

EFFET INHIBITEUR *IN VITRO* DE L'HUILE ESSENTIELLE D'*Artemisia herba alba* SUR DEUX SOUCHES DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

KOLAI Naouel, SAIHAH Farida, BOUDIA Abdelkader
Laboratoire de protection des végétaux, Université Abed El Hamid Ibn Badis Mostaganem
BP 300 Mostaganem 27000 Algérie
E-mail: kolainaouel@yahoo.fr

Résumé- *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, est parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur tomate. Dans le but de chercher d'autres alternatives de lutte contre ce champignon, nous étudions dans ce travail le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) extraite par hydrodistillation. Cette aptitude a été recherché *in vitro*, sur un milieu solide gélosé vis-à-vis de deux souches ; la 1^{ère} isolée de la variété Marmande et la 2^{ème} de la variété Agora. L'huile à différentes concentrations (0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3% et 5%) ont été ajoutées au milieu PDA à une température de 40°C puis versées dans des boîtes pétri. Chacune d'elle est inoculée à l'aide d'un explant mycélien de 5 mm de diamètre environ, provenant d'une culture de champignon âgée d'une semaine. Pour chacune des concentrations de l'huile ainsi que pour le témoin, trois répétitions sont effectuées. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C à l'obscurité pendant 07 jours. L'efficacité de chaque concentration étudiée, est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance du champignon testé, selon la relation de LEROUX et CREDET [1]. Avec un rendement de 1%, l'huile essentielle de l'armoise a montré une efficacité remarquable sur les deux souches avec une concentration minimale inhibitrice CMI de 2%. Ces résultats bien que préliminaires, témoignent d'une bonne activité antifongique, permettant de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène.

Mots clés : *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Artemisia herba-alba*, huile essentielle, activité antifongique, CMI

INHIBITING EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM *Artemisia herba alba* ON TWO STRAINS OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Abstrat- *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* is among the most aggressive soil fungi causing wilt and rot on tomato. In order to look for other alternatives to fight against this fungus, we study in this work the power of antifungal essential oil of *Artemisia herba-alba* extracted by steam distillation. This ability was investigated *in vitro* on solid medium agar against two strains, isolated from the first and the second variety Marmande and Agora. The oil at different concentrations (0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3% and 5%) were added to PDA medium at a temperature of 40°C and then poured into petri boxes. Each is inoculated with mycelial an explants of about 5 mm in diameter, from a fungus culture aged one week. For each concentration of oil and for the control, three replicates were performed. Plates are then incubated at 25°C in the dark for 07 days. The effectiveness of each concentration studied, is estimated by calculating the percentage inhibition of growth of the fungus tested, according to relationship LEROUX and CREDET [1]. With a yield 1%, the essential oil of artemisia has shown remarkable efficacy of both strains with a minimum inhibitory concentration MIC of 2%. These results, although preliminary, show a good antifungal activity, to limit and inhibe stop the development of the pathogen agent.

Keyword: *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Artemisia herba-alba*, essential oil, antifungal activity, MIC.

Introduction

Le *Fusarium oxysporum* est un représentant typique de la microflore du sol. Bien que saprophyte à pouvoir compétitif très étendu, il peut développer une phase parasitaire des plus dommageable [2]. On connaît chez cette espèce, de nombreuses formes spéciales [3], parasites racinaire de diverses espèces chez lesquelles, elles engendrent une flétrissure appelée communément fusariose racinaire [4]. La forme spécial (*radicis lycopersici*) attaque la tomate,

causants ainsi la maladie la plus redoutable de cette culture. Elle se traduit par une altération du système racinaire et aérien. Bien qu'il soit difficile d'évaluer précisément son incidence, les pertes qu'elle occasionne sont suffisamment importantes pour contraindre certains producteurs à abandonner la culture de la tomate, faute de méthodes de lutte efficace. En effet, plusieurs méthodes de lutte ont été utilisées tel que la méthode chimique, génétique, culturelle, ainsi que la méthode biologique, mais toutes ces méthodes sont restées vaines. Par contre une nouvelle discipline voie le jour qui fait parti des méthodes biologique, cette méthode consiste a utilisé les huiles essentielles. Dans notre présent travail, l'objectif est d'intéresser à étudier l'activité antifongique de huile essentielle d'*Artemisia herba-alba*, poussant à l'état spontané et qui sont plus fréquemment employé dans la tradition algérienne; vis-à-vis de *Fusarium Osysporum* f. sp *radicis lycopersici*.

1.- Matériels et méthodes

1.1.- Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne de la plante (*Artemisia herba-alba*). Il est laissé à l'ombre dans un endroit sec et aéré en attendant leur utilisation pour l'extraction.

1.2.- Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation pendant une durée de cinq heures. L'huile essentielle obtenue est conservée au réfrigérateur à 4°C.

1.2.1.- Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter [4]. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

R: Rendement de l'huile en pourcentage

$$R = \frac{P_x}{P_y} . 100$$

P_x: Poids de l'huile en gramme

P_y: Poids de la plante en gramme

1.2.2.- Mesure de la densité

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20°C [5].

1.3.- Souches fongiques utilisées

Pour ce teste nous avons utilisé deux souches représentant les deux formes spéciales de l'espèce *Fusarium oxysporum* : F₁ et F₂ provenant du laboratoire de protection des végétaux de l'université de Mostaganem, l'origine de ces deux formes spéciales est Sidi maarouf et Cap blanc respectivement.



Figure 1.- Aspect macroscopique de Forl

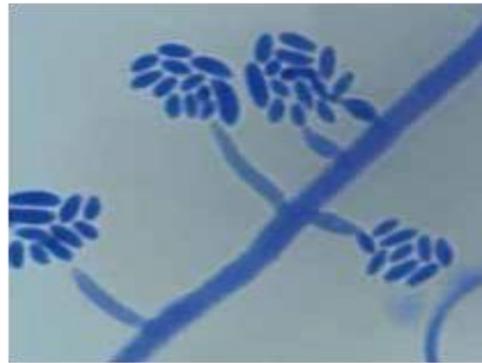


Figure 2.- Aspect microscopique de Forl (x400)

1.4.- Milieu de culture: Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar).

1.5.- Etude de l'effet des huiles essentielles sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis lycopersici*

Après stérilisation et répartition des milieux dans des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte, l'extrait de l'huile essentielle est dilués avec le D.M.S.O (diméthyle sulfoxyde) jusqu'à l'obtention des concertations désirées (0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3% et 5%). Une quantité de 1ml de chaque concentration sont rajoutées à chaque boîte de Pétri contenant le milieu de culture en surfusion. Après solidification du milieu l'ensemencement se réalise avec des explants de 5 mm de diamètre prélevés d'une culture âgée de 7 jours, à l'aide d'un emporte pièce stérile. Ces explants sont déposés dans un puits creusé préalablement avec une pipete pasteur stérile au centre de la boîte de pétrie contenant des doses croissante de l'huile essentiel. Trois répétitions sont retenues pour chaque concentration.

1.5.1.- Estimation de la croissance mycélienne

La technique consiste à mesurer la croissance linéaire et diamétrale des colonies en utilisant la formule suivante [6,7]:

$$L = D - d / 2$$

L: croissance mycélienne

D: diamètre de la colonie

d: diamètre de l'explant

1.5.2.- Evaluation du taux d'inhibition de la croissance mycélienne

Les résultats obtenus à partir de l'estimation de la croissance mycélienne sont aussi exprimés en pourcentage (%) par rapport a la croissance mycélienne du témoin selon la formule décrite par LEROUX et CREDET [1].

$$T (\%) = (L - I / L) \times 100$$

T : taux d'inhibition.

L : croissance mycélienne du témoin.

I : croissance mycélienne des champignons subissant le traitement

1.5.3.- Détermination des concentrations inhibitrices (CMI)

Il s'agit en parallèle d'évaluer la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice), plus petite concentration pour laquelle aucun développement n'est visible à l'œil nu.

1.5.4.- Analyse statistique des donnés.

Les analyses de variance ont été réalisées par le logiciel statistique Stat box version 6,4 copyright Grimmer logiciels 1997-2002, Paris). Pour chaque cas, les différences ont considérées hautement significatives a $p < 0.01$.

2.- Résultats et discussion

Artemisia herba alba présente un rendement de 1% et une densité de 0.82 d'huile essentielle. Pour les tests sur la croissance mycélienne des deux formes spéciale (F_1 et F_2) du *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici* avec les différentes concentrations d'huile essentielle extraite, ont remarque que la croissance mycélienne démarre après le deuxième jour pour la concentration de 0,1% et après le troisième jour pour la concentration de 0.5%, par contre pour la concentration de 1% ; elle démarre après le cinquième jour, au-delà de cette concentration ont observe aucune croissance (tab. I et II)

Tableau I.- Croissance mycélienne (cm) de FORL F_1 en fonction du temps et de la concentration en HE d'*A. herba alba*

Concentration d'HE d' <i>A. herba alba</i>	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Témoin	0	0.93	1.75	2.57	3	3.32	4
0.1%	0	0.56	0.75	1.3	1.5	1.77	2.2
0.5%	0	0	0.07	0.13	0.3	0.43	0.54
1%	0	0	0	0	0.1	0.21	0.35
2%	0	0	0	0	0	0	0
3%	0	0	0	0	0	0	0
5%	0	0	0	0	0	0	0

Tableau II.- Croissance mycélienne (cm) de FORL F_2 en fonction du temps et de la concentration en HE d'*A. herba alba*

Concentration d'HE d' <i>A. herba alba</i>	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Témoin	0	0.72	1.38	1.82	2.65	3.32	4
0.1%	0	0.15	0.26	0.43	0.6	0.82	0.9
0.5%	0	0	0.06	0.13	0.17	0.22	0.28
1%	0	0	0	0	0	0.16	0.22
2%	0	0	0	0	0	0	0
3%	0	0	0	0	0	0	0
5%	0	0	0	0	0	0	0

Des différentes de sensibilité ou de résistance sont notées selon les concentrations et les différentes souches testées car ont observe que la souche F_1 est plus résistante par rapport à la souche F_2 . Les témoins des deux souches (F_1 et F_2) présente des résultats négatives ceci implique que l'activité antifongique est due uniquement aux substances renfermées dans les extrais d'HE.

En général, les résultats obtenus avec les différentes concentrations de l'extrait révèlent que l'activité inhibitrice croît au fur et à mesure que la concentration augmente. En effet, des études récentes ont montrés que l'importante action antimicrobienne d'huile essentielle de la plante étudiée est en relation avec leurs fortes teneurs en α -thuyone et en camphre. Ces composés phénoliques sont réputés a avoir une grande action antibactérienne et antifongique [8].

Une activité inhibitrice de 100% a été remarquée par l'application d'une concentration de 200 μ l/ml (fig. 3); la valeur de CI50 semble être proche aux environs de concentration qui est : 0.1 % de l'extrait d'HE sur les deux souches F₁ et F₂. (fig. 4)

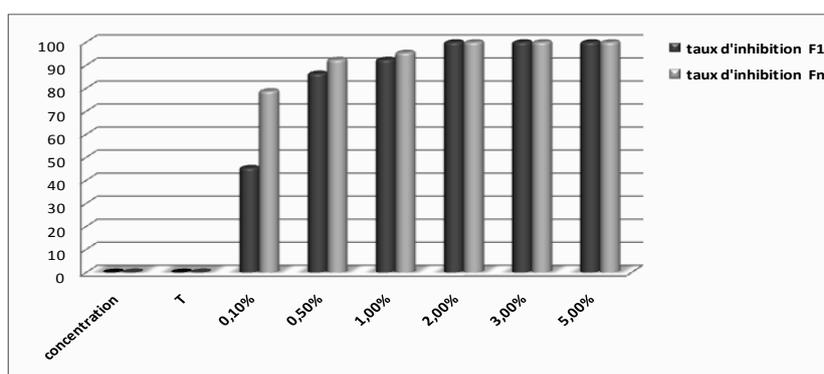


Figure 3.- Taux d'inhibition de F₁ et F₂ en fonction de la concentration d'huile essentielle d'*A. herba alba*

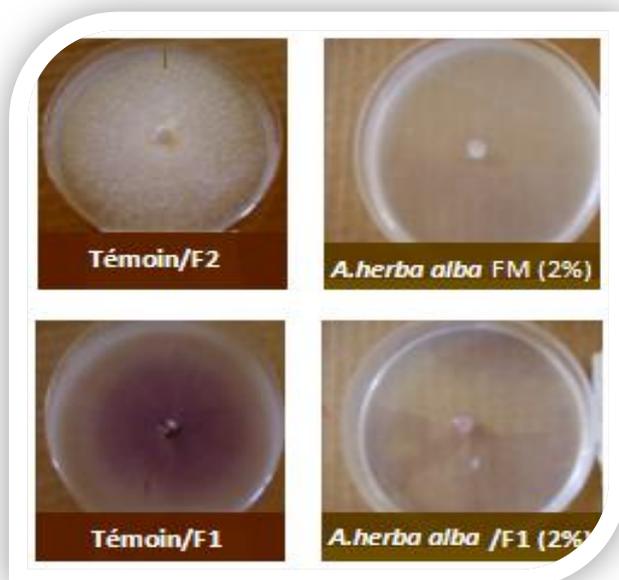


Figure 4.- Concentration minimale inhibitrice de l'HE d'*A. herba alba* sur la croissance mycélienne de FORL (F₁ et F₂)

Conclusion

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs. Les huiles essentielles ont été obtenues à partir d'une hydrodistillation, dans lequel le distillat a subi une décantation en utilisant un solvant de l'hexane, alors qu'on sait qu'il n'y avait aucun effet de ce solvant sur les souches testées. La détermination des rendements en

huiles essentielles ont montré une rentabilité en huile volatile chez La plante d'*Artemisia herba-alba*.

A travers cette étude et d'après les résultats obtenus, on constate que l'huile essentielle *Artemisia herba alba* s'est avérée un agent antifongique efficace contre FORL (F₁ et F₁) à une dose de 200µl/ml. L'activité inhibitrice croît au fur et à mesure qu'augmente la concentration en extrait naturel pour les deux souches fongique de *Fusarium Oxysporum* f. sp *radicis lycopersici*. Il ressort que l'armoise pourrait être valorisée d'avantage particulièrement dans la lutte contre de nombreuses espèces fongique responsables des différentes formes phytopathogènes. L'efficacité *in vitro* pourrait être expliquée par la richesse de cette plante spontanée en composés aromatique.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Références bibliographiques

- [1].- Leroux, P., Credet A., 1978.- Document sur l'étude de l'activité des fongicide. INRA, Versailles, France, 12 p.
- [2].- Minaud J. et Pelossier S., 1979.- La biologie des sols. Ed Presses universitaire de France, 98 p.
- [3].- Beckman C. H., 1987.- The nature of wilt diseases of plants. St Paul MN American, phytopathological Society, 175 p.
- [4].- Caree P., 1953.- Précis de technologie et de chimie industrielle. Ed. Ballière JB. et fils, 238p.
- [5].- Afnor, 1996.- Détermination des huiles essentielles, Indice de classement. N F-75-006, Paris.
- [6].- Brewer D., 1960.- Studies in *Asochyta piri*. Canadian Journal of botanic, 38: 705-717.
- [7].- Leach C. M., 1962.- The quantitative and qualitative relation ship ultraviolet and visible radiation in the induction of reproduction in *Asochyta pisi*. Canadian Journal of botanic, vol. 40: 1577-1602.
- [8].- Saleh Mahmoud A., Belal Mohamed H. et El-Baroty G., 2006.- Fungicidal activity of *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae) vol. 41 (3): 237-244.