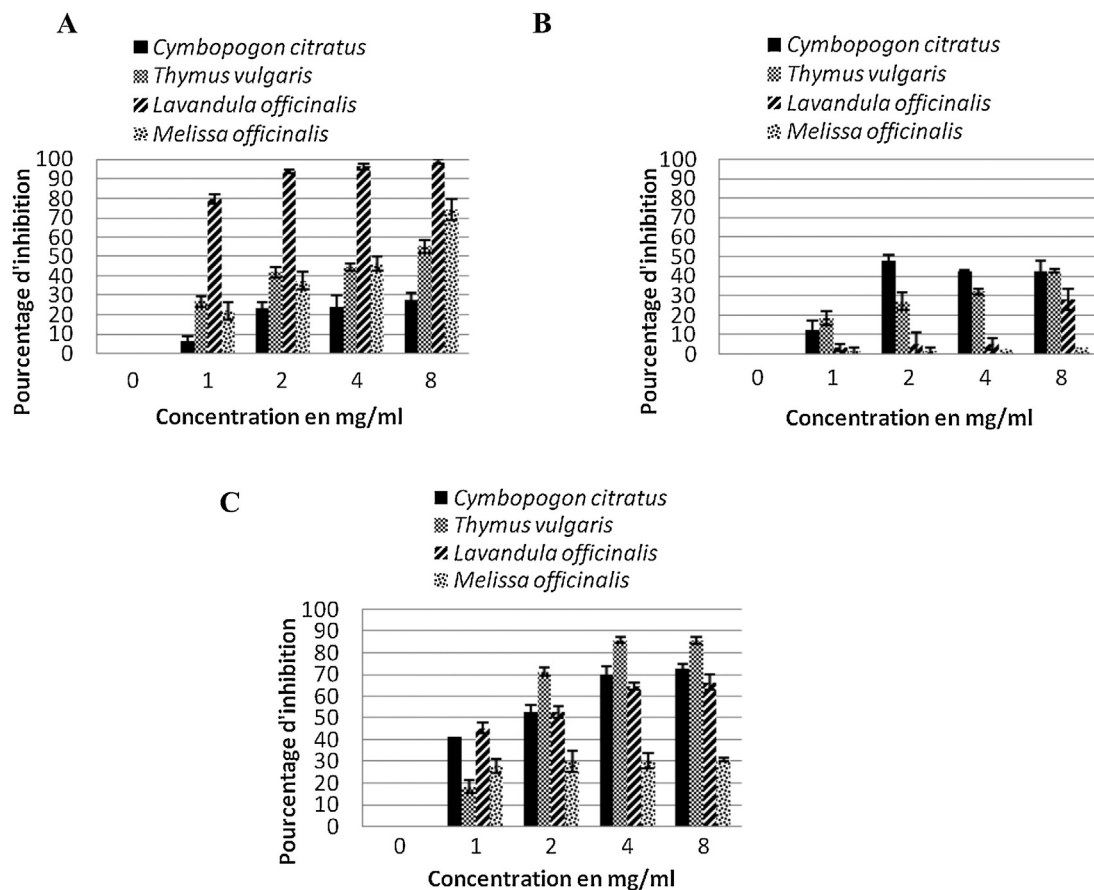


Fig. 1. Effet antifongique des extraits aqueux sur la germination (A), la croissance mycélienne (B) et la sporulation (C). Les tests ont été réalisés à raison de six répétitions avec une analyse de la variance (Anova) selon le test post-hoc de Tukey ($p=0,05$).

Tableau 1

Activité antifongique des quatre extraits aqueux contre *B. cinerea*, *in vivo*.

| Extraits aqueux | Diamètre moyen de la pourriture sur la feuille (en cm) | Diamètre moyen de la pourriture du fruit (en cm) | Diamètre moyen de la zone sporulée sur le fruit (en cm) |
|------------------------------|--|--|---|
| <i>Cymbopogon citratus</i> | 0,87 ± 0,49 (a) | 1,75 ± 0,44 (b) | 0,35 ± 0,11 (ab) |
| <i>Thymus vulgaris</i> | 0,42 ± 0,66 (a) | 3,12 ± 0,39 (c) | 0 ± 0 (a) |
| <i>Lavandula officinalis</i> | 2,67 ± 0,39 (b) | 2,87 ± 0,32 (c) | 1,17 ± 0,19 (b) |
| <i>Melissa officinalis</i> | 3,2 ± 0,39 (b) | 4,22 ± 0,23 (d) | 2,21 ± 0,85 (c) |
| Témoin <i>B. c</i> | 3,17 ± 0,75 (b) | 5,87 ± 0,86 (e) | 2,75 ± 0,62 (c) |
| Témoin négatif | 0 ± 0 (a) | 0 ± 0 (a) | 0 ± 0 (a) |

Les moyennes dans la colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test Anova (post-hoc de Tukey) ($p=0,05$). Les expériences ont été répétées deux fois avec sept répétitions à chaque fois.

officinalis, puis par celui de *Thymus vulgaris*, tandis que ce dernier inhibe totalement la sporulation de *Botrytis cinerea* (Fig. 2E). L'extrait aqueux de *Melissa officinalis* demeure sans effet inhibiteur marqué.

L'inhibition de la sporulation de *Botrytis cinerea* sur le fruit par l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* confirme les résultats obtenus sur la sporulation *in vitro* où l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* atteint 85,83 % ± 1,73 (Fig. 1C).

3.3. Tests phytochimiques

Le Tableau 2 indique que tous les extraits aqueux étudiés contiennent des tanins galliques, avec une concentration plus élevée dans les extraits de *Thymus vulgaris* et de *Melissa officinalis*. Concernant les saponines, tous les extraits aqueux étudiés contiennent ces métabolites, à l'exception de ceux de *Melissa officinalis*. La présence des saponines, d'une façon plus concentrée, est remarquée

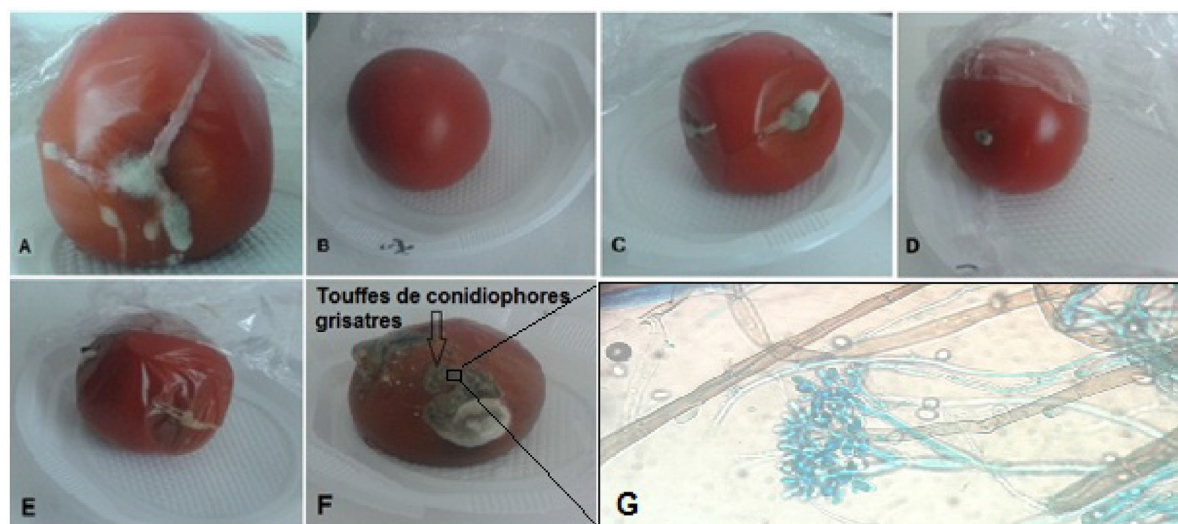


Fig. 2. Effet des extraits aqueux sur la croissance et la sporulation de *Botrytis cinerea* sur les fruits de tomate. A. Témoin (*Botrytis cinerea*). B. Témoin négatif. C. Fruit traité par l'extrait aqueux de *Lavandula officinalis*. D. Fruit traité par l'extrait aqueux de *Cymbopogon citratus*. E. Fruit traité par l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris*, fruit pourri totalement en absence des touffes grises des conidiophores. F. Fruit traité par l'extrait aqueux de *Melissa officinalis*, fruit pourri avec des touffes de conidiophore abondantes. G. Observation microscopique des touffes de conidiophores prélevées sur le fruit traité par l'extrait aqueux de *Melissa officinalis* (G \times 400, liquide de montage : bleu coton).

Tableau 2
Teneur en tanins et saponines.

| Extrait aqueux | Tanins | | Saponines |
|------------------------------|------------------|-------------------|-----------|
| | Tanins galliques | Tanins catéchiqes | |
| <i>Cymbopogon citratus</i> | + | – | + |
| <i>Thymus vulgaris</i> | ++ | – | ++ |
| <i>Lavandula officinalis</i> | + | – | ++ |
| <i>Melissa officinalis</i> | ++ | – | – |

– : test négatif ; + : test positif ; ++ : test fortement positif.

dans les extraits aqueux de *Thymus vulgaris* et de *Lavandula officinalis* (Tableau 2).

Le dosage des polyphénols totaux (Tableau 3) montre qu'il y a une différence significative entre la teneur en phénols totaux dans l'extrait aqueux de *Melissa officinalis*, ($0,78 \pm 0,09$ mg/g) par rapport aux autres extraits aqueux. Quant aux flavonoïdes, ils représentent 97,9 % des phénols

totaux dans les extraits aqueux de *Cymbopogon citratus*, tandis que les taux de flavonoïdes dans les autres extraits aqueux étudiés ne dépassent pas 25 %.

4. Discussion et conclusion

À la lumière des résultats obtenus *in vitro*, les quatre extraits aqueux étudiés (*Lavandula officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* et *Melissa officinalis*) exercent un effet antifongique, dose dépendant et différent d'un extrait aqueux à l'autre sur les trois stades du développement de *B. cinerea*, à savoir la germination des spores, la croissance mycélienne et la sporulation. L'inhibition de la croissance du pathogène par les extraits aqueux est due au fait que ces extraits possèdent des composés organiques naturels ayant des activités antifongiques. Cette action est attribuée à des métabolites secondaires tels que les polyphénols et les triterpénoïdes [14]. La différence de l'activité antifongique entre les extraits aqueux étudiés

Tableau 3
Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes.

| Extrait aqueux | Teneurs en flavonoïdes (mg d'équivalents de catéchine/mL) [®] | Teneurs en phénols totaux (mg d'équivalents d'acide gallique/mL) [©] | ([®] / [©]) \times 100 |
|------------------------------|--|---|--|
| <i>Cymbopogon citratus</i> | 0,046 \pm 0,006 (a) | 0,047 \pm 0,005 (a) | 97,9 % |
| <i>Thymus vulgaris</i> | 0,002 \pm 0,001 (b) | 0,008 \pm 0,002 (a) | 25 % |
| <i>Lavandula officinalis</i> | 0,06 \pm 0,02 (b) | 0,41 \pm 0,064 (b) | 14,63 % |
| <i>Melissa officinalis</i> | 0,11 \pm 0,01 (c) | 0,78 \pm 0,09 (c) | 14,10 % |

Les moyennes dans la colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test Anova (post-hoc de Tukey) ($p = 0,05$). Les expériences ont été réalisées à raison de sept répétitions.

devait être liée à la différence de la composition chimique entre chaque extrait aqueux.

D'après les résultats obtenus, il s'avère que les extraits aqueux de *Lavandula officinalis* et de *Melissa officinalis* sont les plus efficaces sur la germination des spores, tandis que les extraits aqueux de *Thymus vulgaris* et *Cymbopogon citratus* sont les plus efficaces sur la croissance mycélienne et la sporulation. Ainsi, en minimisant l'intensité de la sporulation, qui prend une part importante dans la dissémination du champignon, les extraits aqueux de *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* et *Lavandula officinalis* possèdent tous une activité antifongique puissante contre *Botrytis cinerea* par rapport à l'extrait aqueux de *Melissa officinalis*, puisqu'ils ont tous montré un pourcentage d'inhibition de la sporulation supérieur à 60 % à une concentration de 8 mg/mL, alors que celui de l'extrait aqueux de *Melissa officinalis* ne dépasse pas 30 %. En se référant aux résultats des tests phytochimiques, on remarque que les extraits aqueux de *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* et *Lavandula officinalis* contiennent des saponines, mais que celles-ci sont absentes dans l'extrait aqueux de *Melissa officinalis*. Ces saponines sont généralement composées des terpénoïdes, composants principaux des huiles essentielles. D'ailleurs, dans la littérature, les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antifongiques proviennent de la famille des *Labiatae*, comme le thym, la lavande, etc. [15], ce que confirment les résultats obtenus *in vitro* dans cette étude. Les saponines sont connues pour leur pouvoir d'interaction avec les stérols, les protéines et les phospholipides des membranes cellulaires des champignons [16], provoquant ainsi une perte de l'intégrité structurale de la membrane cellulaire et une augmentation de la perméabilité ionique [17].

L'efficacité inhibitrice de l'extrait aqueux de *Lavandula officinalis* et de *Melissa*, qui a été observée *in vitro*, a diminué considérablement *in vivo* chez *Lavandula officinalis* et a même disparu chez *Melissa officinalis*.

Ce sont les extraits aqueux de *Cymbopogon citratus* et de *Thymus vulgaris* qui se sont montrés les plus efficaces contre *B. cinerea in vivo*, probablement, grâce à leur teneur en saponines mises en évidence par les tests phytochimiques, en plus d'autres métabolites éventuellement présents dans ces deux extraits aqueux, notamment les terpènes qui sont les composants majeurs des huiles essentielles et qui peuvent être retrouvés à faibles doses dans les extraits aqueux. Cela est prouvé par Gopinath et al. [18], qui ont mis en évidence l'existence des terpénoïdes dans l'extrait aqueux de *Cymbopogon citratus*. Le pouvoir antifongique des terpénoïdes est démontré. Leur mécanisme n'est pas bien connu, mais il a été suggéré qu'ils pourraient induire une destruction de la membrane du microorganisme par une action lipophile [19], causant ainsi une perte du contrôle de la pression osmotique [20,21]. Dans ce sens, Reddy et al. [22] ont démontré le potentiel antifongique élevé de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* comme agent protecteur de *Fragaria ananassa* contre la pourriture causée par *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonifer*. De leur côté, Onawumi et al. [23], Chaumont et al. [24] et Koba et al. [25] ont démontré l'action antifongique des huiles essentielles de *Cymbopo-*

gon citratus. Vu que les terpènes sont les constituants majeurs des huiles essentielles, ces résultats confirment la suggestion que l'activité antifongique des extraits aqueux de *Cymbopogon citratus* et de *Thymus vulgaris* est due à leur teneur en certaines molécules terpénoïques.

L'activité antifongique des extraits aqueux étudiés est attribuée également à leur teneur en polyphénols. Bien que ces molécules soient connues par leur pouvoir antioxydant, plusieurs études ont démontré leur activité antifongique [26]. Leur mécanisme de toxicité vis-à-vis des champignons est basé sur l'inactivation des enzymes fongiques qui contiennent un groupement thiol dans leur site actif [19,27,28]. Parmi les polyphénols, on trouve de nombreux flavonoïdes possédant une activité antifongique [29]. Quelle que soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile de ces composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique [29,30]. Il est évident que les polyphénols sont polaires et solubles dans l'eau, et par conséquent présents dans les extraits aqueux. D'ailleurs, les tests phytochimiques ont mis en évidence des polyphénols dans tous les extraits aqueux étudiés. Si on compare les teneurs en polyphénols, on remarque que l'extrait aqueux de *Melissa officinalis*, qui s'est montré le moins efficace contre *B. cinerea* aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, révèle une forte teneur en polyphénols et en flavonoïdes, alors que ceux de *Cymbopogon citratus* et *Thymus vulgaris*, les plus efficaces contre *B. cinerea in vitro* et *in vivo*, n'en contiennent qu'une faible quantité. On déduit que les polyphénols peuvent agir qualitativement plus que quantitativement. Ainsi, l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris*, bien qu'ayant une faible teneur en polyphénol et en flavonoïdes, est efficace. On pourrait attribuer cette activité à la nature de ses polyphénols, en fait le thymol, la substance majeure présente chez *Thymus vulgaris* [31]. D'autres travaux ont souligné l'efficacité antifongique des phénols terpéniques, et plus particulièrement celle du thymol et/ou du carvacrol [32–37]. Ces terpènes phénoliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amine et hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes, provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires [38–41]. Cela explique la forte activité antifongique de l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris*, malgré sa faible teneur en polyphénols par rapport aux autres extraits aqueux étudiés. Cependant, l'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due seulement à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés contenus dans cet extrait [42]. À la lumière de ces investigations réalisées et au vu des effets antifongiques démontrés *in vivo* contre *B. cinerea*, il s'avère que les extraits aqueux de *Cymbopogon citratus* et de *Thymus vulgaris* sont les plus efficaces et les plus envisageables pour la lutte biologique contre la pourriture grise, notamment l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* qui, en inhibant la sporulation sur le fruit, peut limiter la dissémination de la pathologie dans les champs.

En conclusion, il s'avère que l'emploi des extraits aqueux des plantes dans la lutte contre *B. cinerea* est prometteur compte tenu de leur efficacité et de leur innocuité vis-à-vis de l'environnement. Les extraits aqueux

sont également moins chers et plus rentables par rapport aux huiles essentielles, d'autant que ces dernières contiennent des substances volatiles et donc exercent un effet temporaire.

Références

- [1] W.R. Jarvis, *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity*. Monogr. 15, Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada, 1977.
- [2] Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen, *Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction*, in : Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen (Eds.), *Botrytis, biology, pathology and control*, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 2004, pp. 1–8.
- [3] F. Diatta, *Efficacité de la lutte chimique contre Didymella lycopersici et Botrytis cinerea et problème de résistance aux fongicides*, thèse, Institut agronomique et vétérinaire Hassan-II, Rabat, 1984.
- [4] A. Hmouni, A. Oihabi, A. Badoc, A. Douira, *Résistance de Botrytis cinerea aux benzimidazoles, aux dicarboximides et aux dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate dans la région du Gharb*, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 142 (2003) 79–100.
- [5] Y. Thakore, *The biopesticide market for global agricultural use*, Ind. Biotechnol. 2 (3) (2006) 294–308.
- [6] P.M. Davidson, M.E. Parish, *Methods for testing the efficacy of food antimicrobials*, Food Technol. 43 (1989) 148–155.
- [7] N. Grange, S. Ahmed, *Handbook of plants with pest control properties*, John Wiley & Sons, New York, 1988, p. 470.
- [8] M. Fennane, M. Ibn Tattou, J. Mathez, A. Ouyahia, J. El Oualidi, *Flore pratique du Maroc. Manuel de détermination des plantes vasculaires. Volume 2, Angiospermae (Leguminosae-Lentibulariaceae)*, Institut scientifique, université Mohammed-V-Agdal, Rabat, 2007 (648 p).
- [9] B. Mouria, A. Ouazzani-Touhami, A. Mouria, A. Douira, *Mise en évidence d'une variation intra spécifique chez Botrytis cinerea et lutte biologique in vitro par l'extrait de compost*, J. Appl. Biosci. 64 (2013) 4797–4812.
- [10] Y. Karumi, P.A. Onyeyili, V.O. Ogugbuaja, *Identification of active principals of M. balsamina (Balsam apple) leaf extract*, J. Med. Sci. 4 (2004) 179–182.
- [11] N. Koffi, K. Beugré, N. Guédé, D. Zirihi et, A. Laurent, *Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou, Agboville, Côte-d'Ivoire*, Sci. Nat. 6 (2009) 1–15.
- [12] V.L. Singleton, J.A. Rossi, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*, Am. J. Enol. Vitic. 16 (1965) 144–153.
- [13] D.O. Kim, O.K. Chun, Y.J. Kim, H.Y. Moon, C.Y. Lee, *Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums*, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 6509–6515.
- [14] E.K. Boloug, B. Attioua, A.C. N'guessan, A. Coulibaly, J.D. N'guessan, A.J. Djaman, *Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de Terminalia glaucescens planch. sur Salmonella typhi et Salmonella typhimurium*, Bull. Soc. Roy. Sci. Liege 80 (2011) 772–790.
- [15] D. Vokou, S. Kokkini, J.-M. Bressière, *Origanum onites (Lamiaceae) in Greece: distribution, volatile oil yield, and composition*, Econ. Bot. 42 (1988) 407–412.
- [16] L.N. Tatsadjieu, J.J.E. Ngang, M.B. Ngassoum, F.X. Etoa, *Antibacterial and antifungal activity of Xylopi aethiopia, Monodora myristica, Zanthoxylum xanthoxyloides and Zanthoxylum leprieuri from Cameroon*, Fitoterapia 74 (2003) 469–472.
- [17] K. Gruiz, P.A. Biacs, *Membrane lipid composition of Trichoderma strains and their sensitivity to saponin and polyene antibiotics*, in : P.A. Biacs, K. Gruiz, T. Kremmer (Eds.), *Biological role of plant lipids*, Plenum Press, New York, Londres, 1989, pp. 417–420.
- [18] S.M. Gopinath, T.B. Suneetha, S. Sumer, *Effect of cymbopogon citratus terpenoids against bacterial pathogens causing bovine mastitis*, Int. J. Pharm. Biol. Sci. 4 (1) (2013) 247–253.
- [19] M.M. Cowan, *Plant product as antimicrobial agents*, Clin. Microbiol. Rev. 12 (4) (1999) 564–582.
- [20] S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markham, H.C. Bell, J.E. Gustafson, J.R. Warington, S.G. Wyllie, *The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (Tea tree oil)*, J. Appl. Microbiol. 88 (2000) 170–175.
- [21] Y. Inoue, A. Shiraishi, T. Hada, K. Hirose, H. Hamashima, J. Shimada, *The antibacterial effects of terpene alcohols on Staphylococcus aureus and their mode of action*, FEMS Microbiol. Lett. 237 (2004) 325–331.
- [22] M.V.B. Reddy, P. Angers, A. Gosselin, J. Arul, *Antifungal activity of Thymus vulgaris essential oil*, Phytochemistry 47 (8) (1998) 1515–1520.
- [23] G.O. Onawumi, W.A. Ysak, E.O. Oguiana, *Antibacterial constituents in the essential oil of Cymbopogon citratus*, J. Ethnopharmacol. 12 (1984) 279–286.
- [24] J.-P. Chaumont, D. Mandin, K. Sanda, K. Koba, C. de Souza, *Activités antimicrobiennes de cinq huiles essentielles de lamiales togolaises vis-à-vis de germes représentatifs de la microflore cutanée*, Acta Bot. Gall. 148 (2001) 93–101.
- [25] K. Koba, K. Sanda, C. Raynaud, D. Mandin, J. Millet, J.-P. Chaumont, *Activité antimicrobienne des huiles essentielles de Cymbopogon citratus L. (DC) Stapf., C. nardus L. Rendle et C. schoenanthus L. Spreng. J. Mycol. Med. 13 (2003) 175–185.*
- [26] C. Remsey, C. Manach, O. Texier, *Interest of polyphenols in preventive nutrition 96*, INRA, Paris, 1998, 87, Les colloques, 1998, pp. 251–256.
- [27] R.S. Farag, Z.Y. Daw, F.M. Hewedi, G.S.A. El-Baroly, *Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils*, J. Food Prot. 52 (1989) 665–667.
- [28] C.C. Celimene, J.A. Micales, L. Ferge, R.A. Young, *Efficacy of pinosylvin against white-rot and brown-rot fungi*, Holzforschung. 53 (1999) 491–497.
- [29] R.J. Grayer, J.B. Harborne, *A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993*, Phytochemistry 37 (1994) 19–42.
- [30] L. Jimenez-Gonzalez, M. Alvarez-Corral, M. Munoz-Dorado, I. Rodriguez-Garcia, *Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties*, Phytochem. Rev. 7 (2008) 125–154.
- [31] J.A. Pino, M. Estarron, V. Fuentes, *Essential oil of thyme (Thymus vulgaris L.) grown in Cuba*, J. Essent. Oil Res. 9 (5) (1997) 609–610.
- [32] M.E. Crespo, J. Jimenez, E. Gomis, C. Navarro, *Antimicrobial activity of the essential oil of Thymus serpylloides subspecies gadorensis*, Microbios. 61 (1990) 181–184.
- [33] S. Cosentino, C.I. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi, F. Palmas, *In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils*, Lett. Appl. Microbiol. 29 (2) (1999) 130–135.
- [34] G. Arras, M. Usai, *Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest Citrus pathogens: Chemical analysis of Thymus capitatus (L.) oil and its effect in subatmospheric pressure conditions*, J. Food Prot. 64 (2001) 1025–1029.
- [35] B. Chebli, M. Achouri, L.M. Idrissi Hassani, M. Hmamouchi, *Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against Botrytis cinerea Pers: Fr. J. Ethnopharmacology 89 (2003) 165–169.*
- [36] K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley, *Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil*, J. Appl. Microbiol. 95 (2003) 853–860.
- [37] S. Pepeljnjak, I. Kosalec, Z. Kalodera et, D. Kustrak, *Natural antimycotics from Croatian plants*, in : M.K. Rai, R. Rai (Eds.), *Plant-derived antimycotics*, The Haworth Press, Binghamton, NY, USA, 2003, pp. 49–81.
- [38] B.J. Juven, J. Kanner, F. Schved, H. Weisslovicz, *Factors that can interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents*, J. Appl. Bacteriol. 76 (1994) 626–631.
- [39] A. Ultee, E.P.W. Kets, E.J. Smid, *Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus*, Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 4606–4610.
- [40] J.R. Knowles, S. Roller, D.B. Murray, A.S. Naidu, *Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by Staphylococcus aureus and Salmonella enterica Serovar Typhimurium*, Appl. Environ. Microbiol. 71 (2005) 797–803.
- [41] A. Lopez-Malo, S.M. Alzamora, E. Palou, *Aspergillus flavus growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds*, Int. J. Food Microbiol. 99 (2005) 119–128.
- [42] T. Essawi, M. Srour, *Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity*, J. Ethnopharmacol. 70 (2000) 343–349.