



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Evaluation *in vitro* de l'activité fongicide de l'extrait aqueux des feuilles de *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae) sur *Fusarium* sp.

Dabé DOGA^{1*}, Katinan Etienne OUATTARA², Bosson Arobia Marie Bernadine ORSOT³, Guédé Noël ZIRIHI² et Adolphe ZEZE⁴

¹Laboratoire de Phytopathologie, Station de Recherche de Lataha (Korhogo), Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), BP 856 Korhogo, Côte d'Ivoire.

²Laboratoire des Milieux Naturels et Conservation de la Biodiversité, UFR Biosciences, Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

³Département de Biologie Végétale, UFR Sciences Biologiques, Université Peleforo GON COULIBALY, BP 1328 Korhogo, Côte d'Ivoire.

⁴Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Microbiologie Environnementale, UMRI Sciences Agronomiques et Génie Rural, Institut National Polytechnique Félix HOUPHOUËT-BOIGNY (INP-HB), BP 1093 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire.

*Auteur correspondant, E-mail : dabedoga@gmail.com, Tel : +225 0758061081

Received: 25-05-2022

Accepted: 22-10-2022

Published: 31-10-2022

RESUME

Les exigences des marchés internationaux, les préoccupations environnementales et la santé des consommateurs ne favorisent pas l'application de la lutte chimique contre la pression parasitaire en agriculture. La stratégie est donc de développer des méthodes compatibles avec les préoccupations environnementales. Ainsi, l'utilisation des biopesticides pourrait être une solution. L'activité fongicide de l'extrait aqueux des feuilles de *Crotalaria retusa* L. a été évaluée sur *Fusarium* sp. Ce champignon a été testé sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) amendé de l'extrait végétal à différentes concentrations. Le mycélium a atteint la périphérie de la boîte de Pétri le septième jour. Les taux d'inhibition observés dans les milieux essais (milieux amendés) après ces sept jours d'incubation étaient de $87.67 \pm 4.99\%$ pour la concentration 0.39 mg/mL et de $98.73 \pm 0.63\%$ pour la concentration 0.78 mg/mL. Ces taux d'inhibition de la croissance mycélienne ont augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Concernant les milieux de concentrations 1.56 mg/mL, 3.12 mg/mL, 6.25 mg/mL, 12.50 mg/mL et 25 mg/mL, il n'y a pas eu de croissance mycélienne. L'inhibition a été totale (100%). La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait végétal sur la croissance mycélienne était 1.56 mg/mL. La concentration minimale fongicide (CMF) de l'extrait végétal a été obtenue à 12.50 mg/mL. Quant aux CI_{50} et CI_{90} , elles ont été respectivement 0.21 mg/mL et 0.42 mg/mL. Cet extrait végétal a montré une efficacité contre le *Fusarium* sp. Il pourrait donc être utilisé comme un fongicide. © 2022 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Activité antifongique, *Crotalaria retusa* L., champignon phytopathogène.

Assessment of *in vitro* fungicidal activity of the aqueous extract of the leaves of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae) on *Fusarium* sp.

ABSTRACT

International market expectations, environmental concerns and consumer health do not encourage the use of chemical pest control methods in agriculture. A strategy is to develop methods that are compatible with

environmental concerns. Thus, the use of biopesticides could be a remedial solution. The fungicidal activity of the aqueous extract of the leaves of *Crotalaria retusa* L. was evaluated on *Fusarium* sp. This fungus was tested on PDA (Potato Dextrose Agar) medium amended with the plant extract at different concentrations. The mycelium reached the periphery of the Petri dish by day seven. The inhibition rates observed in the test media after seven days of incubation were $87.67 \pm 4.99\%$ for the 0.39 mg/ml concentration and $98.73 \pm 0.63\%$ for the 0.78 mg/ml concentration. These rates of mycelial growth inhibition increased with increasing extract concentration. For media with concentrations of 1.56 mg/ml, 3.12 mg/ml, 6.25 mg/ml, 12.50 mg/ml and 25 mg/ml, there was no mycelial growth. The inhibition was complete (100%). The minimum inhibitory concentration (MIC) of the plant extract on mycelial growth was 1.56 mg/ml. The minimum fungicidal concentration (MFC) of the plant extract was obtained at 12.50 mg/ml. The IC₅₀ and IC₉₀ were 0.21 mg/ml and 0.42 mg/ml respectively. This plant extract exhibited efficiency against *Fusarium* sp. and could therefore be used as a fungicide.

© 2022 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Antifungal activity, *Crotalaria retusa* L., plant pathogenic fungus.

INTRODUCTION

Dans le monde, notamment en Côte d'Ivoire, l'agriculture est soumise à de nombreuses contraintes dont la pression parasitaire. Beaucoup de cultures font l'objet d'attaque des champignons phytopathogènes. Parmi ces champignons, figurent les espèces du genre *Fusarium*. Ils s'attaquent aux cultures tels que le pois (Nargis et al., 2022), le gombo (Drame, 2004), le riz (Nikiema et al., 2020), le blé (Lauzon et al., 2007), le bananier (Soro et al., 2012), etc. Ces parasites constituent un problème majeur tant pour les agriculteurs que pour les perspectives d'une intensification de la production agricole. Ils peuvent rendre impropre à la consommation, une partie ou la totalité de la récolte. Ils peuvent empêcher également la culture d'une variété ou d'une espèce végétale dans une région donnée (Lassoudière, 2007). Comme moyen de lutte, l'on a recours aux produits chimiques de synthèse. Malheureusement, ces produits ont des effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement (Ntiendjui et al., 2009). De plus, leur utilisation répétée peut entraîner l'apparition de phénomènes de résistance chez les bioagresseurs (Brent et Hollomon, 2007). La stratégie adoptée est donc de développer des méthodes compatibles avec les préoccupations environnementales. La lutte basée sur l'utilisation des extraits végétaux pourrait constituer une réponse adéquate, économiquement et culturellement

viable pour les agriculteurs africains. Le but de ce travail est d'évaluer le pouvoir fongicide de l'extrait aqueux des feuilles de *Crotalaria retusa* L. sur *Fusarium* sp., un champignon phytopathogène.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Matériel biologique

Il était constitué de l'extrait aqueux des feuilles de *Crotalaria retusa* L. et d'une souche de *Fusarium* sp. isolée de la tige du cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.). *Crotalaria retusa* L. a été sélectionnée à l'issue d'une enquête ethnobotanique sur les légumineuses locales d'intérêt thérapeutique afin de les valoriser dans les biotechnologies agricoles. Selon cette étude, *Crotalaria retusa* L. est beaucoup utilisée pour le traitement des maladies microbiennes (Doga et al., 2017).

Matériel technique

Le matériel technique était composé d'un autoclave, du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et du fongicide Mancozan (Mancozèbe).

Méthodes

Evaluation de l'activité fongicide

Préparation des milieux de culture du germe fongique

Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) a été utilisé pour la culture de la souche

fongique. Les milieux de culture ont été préparés dans huit bouteilles SCHOOT et stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min sans l'extrait végétal. Les différentes quantités de l'extrait ont été ajoutées aux milieux de culture avant leur solidification (40 - 50°C) selon la méthode de la double dilution de liaison géométrique de raison ½ (Ahon et al., 2011).

Préparation de la gamme de concentration de l'extrait

Une gamme de sept concentrations correspondant aux différentes quantités de l'extrait a été définie. Il s'agit de : 25 mg/mL, 12.50 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.12 mg/mL, 1.56 mg/mL, 0.78 mg/mL et 0.39 mg/mL. Les témoins n'ont pas subi d'amendement de l'extrait végétal. Après homogénéisation, le mélange a été coulé à 40°C dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre sous une hotte, autour d'une flamme. L'essai a été répété trois fois. Les boîtes de Pétri ont été maintenues sous la hotte jusqu'à la solidification du milieu et à l'ensemencement du fragment mycélien. Pour le fongicide de synthèse, de faibles concentrations ont été déterminées à partir des doses applicables en champ (100 g/15 L, soit une solution de concentration 6.67 mg/mL). Les concentrations utilisées *in vitro* étaient : 3.33 mg/mL, 1.66 mg/mL, 0.83 mg/mL et 0.41 mg/mL. Elles ont été déterminées selon la méthode de la double dilution de liaison géométrique de raison ½ (Ahon et al., 2011). Le reste du protocole est identique à celui utilisé dans le cadre de l'extrait végétal.

Tests de sensibilité du germe aux extraits

Pour l'ensemencement de la souche fongique, un explant de 6 mm de diamètre du champignon âgé de sept jours, a été prélevé au niveau du front de croissance du champignon dans la boîte de culture. Ensuite, il a été placé au centre géométrique de la boîte de Pétri sur le milieu de culture solidifié. Les boîtes de Pétri ensemencées, ont été scellées avec du film adhésif et mises en incubation à l'étuve à 25 ± 2°C pendant sept jours. L'incubation a duré sept jours parce que dans le milieu

témoin, le mycélium a atteint la périphérie de la boîte de Pétri le septième jour.

Mesure du taux d'inhibition de la croissance mycélienne

La mesure de la croissance radiale moyenne du mycélium de la souche fongique a été effectuée quotidiennement. Elle a été réalisée en millimètre à partir de deux axes perpendiculaires tracés au revers de la boîte de Pétri. Les diamètres du mycélium ont été mesurés jusqu'à ce que les filaments mycéliens dans les lots témoins, atteignent la périphérie de la boîte de Pétri. C'est au septième jour que la prise de mesure a été arrêtée. Ces mesures ont permis de déterminer les concentrations inhibitrices de l'extrait végétal. Le taux d'inhibition de la croissance radiale mycélienne a été calculé selon la formule ci-dessus (Koné et al., 2009) :

$$T = ((D - d)/D) \times 100 ;$$

T : Taux d'inhibition, D : Croissance mycélienne dans les boîtes témoins, d : Croissance mycélienne dans les boîtes essais.

Détermination des valeurs de référence de l'activité antifongique

La concentration minimale fongicide (CMF) est la plus petite concentration de l'extrait qui donne 99.99% d'inhibition de la croissance du champignon comparativement au témoin de contrôle de croissance. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus petite concentration de l'extrait qui ne permet aucune croissance visible à l'œil nu. La CI₅₀ est la concentration qui donne 50% du taux d'inhibition de la croissance des germes fongiques et la CI₉₀ est la concentration qui donne 90% du taux d'inhibition de la croissance des germes fongiques. Les CI₅₀ et CI₉₀ ont été déterminées graphiquement (Ackah, 2004). Les boîtes dans lesquelles aucune croissance mycélienne n'a été visible à l'œil nu, ont été ouvertes. Les explants du champignon y ont été prélevés et ensemencés à nouveau dans de nouvelles boîtes de Pétri contenant le milieu PDA sans l'extrait végétal. Ces nouvelles cultures ont été mises en incubation pendant sept jours à la température ambiante (27°C). Au terme de l'incubation, si

une croissance mycélienne était observée, l'extrait était déclaré fongistatique. Dans le cas contraire, il était dit fongicide. Le calcul des taux d'inhibition de la croissance mycélienne a permis de tracer l'antifongigramme et déterminer les CI_{50} et CI_{90} de l'extrait végétal.

RESULTATS

Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Crotalaria retusa* L.

Comparativement au témoin, l'extrait aqueux des feuilles de *Crotalaria retusa* L. a entraîné une diminution de la croissance mycélienne de *Fusarium* sp. (Figure 1). Les taux d'inhibition observés dans les milieux essais après ces sept jours d'incubation, sont $87.67 \pm 4.99\%$ pour la concentration C1 (0.39 mg/mL) et $98.73 \pm 0.63\%$ pour la concentration C2 (0.78 mg/mL). Ces taux d'inhibition de la croissance mycélienne ont augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'extrait (Figure 2). Concernant les milieux de concentrations C3 (1.56 mg/mL), C4 (3.12 mg/mL), C5 (6.25 mg/mL), C6 (12.50 mg/mL) et C7 (25 mg/mL), il n'y a pas eu de croissance mycélienne. L'inhibition a été totale (100%)

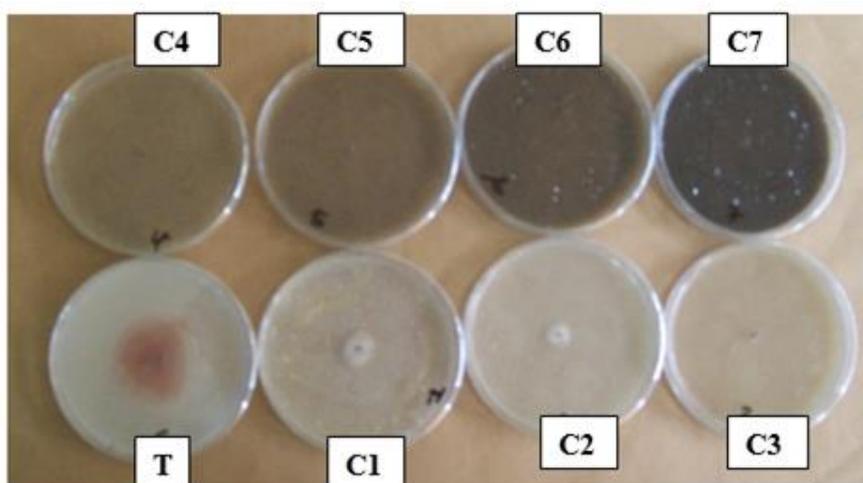
(Figures 1 et 2). La CMI correspond à 1.56 mg/mL et la CMF est de 12.50 mg/mL. Les CI_{50} et CI_{90} sont respectivement 0.21 mg/mL et 0.42 mg/mL (Figure 3).

Effet du fongicide de synthèse Mancozan

Le fongicide de synthèse Mancozan à faible dose, a exercé un pouvoir inhibiteur sur *Fusarium* sp. La plus forte inhibition (89.37%) a été obtenue à C4 (3.33 mg/mL) (Figure 4). La CI_{50} est 1.11 mg/mL et la CI_{90} est supérieure à 3.33 mg/mL (Figure 5). La CMI n'a pas été atteinte (Figures 4 et 5).

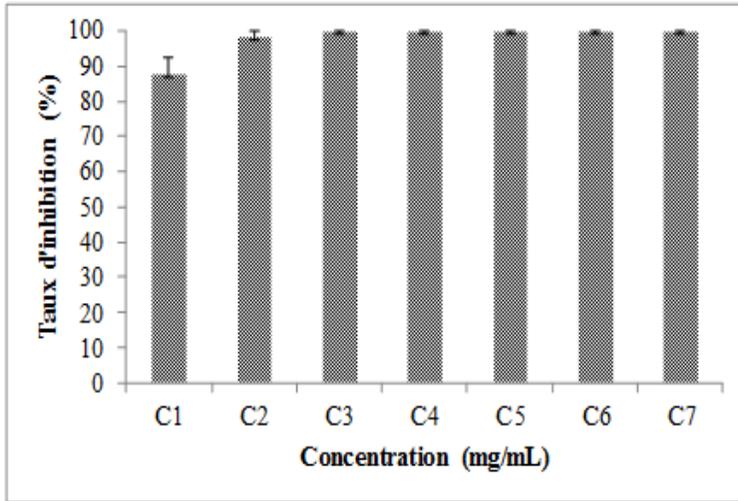
Comparaison des actions du fongicide Mancozan et de l'extrait végétal sur *Fusarium* sp.

L'antifongigramme obtenu avec l'extrait végétal a supplanté celui du fongicide de synthèse (Figure 6). Les CI_{50} (0.21 mg/mL) et CI_{90} (0.42 mg/mL) de l'extrait végétal sont respectivement inférieures à celles du fongicide de synthèse (1.11 mg/mL) et (> 3.33 mg/mL). L'extrait aqueux de *Crotalaria retusa* L. a donc exprimé un pouvoir inhibiteur plus important que celui du fongicide de synthèse.



T = 0 mg/mL, C1 = 0.39 mg/mL, C2 = 0.78 mg/mL, C3 = 1.56 mg/mL, C4 = 3.12 mg/mL, C5 = 6.25 mg/mL, C6 = 12.50 mg/mL, C7 = 25 mg/mL

Figure 1 : Croissance *in vitro* du mycélium de *Fusarium* sp. en présence de l'extrait aqueux de *Crotalaria retusa* L.



C1 = 0.39 mg/mL, C2 = 0.78 mg/mL, C3 = 1.56 mg/mL, C4 = 3.12 mg/mL, C5 = 6.25 mg/mL, C6 = 12.50 mg/mL, C7 = 25 mg/mL

Figure 2 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium* sp. en fonction de la concentration de l'extrait aqueux de *Crotalaria retusa* L. après sept jours d'incubation.

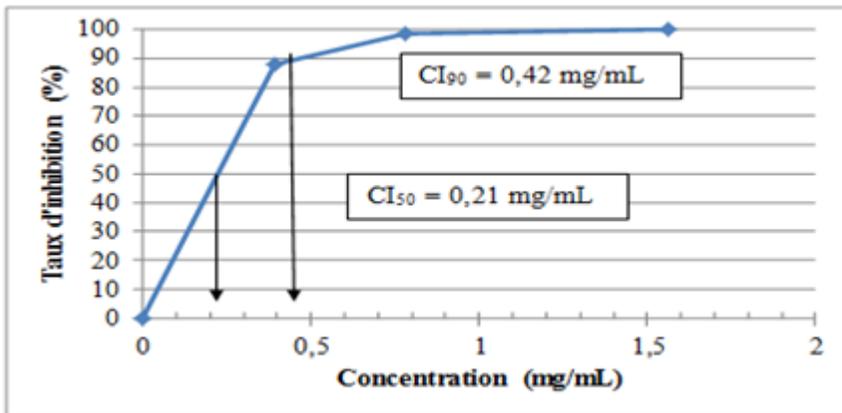
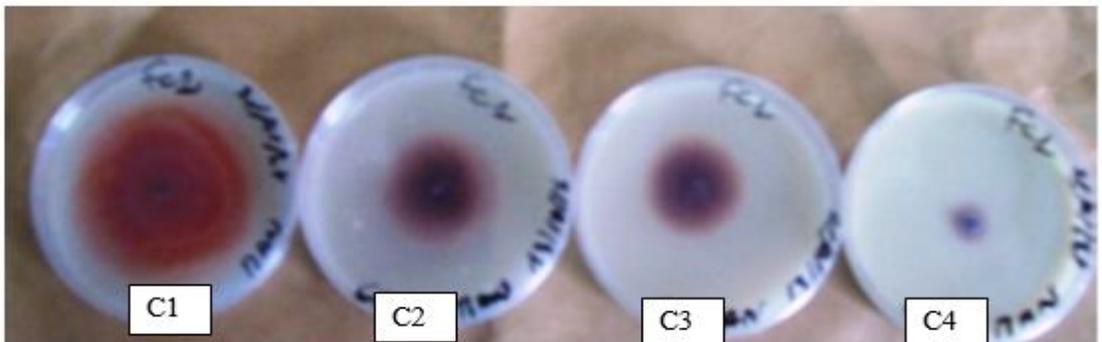


Figure 3 : Antifongigramme de *Fusarium* sp. à l'extrait aqueux de *Crotalaria retusa* L.



C1 = 0.41 mg/mL, C2 = 0.83 mg/mL, C3 = 1.66 mg/mL, C4 = 3.33 mg/mL

Figure 4 : Croissance *in vitro* du mycélium de *Fusarium* sp. en présence du fongicide de synthèse Mancozan.

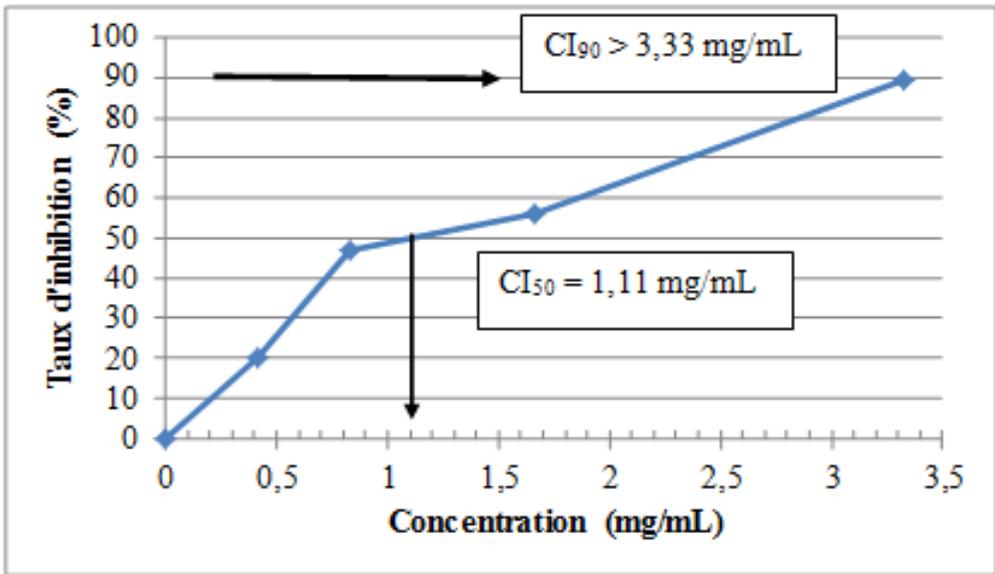


Figure 5 : Antifongogramme de *Fusarium* sp. au fongicide de synthèse Mancozan.

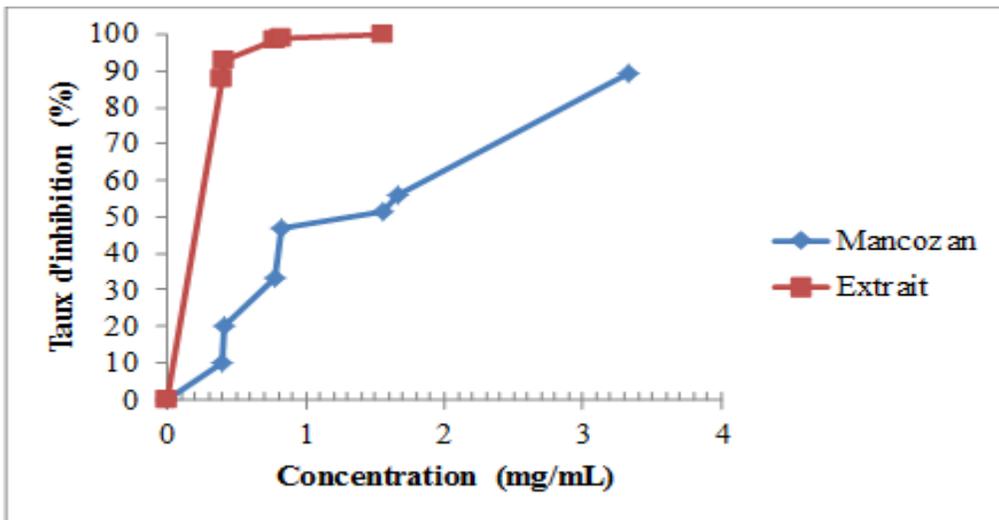


Figure 6 : Antifongogrammes comparatifs de *Fusarium* sp. vis-à-vis du fongicide de synthèse Mancozan et de l'extrait aqueux de *Crotalaria retusa* L.

DISCUSSION

Le test *in vitro* a révélé l'activité antifongique de l'extrait aqueux de *Crotalaria retusa* L. sur *Fusarium* sp. L'intensité de cette activité antifongique a varié selon les concentrations de l'extrait végétal. Le pouvoir fongicide de cet extrait végétal pourrait être attribué à l'ensemble des métabolites

secondaires tels que les saponosides, les flavonoïdes, les tanins, les quinones, les alcaloïdes et les polyterpènes contenus dans cette plante (Doga et al., 2017). Ces groupes chimiques renferment plusieurs propriétés pharmacologiques parmi lesquelles les activités antimicrobiennes et en particulier antifongiques (N'Guessan et al., 2009 ;

Mezouar et al., 2014). Ce résultat est en accord avec celui d'Okigbo et Ajalie (2005) qui a montré que les extraits des feuilles de *Chromolaena odorata* et *Citrus aurantifolia* ont eu un effet antimicrobien sur quatre pathogènes (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhi*). Agban et al. (2013) a également confirmé l'activité antifongique des extraits des végétaux tels que *Cassia alata* L. et de *Piliostigma thonningii* (Schumach.) Milne Redh. (Fabaceae) sur *Candida albicans*. Selon la classification de Kra (2016), la CMF de cet extrait végétal appartient à la classe [6.25 mg/mL ; 50 mg/mL]. Il s'agit donc d'une activité moyenne.

Conclusion

Les travaux menés ont permis de confirmer l'activité antifongique de l'extrait aqueux des feuilles de *Crotalaria retusa* L. sur la croissance *in vitro* de *Fusarium* sp. L'étude ethnobotanique a révélé que cette plante est une légumineuse locale d'intérêt thérapeutique couramment utilisée contre les maladies microbiennes, notamment celles d'origine fongique. Son pouvoir fongicide s'est manifesté à 12.50 mg/mL et sa CMI est de 1.56 mg/mL. Au vu de ces résultats, cette plante pourrait être conseillée dans le soulagement des pathologies liées aux champignons. Elle pourrait être également exploitée pour la mise au point d'un biopesticide.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs de ce manuscrit déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêts relatif à la publication de cet article.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

DD est l'auteur principal de ce travail. Il a participé à toutes les étapes de sa réalisation. KEO a participé à la structuration et à la rédaction de l'article. BAMBO a contribué à la mise en place de la méthodologie de ce travail. Elle a également contribué à l'analyse critique de ce manuscrit. GNZ et AZ sont les superviseurs de ce travail. Ils ont orienté la réalisation de ce travail.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à l'endroit de Dr VOKO Bi Rosin Don-Rodrigue, Enseignant chercheur à l'Université Lorougnon GUEDE de Daloa pour sa contribution à l'achat du matériel de séchage de l'extrait végétal.

REFERENCES

- Ackah JA. 2004. Spectre anti-infectieux de MISCA-F3 sur la croissance *in vitro* de *C. albicans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* et *A. flavus*. Mémoire de DEA de Biotechnologie, Option Pharmacologie, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire, 34 p.
- Agban A, Gbogbo KA, Hoekou YP, Atchou K, Tchacondo T, batawila K, Souza CD, Gbeassor M. 2013. Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *Cassia alata* L. et de *Piliostigma thonningii* (Schumach.) Milne Redh. (Fabaceae) sur *Candida albicans*. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **7** (3): 1041-1047. DOI: 10.4314/ijbcs.v7i3.12
- Ahon MG, Akapo-Akue JM, Kra MA, Ackab JB, Zirihi NG, Djaman JA. 2011. Antifungal activity of the aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Terminalia superba* Engl. on the *in vitro* growth of clinical isolates of pathogenic fungi. *Agric. Biol. J. N. Am.*, **2**(2): 250-257. DOI:10.5251/abjna.2011.2.2.250.257
- Brent KJ, Hollomon DW. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). Monograph No1, *CropLife International*, 60 p.
- Doga D, Zirihi GN, Zézé A. 2017. Propriétés antifongiques des légumineuses médicinales de Côte d'Ivoire : cas de *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae) sur la croissance *in vitro* de *Phytophthora* sp. et *Fusarium solani*, deux champignons phytopathogènes. *European Scientific Journal*, **13**(3): 1857-7881. DOI: 10.19044/esj.2017.v13n3p371
- Drame A. 2004. Pathogénie comparée de quelques souches de *Fusarium*

- oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.), agent de la fusariose du gombo (*Abelmoschus esculentus* L.) au Sénégal. *Agron. Afr.*, **16**(2): 33-38. DOI: 10.4314/aga.v16i2.1645
- Koné D, Badou OJ, Bomisso EL, Camara B, Aké S. 2009. Activités *in vitro* de différents fongicides sur la croissance chez *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* Stover et Dickson, *Cladosporium musae* Morelet et *Deightonella torulosa* (Syd.) Ellis, parasites isolés de la phyllosphère des bananiers en Côte-d'Ivoire. *Elsevier*, **332**(5): 448-455. DOI: 10.1016/j.crv.2008.03.013
- Kra AKM. 2016. Recherche bio guidée de composés antifongiques à partir des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat, Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, p 242.
- Lassoudière A. 2007. *Le Bananier et sa Culture*. (ed) Quae : Versailles, France ; p 384.
- Lauzon M, Dion Y, Rioux S. 2007. Fusariose de l'épi chez le blé et l'orge. CEROM, Bulletin Technique, Phytopathologie, No 2. 01, Québec (Canada).
- Mezouar D, Lahfa FB, Abdelouahid DE, Adida H, Rahmoun NM, Boucherit Z, Otmani. 2014. Activité antimicrobienne d'extraits d'écorce de racine de *Berberis vulgaris*. *Springer*, **12**(6): p 380. DOI : <https://doi.org/10.1007/s10298-014-0863-5>
- Nargis N, Zaffar AB, Nazir AB, Farooq AB, Phalirsteen S, Tashooq AB, Mohd A, Aafreen S. 2022. Effect of the combination of biological, chemical control and agronomic technique in integrated management pea root rot and its productivity. *Sci. Rep.*, **12**: 11348. DOI : 10.1038/s41598-022-15580-1
- N'Guessan K, Kadja B, Zirihi GN, Traoré D, Aké-Assi L. 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes. *Sci. Nat.*, **6**: 1-15. DOI : 10.4314/scinat.v6i1.48575
- Nikiema FW, Zida EP, Thio GI, Nitiéma LW, Koita K, Sawadogo M. 2020. Incidence de *Fusarium* spp. associé aux semences de riz (*Oryza sativa* L.) au Burkina Faso. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **14**(6): 2160-2171. DOI : 10.4314/ijbcs.v14i6.18
- Ntiendjui LG, Tamungang SA, Ngoula F, Ateufack G, Tchoumboue J. 2009. Effets de la toxicité des pesticides Maneb et Chlorpyrifos-Ethyl sur un poisson d'eau douce, *Oreochromis niloticus*. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **3**(1): 48-53. DOI: 10.4314/ijbcs.v3i1.42734
- Okigbo R, Ajalie A. 2005. Inhibition of some human pathogens with tropical plants extracts *Chromolaena odorata* and *citrus aurantifolia* and some antibiotics. *Inter. J. Mol. Med. Adv. Sci.*, **1**(1): 34-40. DOI: <https://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=ijmmas.2005.34.40>
- Soro D, Koné MW, Koné D, Kamanzi. K. 2012. Evaluation de l'activité antifongique par bioautographie de quelques plantes médicinales de Côte d'Ivoire contre deux formes spéciales de *Fusarium oxysporum*. *Agron. Afr.*, **24**(1): 19-28. DOI: 10.4314/AGA.