

## Composition chimique de l'huile essentielle extraite des feuilles fraîches de *Ocimum gratissimum* et évaluation de sa fongitoxicité sur 3 isolats de *Fusarium oxysporum lycopersici*, parasite tellurique en culture de tomate

Koffi Fernand Jean - martial KASSI<sup>1</sup>, Koffi Gaston KOUAME<sup>2\*</sup>, Konan KOUAME<sup>2</sup>,  
Bi Bolou Antoine BOLOU<sup>1</sup> et Daouda KONE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie Végétale, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët-Boigny,  
22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup> Université Péléforo-Gon-Coulibaly (UPGC), Unité de Formation et de Recherche des Sciences Biologiques,  
Département de Biologie Végétale, BP 1328 Korhogo, Côte d'Ivoire

\* Correspondance, courriel : [k.koffigaston1@yahoo.fr](mailto:k.koffigaston1@yahoo.fr)

### Résumé

Les maladies cryptogamiques constituent la contrainte majeure liée à la production maraîchère. La principale méthode de lutte contre les agents pathogènes responsables est l'usage des produits chimiques. Cette approche suscite aujourd'hui de nombreuses inquiétudes, au niveau du consommateur, de la qualité de la récolte et de l'environnement. La recherche de solution alternative devient donc une nécessité. La présente étude vise à révéler, d'une part la composition chimique de l'huile essentielle extraite de *Ocimum gratissimum* Linn, et d'autre part, sa fongitoxicité sur trois souches de *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*. L'huile essentielle est extraite des feuilles fraîches par entraînement à la vapeur d'eau dans un système du type Clevenger et caractérisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse. Les différents temps de rétention (TR) ont permis d'identifier 42 composés dont 48,23 p.c. de composés oxygénés ; 41,1 p.c. d'hydrocarbures et 10,65 p.c. d'autres composés, par comparaison ceux de composés de référence. Le thymol, avec un taux de 46,1 p.c. et le  $\gamma$ -terpinène à 17,6 p.c. ont été les composés majoritaires. L'évaluation *in vitro* de l'effet antifongique a montré l'efficacité de l'huile essentielle de *O. gratissimum* sur les trois souches de *Fusarium oxysporum*. Aux doses de 800 et 1000  $\mu$ l/L, son effet antifongique n'a pas été significativement différent de ceux du mancozèbe et du Chlorothalonil appliquées à des doses 100 fois inférieures. En effet, elle a induit 90 % de réduction de la croissance mycélienne de chaque souche avec des doses inférieures à 1000  $\mu$ l/L. L'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* présente toute les potentialités afin de développer autour d'elle une solution alternative à la lutte chimique en culture maraîchère.

**Mots-clés :** *Ocimum gratissimum*, huile essentielle, composition chimique, Fongitoxicité *Fusarium oxysporum*.

### Abstract

**Chemical composition of the essential oil extracted from the fresh leaves of *Ocimum gratissimum* and evaluation of its fungitoxicity on 3 strains of *Fusarium oxysporum lycopersici*, a soilborne parasite grown in tomatoes**

Cryptogamic diseases are the major constraint linked to market gardening production. The main method of controlling the pathogens responsible is the use of chemicals. Today, this approach raises many consumer

concerns about the quality of the harvest and the environment. The search for an alternative solution therefore becomes a necessity. The present study aims to reveal, on the one hand, the chemical composition of the essential oil extracted from *Ocimum gratissimum* Linn, and on the other hand, its fungitoxicity on three strains of *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*. The essential oil is extracted from the fresh leaves by steam distillation in a Clevenger system and characterized by gas chromatography coupled with a mass spectrophotometer. The different retention times (TR) made it possible to identify 42 compounds, 48.23 p.c. of which were oxygenated compounds; 41.1 p.c. hydrocarbons and 10.65 p.c. other compounds, compared to those of reference compounds. Thymol, with a level of 46.1 p.c. and  $\gamma$ - terpinene at 17.6 p.c. were the majority compounds. The in vitro evaluation of the antifungal effect showed the efficacy of *O. gratissimum* essential oil on all three strains of *Fusarium oxysporum*. At doses of 800 and 1000  $\mu$ l/L, its antifungal effect was not significantly different from those of mancozeb and Chlorothalonil applied at doses 100 times lower. Indeed, it induced a 90 % reduction in mycelial growth of each strain at doses below 1000  $\mu$ l/L. The essential oil of *Ocimum gratissimum* has all the potential to develop around it an alternative solution to chemical control in market gardening.

**Keywords :** *Ocimum gratissimum*, essential oil, chemical composition, Fungitoxicity, *Fusarium oxysporum*.

## 1. Introduction

En Côte d'Ivoire, le développement des cultures maraîchères a connu un essor à partir des années 1970, permettant au pays d'être autosuffisant. Ces cultures sont représentées par l'aubergine, le concombre, la courge, le haricot vert, le gombo et la tomate. Ces produits sont destinés à la consommation locale, mais ne peuvent entièrement satisfaire les besoins exprimés [1]. Parmi ces produits, la culture de la tomate occupe une place prépondérante [2]. Toutefois sa production reste freinée par certaines maladies causées par des agents pathogènes adaptés au milieu humide [3]. Ces parasites sont responsables d'importantes pertes au champ et en cultures hors sols [4]. Malgré le développement de cultivars résistants à ces pathogènes, la lutte contre les champignons telluriques se résume à des mesures prophylactiques et à l'usage de produits de synthèse. L'emploi de ces produits chimiques suscite aujourd'hui de nombreuses inquiétudes tant au niveau de la santé humaine, que de l'apparition de souches résistantes ainsi que l'augmentation de la quantité des résidus dans les fruits à la récolte [4]. L'importance des dégâts d'origine fongique, les difficultés liées aux traitements des maladies et les grandes quantités de résidus chimiques dans les récoltes ont orienté la lutte vers l'usage de substances naturelles et au maintien des bioagresseurs à un niveau de nuisibilité acceptable [5]. Dans le contexte actuel où sont valorisées des approches respectueuses de l'environnement, l'application des extraits de plantes et des huiles essentielles constituent une voie prometteuse et une méthode alternative de lutte contre les agents pathogènes responsables des maladies fongiques [6]. En effet, les pesticides à base d'extraits de plantes sont efficaces contre une large gamme d'agents pathogènes et ne sont pas ou peu néfastes pour la santé du consommateur [7]. Cette étude a été conduite en vue d'étudier la composition chimique de l'huile essentielle extraite des feuilles fraîches de *Ocimum gratissimum*. Sa fungitoxicité sera également évaluée en conditions de culture *in vitro* sur trois différents isolats de *Fusarium oxysporum* W.C Snyder et H.N. Hansen.

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Matériel

#### 2-1-1. Matériel végétal

Les feuilles de *Ocimum gratissimum*, utilisées pour l'obtention de l'huile essentielle proviennent de plantes de la variété *macrophyllum* (non pubescente). Elles ont été récoltées sur la parcelle expérimentale du

Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Félix Houphouët-Boigny. La variété tropimèch, cultivar de tomate à croissance indéterminée, bien adapté aux climats tropicaux a été utilisé pour évaluer l'effet de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* sur le flétrissement et la pourriture du collet des plants de tomate.

### **2-1-2. Isolats fongiques**

Trois isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* utilisés au cours de l'essai *in vitro* ont été obtenus à partir de plants de tomate provenant de Bonoufla, de Korhogo et de San-Pedro. Ces plants présentent des symptômes de flétrissement et de pourriture du collet.

### **2-1-3. Fongicides de synthèse**

Le BANKO PLUS 650 SC (Chlorothalonil à 550 g/L + Carbendazime à 100 g/L) et l'IVOIRY 80 % WP (Mancozèbe à 800 g/kg), deux fongicides de synthèse utilisés en culture maraîchère, ont été les produits de référence utilisés.

## **2-2. Méthodes**

### **2-2-1. Production de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum***

L'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* a été obtenue à partir des feuilles fraîches, par entraînement à la vapeur d'eau saturée réalisé avec le dispositif de type Clevenger pendant 2 h [8]. Cette méthode consiste en une distillation classique dans laquelle les feuilles ne sont pas en contact direct avec l'eau. Ces feuilles sont disposées sur une grille et traversées par un courant de vapeur d'eau. Lors du passage de la vapeur les cellules des feuilles s'éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est entraînée vers le condenseur puis, l'essencier. La séparation se fait par décantation.

### **2-2-2. Caractérisation de la composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum***

La détermination de la composition de l'huile a été faite par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) couplée à un spectromètre de masse (SM). Les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Perkin Elmer autosystem, équipé d'un injecteur diviseur de deux colonnes et de deux détecteurs à ionisation de flamme. L'identification des composés de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* s'est basée sur la comparaison de leur temps de rétention (TR) à ceux des composés de référence contenus dans une banque de données.

### **2-2-3. Obtention des isolats de *Fusarium oxysporum***

Trois isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ont été obtenus à partir de plants de tomate présentant des symptômes de flétrissement. Les échantillons ont été prélevés à Bonoufla, à Korhogo et à San-Pedro, trois localités de différentes zones agro-écologiques de Côte d'Ivoire. Les collets et les tiges des plants ont été prélevés pour l'isolement du pathogène. Les différentes parties de chaque échantillon ont été découpées en fragments d'environ 0,5 cm, puis désinfectées superficiellement par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 4 p.c. pendant 5 min. Les fragments ont été rincés 2 fois de suite dans de l'eau distillée stérile pendant 5 min puis séchés entre 2 papiers filtres stériles. Les fragments séchés ont été déposés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture PDA amandé avec du sulfate de streptomycine à raison de 200 mg/L. Les boîtes ont été disposées dans une salle d'incubation à une température de 25 °C. La purification de chaque isolat a été réalisée en repiquant successivement des fragments du front de croissance des jeunes cultures en développement. Afin de s'assurer de l'état de pureté des colonies, des cultures monospores ont été réalisées pour les trois isolats. L'identification de l'agent pathogène a été réalisée microscopiquement, et ceux d'après les caractéristiques des macroconidies et des microconidies, à l'aide d'une clé de détermination [9].

#### 2-2-4. Test de fongitoxité

La méthode d'incorporation au milieu gélosé a été appliquée pour évaluer l'effet fongitoxique des produits testés. Quinze bouteilles contenant chacune 100 mL de milieu PDA préalablement préparé ont été stérilisées à 121 °C pendant 30 min par autoclavage. Pour l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum*, des volumes de 20 ; 40 ; 60 ; 80 et 100 µL ont été prélevés à l'aide d'une micropipette puis incorporés respectivement à cinq milieux nutritifs refroidis à 45 °C afin d'obtenir des milieux PDA ayant des concentrations de 200 ; 400 ; 600 ; 800 ; et 1000 µl/L en huile essentielle. Pour les deux fongicides de synthèse, deux solutions mères ont préalablement été préparées aux doses de 1000 µl/L de mancozèbe ou de chlorothalonil en diluant respectivement 125 mg de Ivoiriy 80 (mancozèbe 80 p.c.) et 182 µL de Banko- plus (550 g/L de chlorothalonil) dans 100 mL d'eau distillée stérile. A partir de ces solutions mères, des volumes de 200 ; 400 ; 600 ; 800 et 1000 µL ont été prélevés à l'aide d'une micropipette puis injectés dans les milieux nutritifs PDA de 100 ml afin d'obtenir des concentrations de 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 µl/L respectivement pour le mancozèbe et le chlorothalonil. Ces milieux nutritifs ont été distribués dans des boîtes de Pétri de 90 mm et ensemencées avec les trois isolats de *Fusarium oxysporum*. Des disques d'agar de 6 mm de diamètre, portant le mycélium de chaque isolat ont été individuellement déposés dans les boites de Pétri au centre des différents milieux de culture solidifiés. Ces boîtes ont été incubées à une température de 25 °C, correspondant à l'optimum de croissance de ce champignon [10]. La sensibilité du champignon a été évaluée en mesurant la croissance radiale du mycélium toutes les 48 h. L'expérience a duré 10 Jours (J) et répétée 3 fois. Le taux de réduction de la croissance (TRC) par rapport au témoin a été calculé au 10<sup>e</sup> J d'évaluation selon la **Formule** suivante :

$$TRC = \frac{(T - E)}{T} \times 100 \quad (1)$$

*T* = croissance moyenne du champignon dans le milieu de culture sans huile essentielle ni fongicide de synthèse (mm) ; *E* = croissance moyenne du champignon dans le milieu de culture à une concentration *C* de l'huile essentielle ou du fongicide de synthèse (mm) ; TRC = Taux de réduction de la croissance.

La CI<sub>50</sub> et la CI<sub>90</sub> (concentrations inhibitrices de 50 p.c. et 90 p.c. de la croissance mycélienne) de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* et des deux fongicides de synthèse ont été déterminées avec le logiciel ED<sub>50</sub> plus V1.0. Les pourcentages d'inhibition ont été transformés en probits et à partir d'une modélisation intégrant la courbe de tendance, l'équation de la droite associée et log<sub>10</sub>, les très faibles doses d'inhibition ont été déterminées.

#### 2-3. Analyses statistiques

L'analyse de variance (ANOVA) à deux critères de classification, a été utilisée pour évaluer l'effet combiné du produit et de la dose incorporée au milieu PDA sur le taux de réduction de la croissance mycélienne des trois isolats de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Le test de Newman Keuls a permis de comparer les valeurs moyennes au risque α de 5 % afin de classer les différents produits et les doses incorporées en fonction de leur toxicité sur la croissance des isolats de *Fusarium oxysporum*. Les analyses statistiques des données ont été réalisées avec le logiciel STATISTICA version 7.1.

### 3. Résultats

#### 3-1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum*

L'analyse chimique réalisée par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) a permis d'identifier 42 composés (*Tableau 1*). Ceux-ci ont eu une teneur supérieure ou égale à 0,057 p.c. avec des temps de rétention qui ont varié de 10,002 à 28,961 min. L'examen de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* a indiqué qu'il est à majorité monoterpénique (89,34 p.c.), avec une prépondérance de composés oxygénés (*Tableau 2*). Le Thymol (46,1 p.c.) est le composé majoritaire. Dans le groupe des monoterpènes hydrocarbonés, le Gamma terpinène a représenté 17,56 p.c. du mélange.

**Tableau 1** : Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum*

	R.T. (min)	KI cal	KI banq	Composés	Proportion (p.c.)
1	10,002	926	931	Alpha thujène	4,346
2	10,25	933	939	Alpha pinène	1,177
3	10,843	949	953	Camphène	0,127
4	11,675	972	976	Sabinène	0,579
5	11,837	977	980	Beta pinène	0,383
6	12,164	986	984	Octanone-3	0,057
7	12,281	989	991	Myrcène	3,679
8	12,848	1006	1005	Alpha phéllandrène	0,269
9	12,919	1008	1011	Delta-3-carène	0,181
10	13,22	1017	1018	Alpha terpinène	2,538
11	13,507	1025	1026	Para cymène	7,513
12	13,642	1030	1031	Limonène	0,778
13	13,692	1031	1031	Béta phellandrène	0,255
14	13,877	1037	1040	Z-béta-ocimène	0,394
15	14,23	1047	1050	E-béta-ocimène	0,193
16	14,663	1060	1062	Gamma terpinène	17,564
17	15,046	1072	1068	Cis hydrate de sabinène	0,577
18	15,501	1086	1088	Terpinolène	0,157
19	15,667	1091	1089	Para cyménème	1,243
20	15,99	1100	1096	linalol	0,092
21	16,045	1102	1098	Trans hydrate de sabinène	0,181
22	16,381	1114	1111	Para mentha-1,3,8- triène	0,098
23	16,568	1120	1114	Transtujone	0,119
24	18,261	1177	1165	Bornéol	0,325
25	18,506	1185	1182	Terpinène-4-ol	0,939
26	18,712	1192	1183	Para cymène-8-ol	0,152
27	18,973	1201	1196	Alpha terpinéol	0,09
28	19,884	1234	1235	Thymol méthyl éther	0,335
29	21,737	1300	1290	Thymol	46,104
30	21,879	1305	1298	Cavacrol	0,683
31	23,147	1354	1351	Alpha cubébène	0,076
32	23,262	1358	1356	Eugénol	0,113
33	23,914	1383	1376	Alpha copaène	0,593
34	24,252	1396	1391	Béta élémène	0,139
35	25,057	1428	1418	Béta caryophyllène	2,524
36	25,337	1440	1434	Trans alpha bergamotène	0,075
37	25,942	1465	1454	Alpha humulène	0,295
38	26,603	1491	1486	Béta sélénène	1,004
39	26,769	1498	1494	Alpha sélénène	1,859
40	26,924	1505	1505	Alpha bulnésène	0,664
41	27,416	1526	1520	Delta cadinène	0,367
42	28,961	1593	1581	Oxyde de caryophyllène	0,61

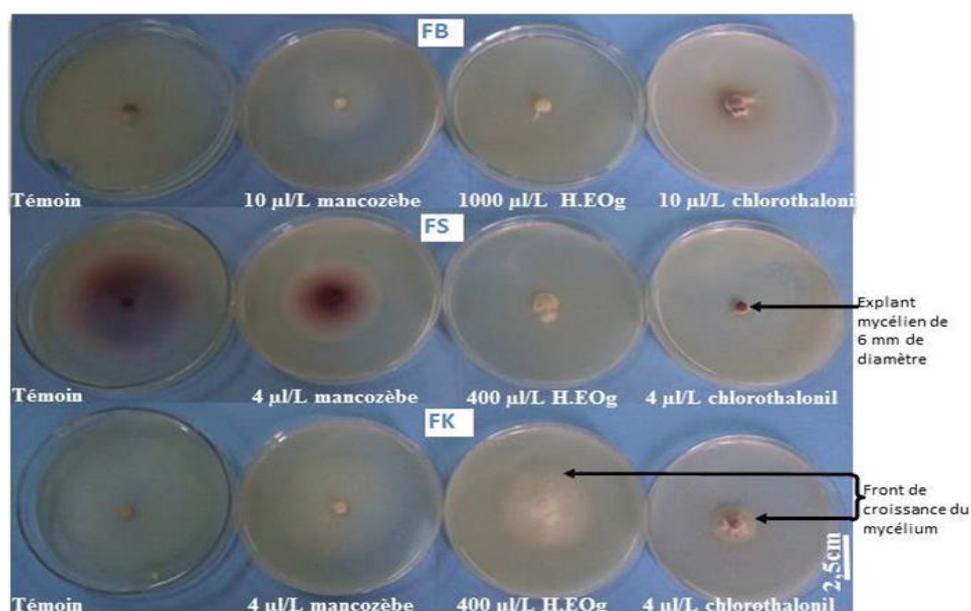
*R.T (min)* : Temps de rétention en minute, *KI cal* : Indice de Kovats ou de rétention calculé, *KI banq* : Indice de Kovats ou de rétention contenu dans la banque de données.

**Tableau 2 : Composition en terpènes de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum***

Composés terpéniques	Proportions (p.c.)
Monoterpènes hydrocarbonnés	37,414
Monoterpènes oxygénés	48,233
Sesquiterpènes hydrocarbonnés	3,702

### 3-2. Test de fongitoxicité en condition de culture *in vitro*

La sensibilité des trois isolats de *Fusarium oxysporum* (FB, FS et FK) a été différente selon que le produit utilisé est l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* (H.E Og.) ou un fongicide de synthèse (**Figure 1**). Sur l'isolat de *F. oxysporum* provenant de Bonoufla (FB), l'effet de l'H.E Og. a été moyennement fongitoxique à 200  $\mu\text{l/L}$ . A cette concentration, 55,93 p.c. de réduction de la croissance mycélienne a été atteinte (**Tableau 3**). A 400  $\mu\text{l/L}$ , l' H.E. Og. a été hautement fongitoxique avec 86,48 p.c. de réduction de la croissance mycélienne. La réduction maximale (93,33 p.c.) a été obtenue aux doses de 800 et 1000  $\mu\text{l/L}$ . A ces concentrations, l'effet de l'H.E Og. a été statistiquement identique à celui du mancozèbe utilisé à 8 et 10  $\mu\text{l/L}$ . En présence de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum*, la valeur de la  $\text{CI}_{50}$  a été la plus faible (**Tableau 4**). Elle a induit 90 p.c. de réduction de la croissance mycélienne à la dose de 755,2  $\mu\text{l/L}$ . Sur l'isolat de *F. oxysporum* provenant de San-pédro (FS), l'H.E Og a montré une bonne aptitude à la réduction de la croissance mycélienne pour l'ensemble des concentrations utilisées (**Tableau 3**). Ainsi, la concentration de  $10^{-9}\mu\text{l/L}$  de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* a réduit 50 p.c. de la croissance du champignon. Avec le mancozèbe et le chlorothalonil, ces concentrations ont été respectivement de 4,01 et 1,47  $\mu\text{l/L}$ . Sur l'isolat de *F. oxysporum* provenant de Korhogo (FK), les taux de réduction de la croissance mycélienne n'ont pas été significativement différents pour les 3 produits évalués aux doses les plus faibles (**Tableau 3**). Avec l' H.E Og, ces valeurs sont passées de 54,44 p.c. à 75,74 p.c. aux concentrations de 200  $\mu\text{l/L}$  à 400  $\mu\text{l/L}$ . La même activité antifongique a été observée avec le mancozèbe et le chlorothalonil, où les taux de réduction ont augmenté, respectivement, de 49,44 p.c. à 93,33 p.c. et de 55,37 p.c. à 68,89 p.c. pour les concentrations de 2 à 4  $\mu\text{l/L}$ . L'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* s'est montré hautement fongitoxique avec les plus faibles valeurs de la  $\text{CI}_{50}$  ( $10^{-1}\mu\text{l/L}$ ).



**Figure 1 : Effet de différentes concentrations de mancozèbe, de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* et de chlorothalonil sur la croissance mycélienne des isolats de *Fusarium oxysporum* de Bonoufla (FB), de San-Pédro (FS) et de Korhogo (FK)**

FB : Isolat de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* provenant de Bonoufla

FS : Isolat de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* provenant de San-pédro

FK : Isolat de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* provenant de Korhogo

H.E Og : Huile essentielle de *Ocimum gratissimum*

**Tableau 3 :** Effet de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum*, du mancozèbe et du chlorothalonil sur la croissance des 3 isolats de *Fusarium oxysporum*

Produits	Concentrations (ppm)	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne (%)		
		Isolats de <i>Fusarium oxysporum</i>		
		Bonoufla	San Pédro	Korhogo
<i>Ocimum gratissimum</i>	200	55,93 g	81,25 a	54,44 e
	400	86,48 c	90,07 a	75,74 cd
	600	89,26 ac	90,07 a	80 acd
	800	93,33 b	90,07 a	93,33 ab
	1000	93,33 ab	90,07 a	93,33 ab
Mancozèbe	2	38,89 i	31,91 c	49,44 e
	4	40,37 i	33,55 c	93,33 ab
	6	45 h	90,07 a	93,33 ab
	8	93,33 b	90,07 a	93,33 b
	10	93,33 b	90,07 a	93,33 b
Chlorothalonil	2	57,41 g	57,26 b	55,37 e
	4	69,81 f	60,03 b	68,89 d
	6	73,33 e	60,56 b	71,85 cd
	8	78,7 d	88,42 a	74,44 cd
	10	86,11 c	90,07 a	84,44 abc

Les taux d'inhibition d'une colonne suivis de la même lettre sont statistiquement identiques au seuil  $\alpha = 5\%$  (test Newman-keuls).

**Tableau 4 :** Concentrations de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* et des fongicides de synthèse réduisant de 50 p.c. ( $CI_{50}$ ) et de 90 p.c. ( $CI_{90}$ ) la croissance mycélienne au 10<sup>e</sup> jour d'incubation des cultures de *Fusarium oxysporum*

	Isolats de <i>Fusarium oxysporum</i>								
	FB			FK			FS		
	$CI_{50}$ ( $\mu$ l/l)	$CI_{90}$ ( $\mu$ l/l)	R <sup>2</sup>	$CI_{50}$ ( $\mu$ l/l)	$CI_{90}$ ( $\mu$ l/l)	R <sup>2</sup>	$CI_{50}$ ( $\mu$ l/l)	$CI_{90}$ ( $\mu$ l/l)	R <sup>2</sup>
Mancozèbe	4,49	9,43	0,8	0,21	7,24	0,5	4,01	8,64	0,75
H.E. O.g	0,14	755,2	0,67	10 <sup>-1</sup>	822,9	0,89	10 <sup>-9</sup>	792	0,50
Chlorothalonil	1,43	11,10	0,96	1,57	11,9	0,9	1,47	9,98	0,81

FB : Isolat de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* provenant de Bonoufla

FS : Isolat de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* provenant de San-pédro

FK : Isolat de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* provenant de Korhogo

H.E Og : Huile essentielle de *Ocimum gratissimum*

R<sup>2</sup> : Coefficient de corrélation

#### 4. Discussion

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle extraite des feuilles fraîches de *Ocimum gratissimum* a mis en évidence la présence de quarante-deux (42) différents composés dans les feuilles fraîches de *Ocimum gratissimum* collectées sur le site expérimental de l'Université Félix Houphouët Boigny (Côte d'Ivoire). Ces composés aromatiques obtenus après des temps de rétention (RT) compris entre 10 et 30 min, sont caractérisés par une forte présence de composés oxygénés (48,23 p.c.) et d'hydrocarbure 41,1 p.c. Les composés majoritairement identifiés dans l'huile essentielle ont été le thymol (46,1 p.c.) et du  $\gamma$ -terpinène (17,6 p.c.). La comparaison des composés oxygénés et hydrocarbonés de cette essence à ceux obtenus par des travaux antérieurs [8] a montré une légère différence en quantité de ces deux groupes de composés. L'huile essentielle de *O. gratissimum* utilisée au cours des travaux de [8] a été extraite des feuilles en provenance de Dimbokro et a identifiée 54 composés dont 54 p.c. de composés oxygénés et 46 p.c. d'hydrocarbures. Cette différence en nombre de composés isolés pourrait s'expliquer par le fait que l'extraction a été faite uniquement sur les feuilles et les fleurs, et aussi due à certains facteurs tels que la période de récolte, l'origine et les conditions édaphoclimatiques de chaque région [11, 12]. En plus de ces facteurs, les méthodes d'analyses, la procédure d'extraction utilisée auraient également un effet déterminant dans la composition chimique de l'essence étudiée [13].

En effet, il a été rapporté que l'extraction éthanolique des feuilles de *O. gratissimum* fourni un nombre moins important de composés chimiques avec l'absence de certains métabolites secondaires comme les tannins, les anthroquinones et les flavonoïdes [14]. Des études ont montré que l'eugénol et le  $\beta$ -sélinène sont les composés majoritaires de l'huile essentielle lorsqu'elle est extraite avec du CO<sub>2</sub> supercritique [15]. L'extraction, par entraînement à la vapeur d'eau saturée, utilisée au cours de cette étude, permet donc de corriger les problèmes de dégradations des esters et des aldéhydes. Cette dégradation serait liée au contact du matériel végétal avec l'eau et aux températures élevées. La méthode d'extraction utilisée dans la présente étude permet d'accroître le nombre et l'efficacité des composés isolés. La variabilité des composés majoritaires des essences d'une région à l'autre confirme les résultats des travaux de certains auteurs [16]. Ceux-ci ont mis en évidence des composés majoritairement monoterpénique dans l'huile extraite des plantes récoltées au Cameroun dont les hydrocarbures ont été les plus abondants. Cette composition chimique diffère d'avec celle obtenue au cours de cette étude, malgré l'utilisation de la même méthode d'analyse (chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse). De nombreuses études ont montré que les huiles essentielles, extraites des feuilles de *O. gratissimum* provenant de la Côte d'Ivoire sont composées du chémotype à thymol [8, 17 - 19] associé soit au  $\gamma$ -terpinène ou soit au para- cymène.

Les travaux réalisés sur la composition de la même essence, mais en provenance de la République Démocratique du Congo ont montré que le thymol (53,2 p.c.) est le composé majoritaire [20]. Sa composition présente des similitudes avec des essences extraites des feuilles provenant de certaines localités de la Côte d'Ivoire. Les travaux réalisés par [21, 22] ont indiqué que l'huile essentielle extraite des feuilles de *Ocimum gratissimum* du Kenya et du Brésil, est caractérisée par sa richesse en eugénol. Ces deux chémotypes proviennent de deux variétés différentes de *Ocimum gratissimum* qui se distinguent par leur composition chimique en huile essentielle, en constituants non volatiles et la présence ou non de poils sur les parties aériennes de la plante [22]. La variété *macrophyllum* de *Ocimum gratissimum* contient une huile essentielle riche en thymol et le xantomicrol est le flavonoïde le plus abondant. Quant à la variété *gratissimum*, elle renferme une huile essentielle riche en eugénol et le flavonoïde le plus important est la cirsimaritrine. Morphologiquement, la variété *macrophyllum* est glabre tandis que la variété *gratissimum* est pubescente. L'espèce utilisée au cours de cette étude étant glabre, et dont l'huile essentielle est riche en thymol, il peut donc s'agir de la variété *macrophyllum*. La fongitoxicité de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* a été évalué en condition de culture *in vitro*. La croissance mycélienne des différents isolats de

*Fusarium oxysporum* étudiés a été réduite selon le produit à évaluer et la dose apportée au milieu de culture. Pour l'ensemble des isolats, les plus faibles concentrations ayant induit la réduction de la croissance mycélienne ont été obtenues avec l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum*. Ce résultat suggère l'existence d'un principe actif à très forte propriété antifongique, capable d'inhiber la croissance mycélienne des isolats de *Fusarium oxysporum* (FB, FK et FS). Cette forte activité antifongique de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* a également été mise en évidence sur le champignon tellurique *Sclerotium rolfsii* à des concentrations comprises entre 50 et 500 µl/L [23]. Elle est caractérisée par une forte présence de composés oxygénés (48,23 p.c.) et d'hydrocarbure (41,1 p.c.). Les composés, les plus abondants, sont le thymol et γ terpinène. L'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est fonction de sa teneur en monoterpènes oxygénés et en certains monoterpènes hydrocarbonés tels que le γ terpinène et le paracymène [24, 25]. Des précédentes études ont montré l'importance du thymol et du γ terpinène dans l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* [25 - 28]. D'autres travaux [29] ont montré que le thymol et le citral sont les composés des huiles essentielles qui offrent la plus forte activité antifongique contre *Penicillium expansum* [29]. Cette forte activité antiparasitaire du thymol a également été mise en évidence par [30] dans l'activité insecticide de *Origanum syriacum*. Le chlorothalonil (Chloronitrile) et le mancozèbe (Dithiocarbamate), antifongiques chimiques ont également réduit la croissance mycélienne des trois isolats de *Fusarium oxysporum*. Cependant, cette efficacité est moindre aux faibles concentrations. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à ces concentrations, la matière active de chaque produit n'a pas encore atteint un degré de toxicité capable d'inhiber la croissance mycélienne. [31] a également montré une faible réduction de la croissance mycélienne de *Fusarium* sp. à des faibles concentrations de carbendazime. Les travaux de [32] confortent nos résultats.

En effet, ces auteurs ont mis en évidence l'effet fongitoxique du Thirame (Dithiocarbamate) sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* avec des  $CI_{50}$  de 3,3 à 17 µl/L. L'Agence pour la protection de l'environnement (EPA) recommande 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> (ou ppm) pour les tomates [33]. Food Safety Authority des États-Unis peut accepter jusqu'à 4 ppm comme LMR, [34]. L'Autorité européenne de sécurité des aliments fixe les LMR à 0,5 ppm pour les choux et à 3 ppm pour les tomates, [35]. Tous les isolats testés se sont développés à des doses supérieures à ces concentrations recommandées, leur inhibition totale avec le mancozèbe ou le chlorothalonil pourrait occasionner l'accumulation de résidus chimiques dans les tomates et être considérés comme source de contamination. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* a été le plus efficace sur la réduction de la croissance mycélienne aux différentes doses évaluées. Cependant, les  $CI_{50}$  et les  $CI_{90}$  ont varié d'un champignon à un autre. [25, 36] ont montré que le mode d'action d'une huile essentielle varie en fonction de sa composition, de la méthode d'évaluation, du milieu de culture (solide ou liquide) et du microorganisme pathogène. La variation des concentrations inhibitrice à 50 p.c. et à 90 p.c. serait liée à la nature du microorganisme, puisque, tous ont été soumis au même milieu de culture et à la même huile essentielle. Les travaux de certains auteurs [37] ont montré que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des plantes aromatiques ou de certains de leurs constituants tels que le thymol, le carvacrol, la vanilline sont à l'origine de la dégradation de la structure, du système enzymatique et énergétique des cellules des microorganismes. En effet, une fois la barrière membranaire a été franchie, les composés phénoliques établissent des liaisons avec les enzymes membranaires et protéiques à l'origine d'un flux inverse des protons qui affecte l'activité cellulaire. L'eugénol et le linalool ont montré la même activité contre *Giardialam blattrophozoites* (Lambl.) [38]. Les travaux antérieurs [39] ont montré une activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur la membrane plasmique de quelques souches d'*Aspergillus niger* Van Tieghen à des doses comprises entre 200 et 1000 mg/L.

## 5. Conclusion

L'analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à une Spectrométrie de Masse (CPG/SM) de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* a révélé la présence de 42 composés dont 48,23 p.c. de composés oxygénés ; 41,1 p.c. d'hydrocarbures et 10,65 p.c. d'autres composés. Le thymol (46,1 p.c.) et le  $\gamma$ -terpinène (17,6 p.c.) ont été identifiés comme les composés majoritaires. L'évaluation *in vitro* de l'effet antifongique de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* a révélé son efficacité à très faible dose. Elle semble donc prometteuse comme matière active dans une formulation biopesticide contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Cette potentialité devrait cependant être validée dans des essais en conditions contrôlées et en plein champ d'une durée plus longue.

## Références

- [1] - C. Y. KOFFIE-BIKPO, A. ADAYE, Agriculture commerciale à Abidjan : le cas des cultures maraîchères GREP, 4 (224) (2014) 141 - 149
- [2] - S. SORO, M. DOUMBIA, D. DAO, A. TSCHANNEN et O. GIRARDIN, Performance de 6 cultivars de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. contre la jaunisse en cuillère des feuilles, le flétrissement bactérien et les nématodes à galles, *Science et Nature*, 4(2) (2007) 123 - 130
- [3] - A. C. N'GUESSAN, A. ABO, L. FONDIO, F. CHIROLEU, A. LEBEAU, S. POUSSIER, E. WICKER et D. KONÉ, So near and yet so far : The specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Côte d'Ivoire in Africa. *Phytopathology*, 102 (2012) 733 - 740
- [4] - M. KANDA, G. DJANEYE-BOUNDJOU, K. WALA, K. GNANDI, K. BATAWILA, A. SANNI et K. AKPAGANA, « Application des pesticides en agriculture maraîchère au Togo », *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement*, 13 (1) (2013) 1 - 17
- [5] - P. FERRON et J. P. DEGUINE, Vers une conception agroécologique de la protection des cultures. In Regnault-Roger, C. (Ed), Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, Lavoisier Tec. And Doc., Paris, (2005) 347 - 366 p.
- [6] - ANONYME 1, Journées PNPP - Substances naturelles en production végétale, 26 et 27 avril (2016) 45 p.
- [7] - B. YAROU, P. SILVIE, F. ASSOGBA KOMLAN, A. MENSAH, T. ALABI, F. VERHEGGEN et F. FRANCIS, Plantes pesticides et protection des cultures maraîchères en Afrique de l'Ouest (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 21 (4) (2017) 288 - 304
- [8] - OUSSOU K. R, Etude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *Thèse de Doctorat Unique*. Laboratoire de Chimie Organique et Structurale, UFR SSMT, Université de Cocody-Abidjan, (2009) 241 p.
- [9] - M. F. ROQUEBERT, Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification", in "Moisissures des aliments peu hydratés", Ed. Tec & Doc, (1998) 39 - 95
- [10] - K. HIBAR, La fusariose du collet et des racines de la tomate : Pathogénicité et moyens de lutte. *Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies en Protection des Plantes et Environnement*. École Supérieure d'Horticulture et d'Élevage de Chott Mariem, (2002) 54 p.
- [11] - F. TCHOUMBOUGNANG, Variability in the chemical compositions of the essentials oils of five *Ocimum* species from Tropical African Area. *Journal of Essential Oil Research*, 18 (2) (2006) 194 - 199
- [12] - N. P. AKONO, P. BELONG, F. TCHOUMBOUGNANG, E. M. BAKWO FILS et H. FANKEM Composition chimique et effets insecticides des huiles essentielles des feuilles fraîches d'*Ocimum canum* Sims et d'*Ocimum basilicum* L. sur les adultes d'*Anopheles funestus* ss, vecteur du paludisme au Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 59 (2012) 4340 - 4348

- [13] - B. T. SCHANEBERG et I. A. KHAN Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 1345 - 1349
- [14] - I. EMEKA et E. ELIZABETH, Justification for the use of *Ocimum gratissimum* L. in herbal medicine and its interaction with disc antibiotics, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9 (2009) 37
- [15] - P. F. LEAL, F. M. CÉLIO, C. MING et J. ADEMIR Global yields, chemical compositions and antioxidant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) extracts obtained by supercritical fluid extraction, *Journal of Food Process Engineering*, 29 (5) (2006) 547 - 559
- [16] - F. TCHOUMBOUNANG, P. M. DONGMO, M. L. SAMEZA, N. FOMBOTIOH, N. WOUATSA, Z. AMVAM & C. MENUT, Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of *Piper capense* L., *Piper guineense* Schum. et Thonn., *Piper nigrum* L. and *Piper umbellatum* L. grown in Cameroon, *African Journal of Biotechnology*, 8 (3) (2008) 424 - 431
- [17] - C. KANKO, Contribution à l'étude phytochimique de plantes médicinales et aromatiques de Côte d'Ivoire. Activités analgésique et anti-inflammatoire de stérols isolés de l'écorce de *Parkia biglobosa* (Mimosaceae). *Thèse de Doctorat d'Etat*. UFR SSMT, Université de Cocody-Abidjan, (2010) 150 p.
- [18] - Z. F. TONZIBO, A. M. KOFFI, Z. F. TONZIBO, L. DELORT, N. RUIZ, L. CALDEFIE-CHÉZET & J. C. CHALCHAT, Corrélation entre la composition chimique et l'activité antifongique des huiles essentielles à prédominance thymol sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*. *Phytothérapie*, 11 (2013) 134 - 139
- [19] - K. R. OUSSOU, S. F. YOLOU, B. TUE BI, C. KANKO, J. B. BOTI, C. AHIBO and J. CASANOVA, Etude chimique bio-guidée de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Research*, 40 (1) (2010) 50 - 59
- [20] - K. CIMANGA, K. KAMBU & L. TONA, Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, *Journal Ethnopharmacology*, 79 (2) (2002) 213 - 220
- [21] - L. G. MATASYOH, J. C. MATASYOH, F. N. WACHIRA, M. G. KINYUA & T. K. MUKIAMA, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya, *African Journal Biotechnology*, 6 (2007) 760 - 765
- [22] - E. S. B. CAVALCANTI, S. M. DE MORAIS, M. A. A. LIMA et E. W. P. SANTANA, Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L.; *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99 (5) (2004) 541 - 544
- [23] - M. DOUMBOUYA, S. TUO, S. OUEDRAOGO, B. CAMARA, B. BOLOU, T. H. KOUAKOU et D. KONE, Activités comparées *in vitro* de deux fongicides de synthèse et de deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraîchères en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 50 (2012) 3520 - 3532
- [24] - M. ŠEGVIĆ KLARIĆ, I. KOSALEC, J. MASTELIĆ, E. PIECKOVÁ & S. PEPELJNACK, Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings, *Letters in Applied Microbiology*, 44 (1) (2007) 36 - 42
- [25] - J. NGUEFACK, B. B. BUDDE & M. JAKOBSEN, Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry, *Letters in Applied Microbiology*, 39 (5) (2004) 395 - 400
- [26] - K. S. L. MOTA, F. O. PEREIRA, W. A. OLIVEIRA, I. O. LIMA et E. O. LIMA Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol, *Molecules*, 17 (2012) 14418 - 14433
- [27] - P. SESSOU, F. SOUAÏBOU, G. ALITONOU, T. S. DJENONTIN, B. YEHOUENOU, P. AZOKPOTA, I. YOUSAO et D. SOHOUNHLOUE, Chemical Composition and Antifungal activity of Essential oil of Fresh leaves of *Ocimum gratissimum* from Benin against six Mycotoxigenic Fungi isolated from traditional cheese *wagashi*. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1 (4) (2012) 22 - 27
- [28] - F. JOHNSON, K. R. OUSSOU, C. KANKO, Z. F. TONZIBO, K. FOUA-BI et Y. TANO Bioefficacite des huiles essentielles de trois espèces végétales (*Ocimum gratissimum*, *Ocimum canum* et *Hyptis*

- suaveolens*), de la famille des Labiées dans la lutte contre *Sitophilus zeamais*, *European Journal of Scientific Research*, 150 (3) (2018) 273 - 284
- [29] - M. E. VENTURINIC, D. BLANCO & R. ORIA, *In vitro* antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*, *Journal of Food Protection*, 65 (5) (2002) 834 - 839
- [30] - A. F. TRABOULSI, K. TAOUBI, S. EL-HAJ, J. M. BESSIERE et S. RAMMAL, Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae), *Pest Management Sciences*, 58 (5) (2002) 491 - 495
- [31] - T. M. OMAR, Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim, *Plant pathology*, 55 (2006) 92 - 99
- [32] - A. HMOUNI, L. OIHABI, A. BADOUC, A. DOUIRA, Etude de la résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles, dicarboximides et dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate de la région du Gharb (Maroc), *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 142 (2003) 79 - 100
- [33] - EPA, Mancozeb, Maneb, Metiram and Thiram; Proposed Tolerance Actions, *Federal Register*, 74 (178) (2009) 47507 - 47517
- [34] - FSA, Pesticide MRL Database. *NZ Food Safety Authority*, (2005) 1 - 49
- [35] - EFSA, Modification of the existing MRLs for mancozeb in fresh peas (without pods) on request from the European Commission, *European Food Safety Authority Journal*, 8 (1) (2010) 1 - 27
- [36] - A. M. JANSSEN, J. J. C. SCHEFFER & A. B. SVENDSEN, Antimicrobial activity of essential oils : a 1976–1986 literature review. Aspects of the test methods, *Panta Medica*, 53 (5) (1987) 395 - 398
- [37] - L. R. BEUCHAT, Comparison of chemical treatments to kill *Salmonella* on alfalfa seed destined for sprout production, *International Journal of Food Microbiology*, 34 (3) (1997) 329 - 333
- [38] - F. TCHOUMBOUNANG, P. M. JAZET DONGMO, M. L. SAMEZA, E. G. NKOUAYA MBANJO, G. B. TIAKO FOTSO, P. H. AMVAM ZOLLO, C. MENUT, Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun, *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 13 (1) (2009) 77 - 84
- [39] - L. N. TATSADJIEU, M. B. NGASSOUM, E. N. NUKENINE, A. MBAWALA & A. YAOUBA, Antifungal and Anti-insect Activities of three Essential Oils on *Aspergillus flavus* Link and *Sitophilus Zeamais* Motsch, *Natural Product communications*, 2 (12) (2007) 1291 - 1294