

## ÉVALUATION IN VITRO DU POTENTIEL ANTIFONGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE ET DES EXTRAITS MÉTHANOLIQUES D'UNE ASTERACEAE *ARTEMISIA ABSINTHIUM* L.

BOUCHENAK Fatima<sup>1\*</sup>, DEGAICHIA Hocème<sup>1</sup>, LAMGHARBI Abdelbaki<sup>1</sup> et BENREBIHA Fatima<sup>1</sup>

I. Université Blida 1- Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Laboratoire de Biotechnologie des Produits Végétales, B.P. 270, route de Soumaa Blida, Algérie.

Reçu le 29/03/2018, Révisé le 05/06/2018, Accepté le 07/06/2018

### Résumé

**Description du sujet.** Dans le but de rechercher une alternative aux pesticides à cause de leur toxicité et de leur pollution. Le recours aux plantes médicinales, en occurrence l'espèce *Artemisia absinthium* L. comme source principale de nouvelles molécules bioactives naturelles est devenue indispensable.

**Objectifs.** Dans le cadre de la recherche de substances naturelles antifongiques, nous avons testé l'activité fongitoxique *in vitro* des huiles essentielles et des extraits méthanoliques provenant d'une plante médicinale Algérienne.

**Méthodes.** Les parties aériennes d'*Artemisia absinthium* L. ont été récoltées en Mars 2012 à Cherchell. Elles ont été soumises à l'hydrodistillation, en utilisant un appareil de type Clevenger. Les extraits méthanoliques ont été obtenus par macération par la méthode Soxhlet. La composition de l'huile essentielle a été analysée par CG-MS. L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de diffusion dans l'agar contre quatre espèces fongiques. La concentration minimale inhibitrice (MIC) a été déterminée en utilisant la méthode de dilution

**Résultats :** L'huile essentielle a été caractérisée par un constituant principal le  $\beta$ -thujone (60,82%) suivi du chamazulene (16,65%). Cette dernière a montré une bonne activité contre tous les champignons testés. Les tests phytochimiques montrent que les extraits méthanoliques sont riches en flavonoïdes, phénols. Ils ont un potentiel fongitoxique identique aux huiles essentielles

**Conclusion :** L'huile essentielle d'*Artemisia absinthium* L. et les extraits pourront être une source potentielle d'agents antimicrobiens naturels dans l'industrie de fabrication de produits chimiques comme une alternative aux pesticides.

**Mots clés :** *Artemisia absinthium* L.; Huile essentielle; extraits méthanoliques;  $\beta$ -thujone; Potentiel antifongique; Concentration minimal inhibitrice.

## IN VITRO EVALUATION OF ANTIFUNGAL POTENTIAL OF ESSENTIAL OIL AND METHANOLIC EXTRACTS OF ASTERACEAE *ARTEMISIA ABSINTHIUM* L.

### Abstract

**Description of the subject.** In order to search for an alternative to pesticides because of their toxicity and their pollution, the use of medicinal plants, in the case the species *Artemisia absinthium* L. as the main source of new natural bioactive molecules has become indispensable.

**Objective.** As part of the search for natural antifungal substances, we have tested the fungitoxic effect *in vitro* of essential oils and extracts methanolic from Algerian medicinal plants.

**Methods.** The aerial parts of *Artemisia absinthium* L. were collected on march 2012 from Cherchell. This aerial part were subjected to the hydrodistillation using a Clevenger apparatus. The methanolic extracts were obtained by maceration by the Soxhlet method. The composition of the essential oil was studied by GC-MS. The antifungal activity was evaluated using the agar diffusion method against four species fungi. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the agar dilution method.

**Results.** The essential oil was characterized as having a high content of  $\beta$ -thujone (60.82%) followed by chamazulene (16.65%). The latter showed good activity against all tested fungi. Phytochemical tests show that methanolic extracts are rich in flavonoids, phenols. They have a fungicidal potential identical to essential oils

**Conclusion.** The essential oil and extracts methanolic of *Artemisia absinthium* L. growing in Algeria may be a potential source of natural antifungal agents in the chemical manufacturing industry in order to find possible an alternative to pesticides.

**Keywords:** *Artemisia absinthium* L.; essential oil;  $\beta$  thujone; Methanolic extract; antifungal activity; minimum inhibitory concentration.

\* Auteur correspondant : BOUCHENAK Fatima, E-mail : bouchenakfatima@yahoo.fr

## INTRODUCTION

Les maladies des plantes sont principalement contrôlées par des pesticides chimiques et dans certains cas par des pratiques culturales. Cependant, l'utilisation massive de produits chimiques dans l'agriculture a été un sujet de préoccupation public en raison des effets indésirables de certains produits chimiques sur les organismes non cibles et leurs effets cancérogènes et nocifs sur l'environnement [1].

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine, en industrie alimentaire et en agriculture. En effet, l'usage abusif et inapproprié des agents antimicrobiens chimiques dans l'agriculture a entraîné l'émergence de microorganismes phytopathogènes multirésistants, engendrant un problème épineux pour la production végétale et pour l'environnement [2].

Pour faire face à ce problème de maladies fongiques, la lutte chimique est souvent la méthode la plus utilisée. Malheureusement, celle-ci, semble néfaste pour l'homme et pour son environnement [3]. En outre, elle présente des effets négatifs sur d'autres microorganismes représentant une source de fertilisation des sols et d'une importance dans les réseaux trophiques [4]. De multiples alternatives ont été proposées ces dernières décennies pour remplacer ces pesticides chimiques, notamment la lutte biologique utilisant des biopesticides. Cependant, celles-ci restent d'une utilisation très limitée, et sont encore dans leur phase préliminaire ou en expérimentation.

Actuellement, beaucoup d'espèces végétales ont fait l'objet de nombreuses recherches. Leurs métabolites secondaires ont été formulés en tant que pesticides botaniques pour la protection des végétaux, car ils ne laissent pas de résidus toxiques pour l'homme et son environnement [5]. Pour remédier à cette situation, les travaux scientifiques se sont de nouveaux orientés vers le patrimoine naturel et traditionnel, en particulier les plantes médicinales, ces dernières possèdent des propriétés biologiques avérées très intéressantes, qui trouvent leurs applications dans divers domaines, à savoir en industrie pharmaceutique, en cosmétologie et en l'agriculture.

Les métabolites secondaires des plantes sont réputés depuis fort long temps pour leurs propriétés phytothérapeutiques et depuis quelques années l'homme s'intéresse également à leurs activités biologiques et antioxydantes.

Ces métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro* notamment la vulgarisation de nouveaux constituants naturels. [6].

Le genre *Artemisia* est parmi les genres les plus importants de la famille des composées (Astéracées). Il a été enregistré onze espèces d'*Artemisia* en Algérie [6]. *Artemisia absinthium* L communément appelé « Chedjret Meriem ». Cette espèce a été utilisée depuis l'antiquité dans la médecine populaire [7]. De nombreuses études sur la caractérisation chimique et les activités biologiques ont été menées sur cette espèce. L'huile essentielle a été largement utilisée principalement pour ses propriétés antifongiques, antioxydantes [8], et insecticides [9].

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'espèce *Artemisia absinthium* L. collectée dans la région de Cherchell (située à l'ouest de l'Algérie). Nous avons recherché à mettre l'accent sur les potentialités de cette plante en tant que biopesticide pour lutter contre les champignons phytopathogènes. Ainsi, nous avons extrait les huiles essentielles, ainsi que les extraits méthanoliques des parties aériennes et nous avons déterminé leur rendement, la composition chimique ainsi que leur activité antifongique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

La plante (*Artemisia absinthium* L) a été récoltée durant la période de mars 2012 en période végétative. Le lieu de la collecte est situé à environ 90km à l'ouest d'Alger (Cherchell, wilaya de Tipaza). Les échantillons ont été identifiés par référence au spécimen disponible dans l'herbier du Département de Botanique, de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (E.N.S.A.) El Harrach, Alger. par le biais de la flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales [10]. Les plantes, fraîchement récoltées, ont été séchées pendant deux mois à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Le matériel végétal utilisé est composé de feuilles sèches et tiges. Celles-ci ont été ensuite pesées, broyées grossièrement et récupérées dans des sacs en papier

### 2. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

Les huiles essentielles des feuilles d'*Artemisia absinthium* L. (100g) ont été obtenues par hydrodistillation pendant 3 heures d'extraction dans un appareil de type cleverger [11].

Elle consiste à immerger directement la matière végétale (200 g) à traiter (coupé) dans un ballon rempli d'eau distillée (3.5 L) surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. Le tout est ensuite portée à ébullition pour 3 h. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide. Les vapeurs ascendantes provenant de l'alambic ou du réacteur progressent, puis se condensent par refroidissement. Le condensat est récupéré, puis l'huile est séparée de la phase aqueuse. L'huile essentielle est conservée à 4°C dans un flacon ombré hermétiquement fermé.

### 3. Détermination du rendement

Le rendement d'extraction (%) est calculé par la formule ci-dessous :  $R (\%) = (\text{Masse de l'extrait sec} / \text{Masse du matériel végétal utilisé}) \times 100$  [12].

### 4. Détermination de la composition chimique d'huile essentielle par CPG couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse chromatographique a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type HP série Agilent 6890 N piloté par ChemStation «NIST98» et couplée avec un spectromètre de masse de type HP série Agilent 5973.

La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La colonne utilisée est capillaire HP-5MS (30m x 0.25 mm) avec une épaisseur du film de la phase 0.25 µm.

Le mode d'injection utilisé est le Splitless avec un débit de 0.2 µl par 30 secondes et une température de 250°C. La température de la colonne est programmée de 60 à 250°C à raison de 3°C /min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est de 1ml/min, d'un détecteur FID réglé à 250 °C et alimenté par un mélange de gaz H2/Air et un injecteur split-splitless réglé à 250 °C. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/50, débit : 66 ml.min<sup>-1</sup>). Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 ml.min<sup>-1</sup>. La température de la colonne est programmée de 50 à 200 °C pendant 5 min à raison d'une montée de 4 °C.min<sup>-1</sup>. L'appareil est piloté par un système informatique de type « HP ChemStation », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. Le volume injecté est 1 µl.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs indices de Kováts (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La température de la colonne est programmée de 50 à 200 °C pendant 10 min à raison d'une montée de 4 °C.min<sup>-1</sup>. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. Les huiles essentielles ont été diluées (1:100) dans du n-hexane; puis 2 µL ont été injectés dans le système GC-MS. L'identification des constituants a été par une co-injection avec des standards commerciales, qui ont utilisés chaque fois que possible, en même temps a été réalisée par comparaison de : leurs spectres de masse (MS), l'indices de rétention (RI), et de leurs indices de Kováts (IK) avec ceux des bases de données [13].

### 5. Etude phytochimique des extraits méthanoliques

#### 5.1. Préparation des extraits méthanoliques

L'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia absinthium* L. a été préparé à l'aide d'un Soxhelt selon la méthode décrite par Sokmen et al. [14]. Le matériel végétal broyé (10 g) est placé dans une cartouche qui sera mise en contact avec le solvant d'extraction qui est le méthanol absolu (100 ml) à 60°C pendant 6h. La cartouche est ensuite retirée et le solvant est filtré sur papier Whatman (n°3), puis concentré grâce à un évaporateur rotatif (BÜCHI) à une température de 45°C. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation.

#### 5.2. Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait méthanolique de la plante est calculé par la formule suivante :  $\text{Rendement} (\%) = (\text{Poids de l'extrait sec} / \text{Poids du matériel végétal à traiter}) \times 100$ .

#### 5.3. Dosage des phénols

L'étude quantitative de l'extrait méthanolique préparé à partir des feuilles+tiges de l'*Artemisia absinthium* L a été effectuée par spectrophotométrie selon la méthode au réactif de Folin- Ciocalteu [15]. L'utilisation de cette méthode est largement répandue afin de caractériser la diversité des extraits végétaux.

En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les composés polyphénoliques présents dans l'échantillon en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides,

d'où la formation d'un complexe bleu de tungstène (W8O23) et de molybdène (Mo8O23) [16]. L'intensité d'absorption est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans l'échantillon. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de l'ordre 760nm. 0.5 ml de l'échantillon (l'extrait végétal) a été introduit à l'aide d'une pipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 7ml de l'eau distillée et de 0.5ml du réactif Folin- Ciocalteu. Après agitation pendant 3 minutes, 2ml de carbonates de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 20% ont été ajoutés à l'ensemble, puis incubés à 100°C dans un bain marie pendant une minute et sont maintenus à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été déterminée à 760nm contre un blanc (même solution précédente à l'exception de l'extrait phénolique) sur un spectrophotomètre. La quantification des phénols totaux de notre extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = a x + b$ ), établie avec le standard étalon d'acide gallique à dix concentrations d'un intervalle allant de 0.5 à 5mg/ml et dans les mêmes conditions que l'échantillon. La teneur des polyphénols totaux a été exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait des feuilles en poudre (mg EAG/g).

#### 5.4. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub> légèrement modifiée a été adoptée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits d'*Artemisia absinthium* L. 1 ml de la solution d'extraits (préparés dans l'éthanol) est ajouté à 1 ml d'AlCl<sub>3</sub> à 2% dans le méthanol, le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance est lue à 430 nm. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EQ/g Ps). [17]

#### 5.5. Dosage des tanins

Le principe et la procédure d'expérimentation du dosage des tanins est la même que celle suivie dans le dosage des phénols totaux. Pour cela, on utilise une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique dans la quantification des tanins et on mesure les différentes absorbances à une longueur d'onde de 685 nm.

La teneur en tanins totaux a été exprimée en milligrammes d'équivalents de catéchine par gramme d'extrait des feuilles en poudre (mg CE /g de PS). [18]

### 6. Etude d'activité antifongique d'huile essentielle et des extraits méthanoliques

#### 6.1. Espèces fongiques étudiées

Pour la détermination de l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*Artemisia absinthium* L. quatre espèces phytopathogènes (*Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Helminthosporium sp*, *Alternaria sp*) ont été choisies. Les champignons choisis sont des agents de pourriture fréquente des denrées alimentaires et des fruits et peuvent être toxiques pour l'Homme et les animaux. Les quatre espèces pures et identifiées appartiennent à la collection de la mycothèque du Laboratoire de mycologie. Elles sont cultivées par repiquage sur le milieu nutritif PDA (Potato Dextrose Agar) pendant 7j à l'obscurité à 25°C. Les micromycètes ont été maintenus sur de la gélose au malt et les cultures ont été conservées à 4°C et repiquées une fois par mois [19].

#### 6.2. Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium* L. et des extraits méthanoliques

Elle a été évaluée sur quatre espèces fongiques. Le milieu de culture utilisé est Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Cette activité est répétée trois fois. Cette activité a été déterminée par la méthode de diffusion de disque [20]. 10<sup>6</sup> CFU/ml de cellule fongique, ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Sabourou Dextros Agar (SDA). Les disques (6 mm de diamètre) ont été séparément imprégnés avec 15 µl de l'huile essentielle ou des extraits et placés sur la gélose qui a déjà été inoculée avec le microorganisme sélectionné. Un disque d'antibiotique (Fluconazole) de référence approprié a été appliqué sur chaque boîte de Pétri 20 µg/disque. Ces disques ont servi comme contrôle positif efficace contre les quatre espèces microbiennes. Des disques vierges ont été utilisés comme contrôle négatif. Les boîtes ont été incubées pendant 7J à 27°C. L'activité antifongique a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance en millimètres (y compris le diamètre du disque de 6 mm).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle des parties aériennes d'*Artemisia absinthium* L. et de leurs extraits ont été déterminées selon la méthode de dilution en gélose [21]. En bref, des boîtes de Pétri contenant SDA à différentes concentrations d'huile essentielle ou d'extrait allant de 0,01 % jusqu'à 1,0% (v/v) ont été inoculées avec les souches testées. La culture microbienne utilisée ( $2 \times 10^7$  UFC/ml) a été diluée dans l'eau peptonée (0,1% p/v) jusqu'à  $10^4$  et  $10^5$  UFC/ml [21]. 50  $\mu$ l de chaque culture diluée ont été répandus sur la surface de la gélose solidifiée. Le contrôle positif se composait de SDA inoculé seulement avec la suspension microbienne. Les boîtes non inoculées contenant de l'huile essentielle ou l'extrait ont servi comme témoin négatif. Les boîtes d'essai et de contrôle ont ensuite été incubées pendant 7j à 27°C. Pour chaque traitement, l'absence de colonies sur toutes les plaques testées a été considérée comme un effet inhibiteur. La plus faible concentration d'huile essentielle nécessaire pour inhiber totalement la croissance des microorganismes testés a été désignée comme la MIC.

### 7. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été répétées trois fois, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type pour chaque cas. Les analyses statistiques des résultats sont traitées par le logiciel STAT-ITCF 1987-1988 vers.4 par une analyse de variance au seuil de 5%. Le test de Newman et Keuls est utilisé pour la comparaison des moyennes.

## RÉSULTATS

### 1. Rendement et composition chimique

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Le rendement en huile essentielle d'*Artemisia absinthium* L. a fourni un taux de 0,5 %. Ce rendement peut être considéré comme moyen par rapport à certaines plantes qui sont exploitées. La composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de l'armoise obtenue par hydrodistillation a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les pourcentages et temps de rétention des composants identifiés sont répertoriés dans le tableau 1 dans l'ordre de leur élution.

La classification des composants identifiés basée sur les groupements fonctionnels montre la

dominance des monoterpènes oxygénés chez l'*A. absinthium*. Sa distribution est relativement élevée (71,61%). La  $\beta$ -thujone est le constituant principal (60,82%) suivi du chamazulène (16,65%),  $\gamma$  terpinène (3,71%),  $\beta$ cymène (4,21 %) 4+Carène (4,29%), 4 Terpinéol (2,89 %). Ils sont accompagnés d'autres constituants minoritaires qui ne sont pas dénués d'importance: 1,8-cinéole (1,28%),  $\beta$  Eusmidol (1,15 %) et Caryophyllène (1,15%).

Tableau 1: Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de l'*Artemisia absinthium* récoltées dans la région de Chershell en Mars 2012

Numéro	IR(min)	IK	Constituants	Aire (%)
1	5,92	938	$\alpha$ -Pinène	0,2
2	6,01	950	camphène	0,05
3	6,24	965	Sabinène	0,18
4	6,53	980	$\beta$ -Thujène	0,14
5	6,78	902	$\beta$ Pinène	0,1
6	7,65	915	$\beta$ -Mycrène	0,93
7	8,12	924	Phellandène	0,71
8	8,64	985	4+-Carène	4,25
9	9,12	1030	1,8 Cineole	1,28
10	9,73	1045	3-Carène	0,34
11	10,23	1058	$\gamma$ -Terpinène	3,71
12	13,66	1112	$\beta$ Thujone	60,82
13	15,96	1177	4-Terpinéol	2,89
14	16,55	1189	$\alpha$ -Terpinéol	0,58
15	19,3	1209	Camphor	0,09
16	21,2	1246	Borneol	0,24
17	23,93	1279	$\beta$ - Bourbonène	0,09
18	26,0	1480	Germacrène	0,36
19	35,32	1537	$\beta$ - Eudesmol	1,13
20	36,12	1638	Caryophyllène	1,15
21	38,82	1716	Chamazulène	16,65
22	47,34	1829	$\rho$ -Cymène	4,29
<b>Classes biochimiques des composés identifiés dans l'huile essentielle</b>				
<b>Monoterpènes oxygénés</b>			<b>60,82</b>	
<b>Hydrocarbures monoterpéniques</b>			<b>14,48</b>	
<b>Hydrocarbures sesquiterpéniques</b>			<b>18,25</b>	
<b>Alcools sesquiterpéniques</b>			<b>1,13</b>	
<b>Total</b>			<b>98,15</b>	

IR=indice de rétention (RI), indice de Kováts =(IK)

## 2. Étude phytochimique et rendement des extraits méthanoliques

### 2.1. Teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes

Sur la base des valeurs d'absorbance des solutions des extraits méthanoliques, qui réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu et par rapport aux solutions standards d'équivalents de l'acide gallique,

les résultats de l'analyse colorimétrique de composés phénoliques totaux montrent que la plante est riche en polyphénols.

Le tableau 2 résume les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux, Tanins et flavonoïdes des extraits de plante d'*Artemisia absinthium* L. Les quantités en phénols totaux des extraits de la partie aérienne est de (24,8±0,38) mg EAG/g MS. Par contre les flavonoïdes leur quantité est de (12,68±0,45) mg EC/g MS. Les tanins affichent une faible teneur.

Tableau 2 : Teneurs en polyphénols, tannins et flavonoïdes (n=5, Moy.±SE)

Espèce	Teneur en phénols totaux ( mg EAG/g d'extrait	Teneur en tanins (mg EAT/g d'extrait)	Teneurs en Flavonoides
<i>Artemisia absinthium</i> L.	24,8±0,37	2,9±0,8	12,68±0,45
Rendement de l'extrait méthanolique =0,43			

### 2. Activité antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*Artemisia absinthium* L.

Le pouvoir antifongique d'huile essentielle des parties aériennes d'*Artemisia absinthium* L. et de leurs extraits, a été étudié vis-à-vis quatre

espèces pathogènes causant des dégâts importants sur plantes cultivées. Ce pouvoir est évalué par la détermination de zone d'inhibition et de la CMI (Tableau 3). Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle des feuilles d'*Artemisia absinthium* L. et des extraits méthanoliques ont une activité antifongique importante.

Tableau 3 Activité antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*Artemisia*

Espèces fongiques	huiles essentielle	Extraits	Fluconazole	Huile essentielle	Extraits	Fluconazole
	DZI (mm)	DZI(mm)	DZI(mm)	CMI(mg/ml)	CMI(mg/ml)	CMI (mg/ml)
<i>Botrytis cinerea</i>	25,67±0,68 <sup>a</sup>	21,4±0,6 <sup>a</sup>	20±0,2 <sup>b</sup>	0,125	0,12	0,1
<i>Fusarium culmorum</i>	24,0±0,58 <sup>a</sup>	23,8±0,5 <sup>a</sup>	21±0,5 <sup>a</sup>	0,125	0,12	0,12
<i>Helminthosporium sp</i>	17,2±1,04 <sup>b</sup>	17,6±0,8 <sup>b</sup>	22±0,3 <sup>a</sup>	0,5	0,34	0,2
<i>Alternaria sp</i>	12,33±0,58 <sup>c</sup>	14,1±0,7 <sup>c</sup>	19±0,5 <sup>b</sup>	0,25	0,2	0,2

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type de trois déterminations a,b,c, à  $p < 0,05$ .

Diamètre de la zone d'inhibition (DZI=mm+ ET), concentration minimale inhibitrice (CMI=mg/ml).

Dans cette étude, nous avons examiné l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits d'*A. absinthium* L. sur quatre espèces fongiques différentes. Le tableau 3 résume les résultats. A titre de comparaison, on a utilisé des disques d'antibiotiques comme standards contenant de la Fluconazole. Dans l'ensemble, les résultats indiquent que 10 µL d'extraits à 10 mg / ml et 10 µL d'huile pure ont une activité antifongique considérable. Les huiles essentielles et les extraits méthanoliques des feuilles et des tiges ont présenté une très bonne activité contre les *Botrytis cinerea* et *Fusarium culmorum* par rapport aux deux autres espèces ( $p \leq 0,05$ ). Dans l'ensemble,

les huiles essentielles ont montré une bonne activité antifongique (DZI : 17-25 mm) et une CMI (0,125-0,5mg/ml), Ainsi que celle des extraits méthanoliques (DZI=14-21 mm) et une CMI comprise entre (0,2-0,500mg/ml). Globalement, les zones d'inhibition et les CMI sont relativement équivalentes que celles obtenues par l'antibiotique de référence qui a un effet fongistatique DZI=(22-25mm) et une CMI comprise entre (0,2-0,500mg/ml). L'effets fongistatiques des HE d'*Artemisia absinthium* L. et des extraits sur *Fusarium culmorum* et *Botrytis cinerea* DZI=(25-24mm)est très important par rapport à celui du fluconazole ( $p \leq 0,05$ ) (tableau3).

L'analyse comparative de l'effet des extraits méthanoliques et des huiles essentielles sur ces espèces phytopathogènes n'a pas donné de différence significative ( $p \geq 0,05$ ) (Tableau 3)

## DISCUSSION

Le rendement en HE de notre échantillon est similaire à celui estimé par Schulz *et al.* [22], il a été remarqué que les rendements varient respectivement de 0.3% à 0.5% en HE. La teneur en HE est très proche de celle obtenue par Lopes *et al.* [23] au Canada et par DERWICH *et al.* [24] au Maroc, elle a été évaluée respectivement à 0.5% et à 0.57%.

La composition chimique des huiles essentielles d'*Artemisia absinthium* L. a été rapportée par quelques auteurs et le chémotype a été différent d'une région à une autre. Nous avons remarqué que la teneur du composé majoritaire « thuyone » de l'HE de l'absinthe obtenue en Algérie (2010, 2011), au Maroc [24], en Tunisie [25] présente des quantités respectivement de 90,12%; 60,82/54,07% et 46,94% en thuyone. L'absinthe récoltée en Algérie en Tunisie et au Maroc est chimiotaxonomique de type thuyone. Ce dernier est présent dans l'huile à des pourcentages qui varient entre 40-70% et selon l'origine de plante [25]. Par exemple, en Iran [26], l'analyse de l'HE de l'absinthe récoltée dans le Nord-Ouest du pays, présente le chimiotype suivant par ordre majoritaire décroissant:  $\beta$ -pinène, thuyone et le sabinène, alors que celle récoltée dans le Nord-Est du pays [27] donne le chimiotype composé de : camphor,  $\rho$ -cymène et isodène. Par ailleurs, l'analyse de l'HE de la même plante, récoltée au Canada, Grèce, Espagne, France, Italie [28], présente le chimiotype suivant : sabinyl acétate, myrcène et thuyone. Tandis que, en Turquie [29], l'analyse de l'HE montre un chimiotype composé de : chamazulène, nuciferol butanoate et nuciferol propionate.

A l'issue de ces résultats, nous constatons que l'origine géographique a un effet important sur la composition chimique de l'HE d'*Artemisia absinthium* L. [29]. En effet, nos résultats présentent un chimiotype qui ne concorde pas avec ceux du Canada [28], de l'Iran [27] et de la Turquie [29].

L'HE d'*Artemisia absinthium* est comparable dans sa composition chimique à l'*Artemisia herba alba* (Asteracées) sauf pour la chrysanthénone, qui est inexistante chez *A. absinthium* L. communément, l'huile essentielle d'armoise blanche est connue par sa composition en monoterpénoides, surtout oxygénés,

comme le 1,8 cinéole, chrysanthénone, chrysanthénol,  $\alpha/\beta$  thujones, davanone et le camphre comme composants majoritaires [29]. La chrysanthénone est ainsi présente comme constituant majeur (47,71%) [30] chez la plupart des armoises. Cette différence de composition chimique peut être un indicateur pour différencier entre deux espèces voisines qui abondent à la même hauteur altitudinale [31].

De ce fait, ce qui caractérise particulièrement la famille des Astéracées, c'est le polymorphisme chimique surtout chez les *Artemisia*. Cette variation ou chimiovariété peut se présenter d'un peuplement à l'autre ou même d'un individu à l'autre et peut être due à des facteurs exogènes comme l'ensoleillement, la nature et les composants du sol, la température, l'altitude, etc. et aux facteurs endogènes tel que le patrimoine génétique des individus. Ces facteurs constituent autant de paramètres qui influencent à la fois le rendement et la qualité chimique de l'huile essentielle. L'étude quantitative des extraits bruts d'*Artemisia absinthium*, au moyen des dosages aux spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins.

La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribués. [31].

Les polyphénols sont estimés par plusieurs méthodes, comme la méthode de bleu de Prusse [32] mais la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur du jaune au bleue, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à longueur d'onde de 765 nm [33]. Les résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique d'*Artemisia absinthium* L. sont respectivement 24mg EQ/g Ps et 12.77 mg EQ/g Ps. Nos valeurs trouvées sont très élevées par rapport à celles dosées dans des extraits éthanoliques 70% (v/v) d'*Artemisia campestris* (la teneur des polyphénols totaux est de 20.38 mg EAG/g Ps et la teneur en flavonoïdes est de 7.46 mg EAG/g Ps) et sont également supérieures à la teneur en polyphénols dosées dans l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba* Asso. [34].

De ce fait, l'extrait d'*Artemisia absinthium* L. est riche en composés phénoliques et en flavonoïdes. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par différents chercheurs que les extraits d'absinthe sont riches en flavonoïdes, composés phénoliques et cavarol et possèdent de activités antifongiques importantes [35, 36].

L'activité antifongique de l'huile d'absinthe peut être expliquée par sa richesse en composés oxygénés monoterpéniques (64,29%) comme le thuyone, le 4-terpinéol et le  $\alpha$ -terpinéol contenus dans cette huile, et les composés phénoliques et flavonoïdes contenus dans les extraits méthanoliques, qui agissent comme des antiseptiques, anti-inflammatoires et antimicrobiens [25].

L'étude menée par Juteau *et al.* [37], a montré que le taux élevé de thuyone est la principale cause de l'activité antimicrobienne de l'huile d'*Artemisia absinthium* L. Cette activité pourrait être liée à la présence du thuyone qui est le majoritaire dans cette huile.

Les travaux de Juteau *et al.* [37], montrent que les huiles essentielles extraites à partir de feuille d'*A. absinthium* L. ont une bonne activité antifongique contre *Candidas albicans*. Les résultats obtenus ont montré que cette plante qui est riche en 1,8-Cineole possède un pouvoir antifongique modéré sur les champignons testés

Le pouvoir antifongique des constituants majoritaires de notre huile essentielle dont le Thujone, Chamazulène, Limonene a été validé par de nombreux chercheurs [25-35]. Les huiles essentielles d'*Artemisia absinthium* possèdent des activités antifongiques contre trois champignons phytopathogènes du genre *Fusarium*, le pouvoir antifongique est attribué au Chamazulene [25] et Thuyone [37].

Cependant l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium* en provenance de France riche en (Z)-epoxyocimene et chrysanthenyl acetate inhibe la croissance de *candidas albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* var. Chevalieri [35].

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques étudiés pourrait être attribué à la présence des composants qui possèdent une activité antifongique provoquant des dommages membranaires sévères et une perte d'homéostasie d'où elle entraîne à l'inhibition totale ou la mort cellulaire [35].

L'activité antifongique des huiles essentielles peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés d'huile essentielle, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique ainsi que les composés minoritaires qui peuvent contribuer significativement à cette activité.

Certaines études ont trouvé que l'activité antimicrobienne des HE peut être supérieure à celle de leurs composés majoritaires testés séparément. Cette dominance d'activité des essences sur celle d'un composant majoritaire confirme bien l'effet de synergie que pourraient apporter les composants minoritaires à l'activité des HE. Par ailleurs, il existe une corrélation proportionnelle établie entre la présence des monoterpènes oxygénés et le pouvoir antimicrobien [35].

## CONCLUSION

Le présent travail vise à valoriser une plante médicinale et aromatique très répandue dans le monde et en Algérie. Notre étude a porté sur l'analyse phytochimique de l'huile et de son extrait ainsi que leur potentiel antifongique *in vitro*.

L'analyse de la composition chimique des huiles d'*Artemisia absinthium* a permis d'identifier 22 composés par hydrodistillation, parmi lesquels il existe trois composés majoritaires, les principaux constituants sont: le thuyone suivi de chamazulène et ensuite de  $p$ -cymène. Cette huile révèle un chémotype très riche en cétone. Le screening phytochimique a mis en évidence diverses classes de métabolites secondaires dans les parties aériennes de la plante: polyphénols, tannins et les flavonoïdes.

Les résultats de la méthode de diffusion sur gélose et de microdilution ont révélé une sensibilité accrue des différentes souches fongiques testées. L'huile et les extraits méthanoliques ont une bonne efficacité. Ce pouvoir bioactif observé chez cette huile est attribué principalement par sa teneur élevée en monoterpènes oxygénés et aux flavonoïdes et composés phénoliques trouvés dans les extraits. Ces résultats présentent un intérêt pour des applications phytosanitaires comme des procédés de lutte biologique basés sur des substances naturelles afin d'éradiquer les infections d'origine fongique et en vue d'une utilisation dans le cadre d'une agriculture biologique.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Cook, R., and Baker, K.F., (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. The APS. St. Paul. Minnesota, pp: 539
- [2] Chang H.Y., Ho Y.L., Sheu M.J., Lin Y.H., Tseng M.C., Wu, S.H., Huang G.J, and Chang, Y.S. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. *Botanical Studies* 48: 407-417.
- [3] Barnard, M., Padgitt, M., and Uri, N.D. (1997). Pesticide use and its measurement. *Int. Pest Control*, 39: 161-164
- [4] Thiam A. (1991). *Problématique de l'utilisation des insecticides chimiques dans la lutte anti-acridienne au Sahel*. Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, 193-206
- [5] Duke J.A. (1985). *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Boca Roton, FL.
- [6] Bezza L, Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., Hadjminaglon F. et Kaloustian J. (2010). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba alba* from the region of Biskra (Algeria). *Phytotherapy*, 8: 277-281.
- [7] Hose S. (2002). Der Wermut - *Artemisia absinthium* L. *Zeitschrift Phytother* 23: 187-194.
- [8] Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A., and Yildirim A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24):.9452-9458.
- [9] Derwiche E., Benziane Z and Boukir A. (2009). Chemical compositions and insecticidal activity of essential oils of three plants *Artemisia* species : *Artemisia Herba-Alba*, *Artemisia Absinthium* and *Artemisia Pontica* (Morocco) *EJEAF Che*, 8 (11): 1202 – 1211p.
- [10] Santa S. (1962-1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Vol. 1-2. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique CNRS.Paris, 1170 p
- [11] Clevenger J.F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 17 :345-349.
- [12] Afnor (1986). *Huiles essentielles. Recueil de normes françaises*. Edition Tec&Doc Lavoisier. 2e édition.
- [13] Adams R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed., Allured Publishing: Carol Stream, IL, USA. 7
- [14] Luque M.D. et Garcia L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369: 1-10.
- [15] Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178. 273
- [16] Nguang SL, Yeong YL, Pang SF, Jolius G. (2017). Ultrasonic Assisted Extraction on Phenolic and Flavonoid Content from *Phyllanthus niruri* Plant. *Indian J Sci Tech.*, 10 (2): 159172
- [17] Liu, S, Sun, J, Yu L, Zhang, C, Bi J, Zhu, F, Qu, M, Yang Q. (2012), Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts. *Food Chemistry*. 134
- [18] Honorata M. Ropiak, Aina R I and Mueller H. (2016). Condensed tannins in extracts from European medicinal plants and herbal products. *J Pharma Biom Analy.*, 121: 225-231
- [19] Booth, C. (1971). *Fungal culture media*, In: *Methods in microbiology* (Eds. J. R. Norris, and D. W. Ribbons), 49-94. Academic Press, London, New York.
- [20] NCCLS (1997). (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Sixth ed. Approved Standard M2-A6, Wayne, PA.
- [21] Robert-Dernuet S., (1995). *Antibiotiques et Antibiogrammes*. Décarie Vigot, Montréal. p322.
- [22] Schulz V., Hansel R., E.Tyler V., Blumenthal M, (2004). *Rational phytotherapy: a reference guide for physicians and pharmacists*, 417 P, Germany, 5ème edition, Ratgeber für Ärzte und Apotheker Publié par Springer, " Pages 367.
- [23] Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S. and Kolodziejczyk P.P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry.*; 69 (8) :1732-1738.
- [24] Derwiche E., Benziane Z and Boukir A. (2009). Chemical compositions and insecticidal activity of essential oils of three plants *Artemisia* species : *Artemisia Herba-Alba*, *Artemisia Absinthium* and *Artemisia Pontica* (Morocco) *EJEAF Che*, 8 (11):1202 – 1211.
- [25] Msaada. K., Salem N., Bachrouch O., Bousselmi,S., Tammar T., Alfaify A., AlSane K., Azeiz S., Brahim A., Hammami,A., Selmi,S., Limam, and Marzouk C. (2015). Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Essential Oils and Phenolics. *Journal of Chemistry*, Volume 2015, Article ID 804658, 12 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/804658>
- [26] Rezaeinodehi A and Khangholi S. (2008). Chemical composition of the essential Oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. *Pakistan journal of biological sciences* 11 (6): 946-949.

- [27] **Nezhadali A. and Parsa M. (2010).** Study of the volatile compounds in *Artemisia absinthium* from Iran using HS/SPME/GC/MS, *Advances in Applied Science Research*, 1 (3): 174-179.
- [28] **Kordali S., Cakir A., Mavi A., Kilic H and Yildirim A. (2005).** Screening of Hose S., 2002-Der Wermut - *Artemisia absinthium* L. Zeitschrift Phytother 23: 187-194.chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential from three Turkish *Artemisia* species *J. Agric. Food Chem.* 53: 1408 – 1416.
- [29] **Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P. (2008).** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69 (8) :1732-1738.
- [30] **Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Ismaili M.R., Houtia H., Manfalouti H., Benchakroun K., Abarchane M., Harki L., Boukir A, Chaouch A. and Charrouf Z. (2010).** Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guercif (Maroc oriental). *Phytothérapie*, 8(5) : 295-301.
- [31] **Ouyahya A., Nègre R., Viano J., Lozano Y.F. and Gaydou E.M. (1990).** Essential oils from Moroccan *Artemisia negrei*, *A. mesatlantica* and *A. herba-alba*. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, 23: 528-530.
- [32] **Graham HD. (1992).** Stabilisation of the Prussian blue coloring the determination of polyphenols. *J Agric Food Chem*, 40: 801-805.
- [33] **Huang D. and Prior RL. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J of Agr Food chem*, 53: 1841-1856
- [34] **Boudjelal A. (2013).** Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Diplôme de Doctorat en Sciences, Option Biochimie Appliquée, Université Annaba, Algérie. -
- [35] **Zheng G.Q. (1994).** Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*,” *Planta Medica*, 60(1):54–57
- [36] **Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M. and Mete E. (2006).** Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products*, 23(2):162–170
- [37] **Juteau F., Jerkovic I., and Masottietal V. (2003).** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Medica*, 69(2): 158–161