

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ NÉMATOTOXIQUE D'*HAPLOPHYLLUM TUBERCULATUM* SUR *MELOIDOGYNE JAVANICA*

S. Kallel, M.Z. Ben Ouadday et Z. Ghrabi

Institut National Agronomique de Tunisie
43, Avenue Charles Nicole, 1082 Tunis-Mabrajène, Tunisie

Résumé. La plante *Haplophyllum tuberculatum* a été étudiée pour ses propriétés médicales (thérapeutiques et vermifuges), fongicides, antimicrobiennes et insecticides. Dans cette optique, nous avons mis en évidence des structures sécrétrices dans la plante et étudié l'effet des différentes concentrations des extraits aqueux et de méthanol, éthanol, chloroforme et hexane d'*H. tuberculatum* sur l'éclosion et la mortalité des œufs, et sur la mobilité et la mortalité des juvéniles de *Meloidogyne javanica*. L'extrait aqueux, aux concentrations de 5 et 10%, a réduit l'éclosion des œufs et la mobilité des juvéniles et a montré un effet toxique sur les œufs et les juvéniles. À ces mêmes concentrations, l'immobilité des juvéniles atteint les 100% après 48 heures d'exposition. L'éthanol et le méthanol, contrairement à l'hexane, permettent de restituer l'effet de l'extrait brut d'*H. tuberculatum*, ce qui suggère la polarité du principe actif de la plante.

Mots clés: Activité nématocide, extraits de plante, mobilité, mortalité, nématode à galle.

Summary. Evaluation of the nematocidal activity of *Haplophyllum tuberculatum* on *Meloidogyne javanica*. Several studies have shown the medicinal, fungicidal and nematocidal properties of the plant *Haplophyllum tuberculatum*. In this work, we examined the secreting structures in the plant and investigated the effect of different concentrations of aqueous, methanolic, ethanolic, chloroformic and hexanolic extracts of *H. tuberculatum* on hatching and mortality of eggs and motility and mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica*. The aqueous extract at 5 and 10% reduced egg hatching and juvenile motility and increased egg and juvenile mortality. At these concentrations, juvenile immobility reached 100% after 48 hours of exposure. The ethanolic and methanolic extracts showed the same effect as the aqueous extract, thus suggesting the nematocidal compound to be polar.

Keywords: Mortality, motility, nematocidal activity, plant extracts, root-knot nematode.

L'utilisation des extraits de plantes comme moyen de lutte contre les nématodes connaît un nouvel essor avec l'engouement pour les produits biologiques, surtout avec la restriction de l'utilisation des nématocides notamment le bromure de méthyle. Dans ce contexte, plusieurs plantes telles que le neem (*Azadirachta indica* Adr. Juss.) et la tagète (*Tagetes* spp.) ont été étudiées pour leur effet nématotoxique.

Haplophyllum tuberculatum (Forsk.) A. Juss. (Rutaceae) est une plante des régions arides intégralement couverte de grosses glandes renfermant une essence à forte odeur désagréable. Les tiges, comme le montre la figure 1, sont très rameuses de 20-40 cm. Les feuilles sont spatulées, atténuées en pétiole, à bords un peu enroulés en dessous (Pottier-Alapetite, 1979). Cette plante est connue depuis longtemps pour ses vertus phytothérapeutiques et vermifuges. Elle est présente dans plusieurs ouvrages anciens d'Ibn Sina, d'Ibn El-bitar et d'El-antaky (Yonis Haggag, 1997).

Cette plante est utilisée à des fins phytothérapeutiques pour les traitements du système nerveux, la fièvre et la stérilité (Said *et al.*, 2002). Dans le nord d'Oman, le jus est utilisé comme un remède pour maux de tête et arthrite (Al-Burtamani *et al.*, 2005). Il est aussi utilisé pour atténuer les taches de rousseur de la peau et aussi traiter la décoloration de la peau, les infections et les maladies parasitaires (Mossa *et al.*, 1987). En Arabie Saoudite, *H. tuberculatum* est utilisé pour traiter la malaria, la polyar-

thrite rhumatoïde et les désordres gynécologiques (Al-Yahya *et al.*, 1992). *Haplophyllum tuberculatum* est utilisé pour protéger le bétail des morsures des insectes et des mouches (Miller *et al.*, 1988). L'extrait de l'éthanol des parties aériennes de *H. tuberculatum* possède une bonne activité insecticide contre *Culex quinquefasciatus* Fact Sheet. (Zohair *et al.*, 1989).

L'huile essentielle d'*H. tuberculatum* est anti-bactérienne et inhibe partiellement la croissance d'*Escherichia coli* (Migula) Castellani *et* Chalmers, de *Salmonella choleraesuis* (Smith) Weldin, de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn *et* de *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout. Elle contient également des principes anti-fongiques. En effet, l'huile essentielle inhibe la croissance mycélienne de *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn *et* de *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Sn. *et* H. (Al-Burtamani *et al.*, 2005). En ce qui concerne l'action nématocide, une étude réalisée par Stephan (2004) mentionne qu'*H. tuberculatum* présente un effet toxique sur les œufs et les juvéniles de *Meloidogyne* spp.

Le but de ce travail est la mise en évidence des structures sécrétrices d'*H. tuberculatum*, d'évaluer l'action de l'extrait de cette plante sur la biologie de *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitw. (éclosion et mortalité des œufs et mobilité et mortalité des juvéniles) et de déterminer les caractéristiques chimiques des fractions nématotoxiques/nématostatiques de cette plante.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Pendant la période estivale, des échantillons de la plante entière d'*H. tuberculatum* (Fig. 1) sont collectés au stade de floraison, dans le sud tunisien et dans la région de Médenine, route de Jorf (au bord de la route, lisière des oliveraies). Des spécimens sont déposés dans l'herbier de l'Institut National Agronomique de Tunisie et le reste du matériel végétal récolté est conservé à une température de 5 °C.



Fig. 1. Aspect végétatif d'*Haplophyllum tuberculatum* dans son milieu naturel.

La mise en évidence des structures sécrétrices d'H. tuberculatum. Les feuilles, les tiges et les racines sont découpées à main levée. Les coupes transversales de ces différents organes sont colorées par la technique de trichrome de Masson. Le trichrome de Masson permet de colorer en noir les noyaux, en rose les cytoplasmes et les nucléoles et en rouge ou en vert les sécrétions (Gabe, 1968). Les coupes sont placées dans l'hématoxyline de Groat pendant 5 minutes. Après cette période, ces coupes subissent un lavage à l'eau courante pendant 5 minutes. Une deuxième coloration est réalisée par l'intermédiaire du mélange fuchsine-ponceau (0,2 g de ponceau, 0,1 g de fuchsine acide, 300 ml d'eau distillée et 0,6 ml d'acide acétique) pendant 5 minutes. Ensuite, ces coupes sont rincées à l'eau acétique (solution aqueuse à 1% d'acide acétique). Les coupes sont, par la suite, placées dans de l'orangé G molybdique (acide phosphomolybdique 5 g, orange G 2 g et eau distillée 100 ml) pendant 5 minutes. Après un autre rinçage à l'eau acétique, on effectue la dernière coloration, c'est-à-dire au vert-lumière (vert lumière 0,2 g, eau distillée 100 ml et acide acétique 0,2 ml) pendant 5 minutes, suivie d'un autre rinçage à l'eau acétique (Gabe, 1968). Ces coupes sont, par la suite, déposées entre lame et lamelle. L'observation se fait sous microscope OLYMPUS CX40.

Préparation de l'extrait soluble brut et de la population de Meloidogyne javanica. Les échantillons de la plante entière d'*H. tuberculatum* sont finement découpés, puis

réduits en poudre avec un broyeur Cyclotec 1093 Sample Mill. Une suspension mère de 20% est réalisée par addition de 10 g de poudre végétale à 50 ml d'eau distillée. La suspension obtenue est macérée pendant une heure. La séparation des particules insolubles est effectuée en passant la suspension à travers un papier filtre grâce à un dispositif sous vide. La solution mère à 20%, ainsi formée servira pour les dilutions (10, 5 et 1%) utilisées dans les différents tests biologiques.

L'activité nématocide d'*H. tuberculatum* est étudiée sur *M. javanica*. Les masses d'œufs sont prélevées à partir des racines infestées de tomate provenant du Sud tunisien (région de Gabès). Les masses d'œufs de *M. javanica* sont récoltées sous loupe binoculaire à l'aide d'une aiguille, et conservées dans une solution de Dropkin (17,5 g/l de NaCl). Les masses d'œufs, ainsi obtenues, sont utilisées directement pour les tests d'éclosion ou disposées dans des éclosoirs afin d'obtenir des juvéniles pour les tests de mobilité.

Effet de l'extrait soluble brut sur la mortalité et l'éclosion des œufs. Les masses d'œufs prélevées à partir des racines infestées, sont mises dans quatre tubes Eppendorf (vingt masses dans chaque tube) contenant de l'extrait aqueux d'*H. tuberculatum* à différentes concentrations (0; 1; 5; 10%). Chaque concentration est répétée cinq fois. Les tubes Eppendorf sont, par la suite, mis dans un incubateur à 22 °C pendant 48 h. Après cette période, une moitié des masses, exposées aux différentes concentrations de l'extrait aqueux, est colorée avec du bleu de Meldola à 1% (ce dernier colore les œufs morts en bleu foncé, tandis que les œufs vivants restent incolores) et l'autre moitié est placée dans de l'eau distillée dans un incubateur à 22 °C afin d'étudier l'effet de l'extrait sur l'éclosion des œufs. Le comptage des juvéniles émergés est réalisé tous les 2 jours sous loupe binoculaire. Une fois l'éclosion terminée (après 28 jours), les masses d'œufs sont placées dans une goutte d'eau distillée et écrasées entre lame et lamelle afin de dénombrer les œufs non éclos.

Effet de l'extrait sur la mobilité et la viabilité des juvéniles. Les masses prélevées à partir des racines infestées sont placées dans un tamis de 5 cm de diamètre dont les mailles ont 1 mm de diamètre sur du papier cellulosique. Ce tamis est placé dans une boîte de Pétri de 8 cm de diamètre contenant de l'eau distillée. Celle-ci est placée dans un incubateur à 25 °C. L'eau est remplacée quotidiennement. Les juvéniles émergents obtenus pendant les deux premiers jours sont jetés. À partir du troisième jour d'incubation, les juvéniles émergents sont récupérés pour servir aux essais. La suspension de 2 ml contenant une centaine de nématodes est placée dans chaque boîte de Pétri. À cette suspension est additionnée 2 ml d'extrait aqueux aux concentrations de 20, 10, 2 et 0% de manière à obtenir des concentrations finales de 10, 5, 1 et 0%. Chaque traitement est répété cinq fois. Ensuite, ces boîtes de Pétri sont mises dans un incubateur à 25 °C pendant des laps de temps allant de 6 à 48 heures.

Tenant compte de la quiescence des larves, une nouvelle suspension de nématode est utilisée pour chaque période d'exposition. Après chaque période, l'effet de l'extrait sur la mobilité des juvéniles est évalué en dénombrant sous loupe binoculaire les juvéniles mobiles par rapport au nombre total de juvéniles. Une juvénile est considérée vivante lorsqu'il est mobile ou que sa partie antérieure est mobile et bouge après excitation mécanique par un poil ou après exposition aux radiations lumineuses. Ces juvéniles sont, par la suite, placés dans des tamis de diamètre 2,5 cm dont les mailles ont 1 mm de diamètre sur du papier cellulosique. Ces tamis sont placés dans des boîtes de Petri de 50 mm de diamètre contenant de l'eau distillée et les boîtes de Petri sont mises dans un incubateur à 25 °C. L'eau distillée est renouvelée quotidiennement pendant trois jours jusqu'au passage de l'ensemble des juvéniles vivants. Les juvéniles vivants sont dénombrés toutes les 24 h afin de calculer le pourcentage de juvéniles vivants issus des différents extraits.

Effet de l'extrait par solvant sur les larves juvéniles. La solubilité des principes actifs contenus dans *H. tuberculatum* a été testée par l'utilisation de plusieurs solvants. Quatre solvants ont été utilisés pour cet essai: deux polaires (le méthanol et l'éthanol 96%) et deux solvants apolaires (le chloroforme et l'hexane). Tout d'abord, les échantillons d'*H. tuberculatum* conservés à 5 °C sont coupés et broyés à l'aide d'un broyeur (Cyclotec 1093 Sample Mill). Une suspension à 10% de concentration est obtenue en additionnant 5 g de poudre à 50 ml de solvant. Après une heure de macération, la suspension est filtrée sous vide. L'extrait obtenu et le broyat retenu par le papier filtre sont, par la suite, placés sous une hotte à flux laminaire dans le but d'éliminer le solvant. Après évaporation du solvant, l'extrait ainsi que le broyat sont additionnés de 25 ml d'eau distillée chacun. La suspension contenant le broyat représentant la frac-

tion insoluble dans le solvant est filtrée. La fraction soluble et la fraction insoluble sont placées à raison de 2 ml dans des boîtes de Petri de 50 mm de diamètre. Ces dernières contiennent déjà une suspension de 2 ml renfermant une centaine de juvéniles placés précédemment à l'aide d'une pipette. Deux types de témoins sont envisagés. Un témoin est effectué de la même manière et dans les mêmes conditions que celles pour la fraction soluble et l'autre identique à la fraction insoluble dans le solvant sauf qu'ils ne renferment pas de broyats d'*H. tuberculatum*. Le comptage des juvéniles immobiles dans la solution d'*H. tuberculatum* à 10% est réalisé après 48 h sous loupe binoculaire. Ces derniers sont mis, par la suite, dans des éclosiers placés dans des boîtes de Petri contenant de l'eau distillée. Un comptage journalier des juvéniles vivants est effectué sous loupe binoculaire. Le cumul des juvéniles vivants obtenus pendant trois jours sert à déterminer le pourcentage de viabilité des juvéniles de nématode.

Analyse statistique. Les effets des différents traitements, effectués au cours des tests, sont analysés par le logiciel SPSS10.0. Le traitement statistique consiste en une analyse de variance (ANOVA) suivie d'une comparaison multiple des moyennes par le test de Student Newman et Keuls à la probabilité $P = 0,05$ et le test de Dunnett à la même probabilité, pour comparer les différentes concentrations de l'extrait au témoin eau distillée.

RÉSULTATS

*La mise en évidence des structures sécrétrices d'*H. tuberculatum*.* La feuille d'*H. tuberculatum* est marquée par la présence d'un grand nombre de poches à essences au niveau de la nervure principale et aussi bien du côté de l'épiderme supérieur adaxial que de l'épider-

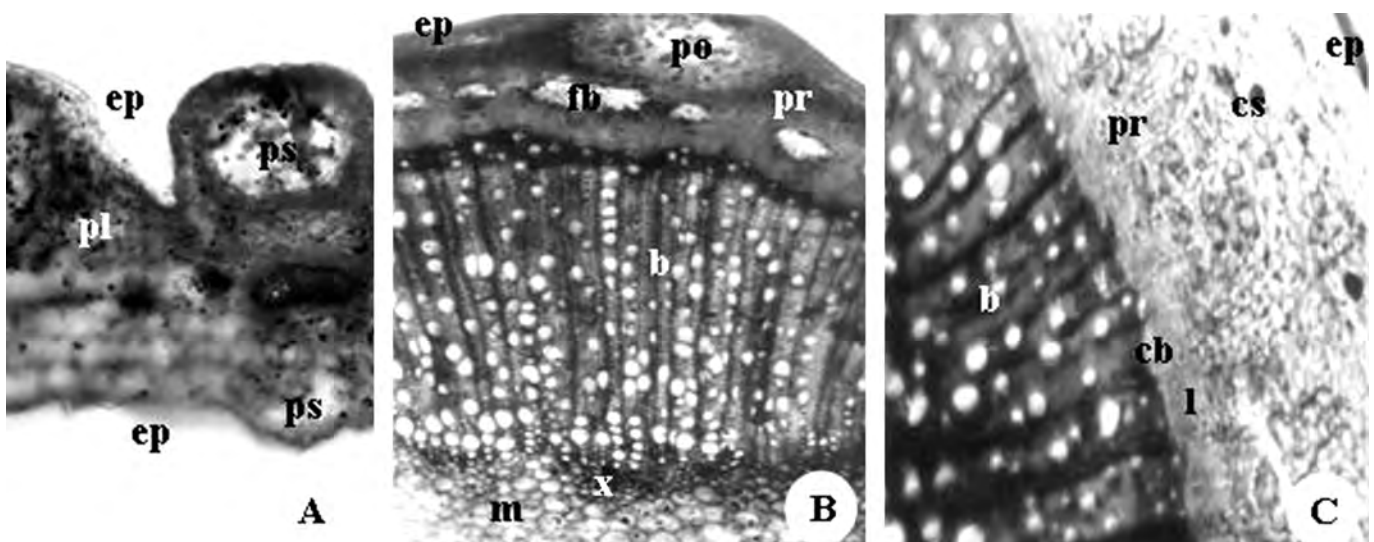


Fig. 2. Coupe transversale de la feuille (A), de la tige (B) et de la racine (C) d'*H. tuberculatum* ($\times 200$): b, bois; cb, cambium; cs, cellule sécrétrice; fb, fibres péricycliques; ep, épiderme; l, liber; m, moelle; ph, phloème; pl, parenchyme lacuneux; ps, poche sécrétrice; pp, parenchyme palissadique; pr, parenchyme; po, poche à essence; x, xylème.

me inférieur abaxial (Fig. 2A). La tige d'*H. tuberculatum* présente une structure anatomique classique de tige de dicotylédone (Fig. 2B). Des poches sécrétrices se localisent au niveau du parenchyme cortical sous l'épiderme, présentant une cavité remplie d'essences produites par des cellules sécrétrices aplaties qui entourent cette cavité (Fig. 2B). La racine d'*H. tuberculatum* présente la structure anatomique classique d'une racine de dicotylédone. Le parenchyme de la racine d'*H. tuberculatum* présente des essences à l'intérieur de cellules (Fig. 2C).

Effet de l'extrait aqueux sur l'éclosion des œufs. L'éclosion des œufs de *M. javanica* évolue entre le deuxième et le 16^{ème} jour et se fait par vague de quatre jours. La vitesse d'éclosion entre le 6^{ème} et le 16^{ème} jour, pour les masses d'œufs traitées aux extraits de *H. tuberculatum* puis disposées dans une eau ayant la même pression osmotique, est plus élevée que celle des pontes témoins (Fig. 3). Le pourcentage d'éclosion des œufs après 28 jours d'incubation pour le témoin, 1%, 5% et 10% d'extrait de la plante est de 48,7; 56,9; 45,9 et 41,3 respectivement. Ce pourcentage est statistiquement similaire pour les différents traitements (Tableau I). Le traitement des masses d'œufs avant éclosion n'a pas d'effet significatif sur le nombre de juvéniles émergents à 24 °C. Les différentes doses d'extraits bruts de la plante n'ont pas d'effet sur la proportion des œufs non éclos et colorés, qui représente la fraction des œufs morts du nématode (Tableau I). Par contre, les doses progressives de l'extrait réduisent significativement la proportion des œufs vivants et non éclos (Tableau I).

Effet de l'extrait aqueux sur la mortalité et le développement des œufs. Le pourcentage de mortalité naturelle des œufs de *M. javanica*, évalué par le taux d'œufs colorés par le bleu de Meldola à 1%, varie entre le début et la fin du

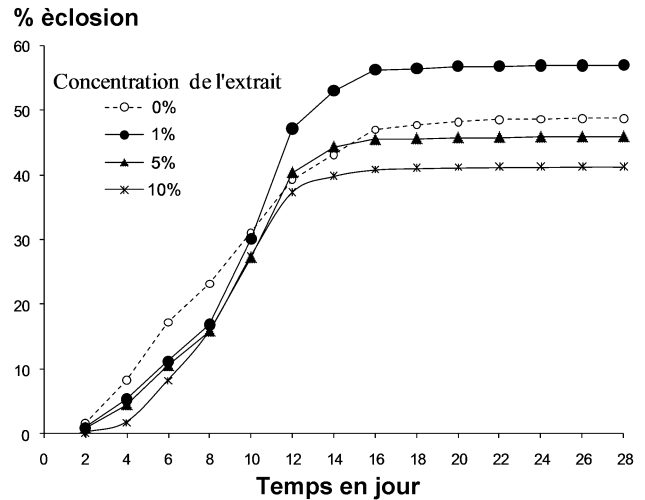


Fig. 3. Effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux d'*H. tuberculatum* sur l'éclosion des œufs de *M. javanica* après 48 heures d'exposition.

traitement et passe de 25 à 44%. La mortalité des œufs exposés à l'extrait aqueux augmente entre l'extrait de la plante à 1% et 5% pour atteindre un pourcentage de 54,6% (Tableau II). En revanche, aucune différence significative n'est obtenue entre les concentrations à 5 et 10%. En ce qui concerne l'effet de l'extrait aqueux sur le développement embryonnaire, le pourcentage des œufs non embryonnés obtenu moyennant les concentrations 10 et 5% ne diffère pas significativement de celui du témoin. Une augmentation significative du pourcentage d'œufs non embryonnés a été obtenue dans l'extrait à 1% et les différents traitements (Tableau II).

Effet de l'extrait aqueux sur les juvéniles. L'immobilité des juvéniles est presque nulle au niveau du témoin (au

Tableau I. Effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux d'*Haplophyllum tuberculatum* sur les œufs de *Meloidogyne javanica* après exposition pendant 48 heures et mis à éclore dans l'eau distillée pendant 28 jours.

Oeufs de <i>M. javanica</i>	Concentrations de l'extrait (%)			
	0	1	5	10
% d'œufs éclos	48,7 a	56,9 a	45,9 a	41,3 a
% d'œufs éclos colorés	34,5 a	32,0 a	46,3 a	50,4 a
% d'œufs non éclos et non colorés	16,7 a	11,0 b	7,8 b	8,3 b

Les moyennes des différentes colonnes présentant des lettres différentes sont significativement différentes à la probabilité P = 0,05 selon le test de Student-Newman et Keuls.

Tableau II. Effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux d'*H. tuberculatum* sur les œufs de *M. javanica* après exposition pendant 48 heures.

Oeufs de <i>M. javanica</i>	Avant traitement	Dans différentes concentrations (%) de l'extrait			
		0	1	5	10
% d'œufs colorés	25,0 a	44,5 b	31,3 a	54,6 c	54,5 c
% d'œufs non embryonnés	-	17,2 a	32,5 b	14,9 a	13,6 a

Les moyennes des différentes colonnes précédant des lettres différentes sont significativement différentes à la probabilité P = 0,05 selon le test de Student-Newman et Keuls.

Tableau III. Évolution du pourcentage d'immobilité des juvéniles de *M. javanica* après incubation pendant 48 heures dans différentes concentrations de l'extrait aqueux d'*H. tuberculatum*.

Temp d'exposition (heures)	Concentrations de l'extrait (%)			
	0	1	5	10
6	0 a	0,5 ± 0,8* a	7,5 ± 2,2 b	7,2 ± 1,4 b
9	0 a	8,3 ± 1,1 b	14,9 ± 3,9 c	6,7 ± 0,7 b
12	0 a	0,6 ± 0,5 b	98,7 ± 0,7 c	100 d
19	0 a	0,5 ± 0,6 b	100 c	100 c
24	0 a	0 a	68,8 ± 5,6 b	77,3 ± 2,6 c
36	0 a	0,18 ± 0,3 a	89,8 ± 1,8 c	79,8 ± 2,6 b
48	0,7 ± 0,7 a	1,69 ± 1,2 b	93,3 ± 2,6 c	100 c

Les moyennes des différentes colonnes précédant des lettres différentes sont significativement différentes à la probabilité $P = 0,05$ selon le test de Student-Newman et Keuls.

* Limites de l'intervalle de confiance à la probabilité $P = 0,05$.

terme du test, le pourcentage d'immobilité est égal à 0,65%). Le taux d'immobilité des juvéniles placées dans l'extrait aqueux de concentration 1% est statistiquement similaire à celui observé au niveau du témoin à 6 h d'incubation et n'atteint que 1,7% après 48 h d'exposition (Tableau III). Par contre, une réduction significative de la mobilité à la dose de 5% et 10% est observée à partir de 12 h. À ces deux doses, l'immobilité maximale est obtenue à 19 h d'incubation; l'évolution du taux d'immobilité ne connaît pas une augmentation progressive, notamment après 12 et 19 h où le pourcentage atteint le maximum. Ceci pourrait être dû à la présence dans les boîtes de Petri des fines particules provenant du broyat d'*H. tuberculatum* qui ont traversé le papier filtre lors de la filtration. Le taux d'immobilité des juvé-

niles après 48 heures d'incubation pour le témoin, 1%, 5% et 10% d'extrait de la plante est de 0,7%; 1,6%; 93,3% et 100% respectivement. À cette date d'exposition, le taux obtenu pour la dose de 5% est significativement similaire à celui mesuré pour la dose de 10%.

Après incubation dans l'eau distillée, au niveau du témoin, le taux de viabilité des juvéniles évolue très peu au cours du temps avec des pourcentages variant entre 83,6 à 100%. Par contre, les juvéniles placées précédemment dans l'extrait d'*H. tuberculatum* à concentration 10% montrent une réduction de viabilité échelonnée qui atteint 6% après 48 h d'exposition (Tableau IV). L'effet de l'extrait aqueux d'*H. tuberculatum* sur la mortalité des juvéniles de *M. javanica* n'est statistiquement mesurable qu'à partir de 12 h d'incubation. La mortalité la plus im-

Tableau IV. Évolution du pourcentage de viabilité des juvéniles de *M. javanica* après exposition pendant 48 heures aux différentes concentrations de l'extrait d'*H. tuberculatum*, suivie d'une incubation dans l'eau distillée pendant 3 jours.

Temps d'exposition (heures)	Concentrations de l'extrait (%)			
	0	1	5	10
6	97,1 ± 4,1* a	98,4 ± 2,1 a	95,4 ± 3,9 a	98,1 ± 8,5 a
9	98,9 ± 1,3 a	95,7 ± 4,5 a	94,7 ± 5,2 a	82,4 ± 3,0 b
12	99,0 ± 1,4 a	30,5 ± 5,0 c	70,2 ± 5,5 b	67,2 ± 14,4 b
19	100 a	57,7 ± 10,4 b	48,6 ± 13,0 b	50,94 ± 5,7 b
24	83,6 ± 4,9 a	65,9 ± 7,5 b	55,6 ± 7,9 bc	49,1 ± 4,8 c
36	96,5 ± 5,7 a	62,0 ± 6,0 b	60,7 ± 8,0 b	41,8 ± 6,5 c
48	100 a	44,1 ± 8,7 b	7,1 ± 2,4 c	6,2 ± 1,3 c

Les moyennes des différentes colonnes précédant des lettres différentes sont significativement différentes à la probabilité $P = 0,05$ selon le test de Student-Newman et Keuls.

* Limites de l'intervalle de confiance à la probabilité $P = 0,05$.

portante est décelée à 24 h d'incubation pour les deux extraits à 5 et à 10% (Tableau IV). La présence d'impuretés dans les boîtes de Petri provoque l'augmentation de la mortalité des larves et ceci est visible après 12 et 19 h. Les pourcentages de juvéniles viables après 48 h d'incubation pour le témoin, pour les extraits plante à 1%, 5% et 10% sont de 100%; 44,1%; 7,1% et 6,2%, respectivement. Aucune différence significative n'est obtenue entre les moyennes des taux de viabilité aux extraits bruts de 5 et 10% après 48 h.

Effet de l'extrait par les solvants polaires sur les juvéniles. L'extrait d'*H. tuberculatum* obtenu par le méthanol agit faiblement sur la mobilité des juvéniles, puisque l'exposition à cet extrait induit un taux de mobilité similaire à celui du témoin (Tableau V). Les résultats obtenus montrent une réduction de la mobilité des juvéniles d'environ 40% lorsque ces derniers sont exposés à l'extrait d'*H. tuberculatum* par l'éthanol de concentration 10%. En revanche, au niveau du témoin, le taux de mobilité des juvéniles avoisine les 100% (Tableau V). L'extrait aqueux de la fraction insoluble dans l'éthanol à la même concentration montre un effet semblable sur la mobilité des juvéniles de *M. javanica* que celui de l'éthanol à 10%.

L'extrait obtenu utilisant comme solvant le méthanol provoque une mortalité des juvéniles statistiquement supérieure à celle du témoin (Tableau VI). L'extrait par l'éthanol à 10% entraîne une mortalité des juvéniles de *M. javanica* dépassant 50%. De la même manière que l'extrait méthanol, la mortalité engendrée par l'extrait

éthanol est significativement supérieure au témoin (Tableau VI). Par contre, l'extrait aqueux de la fraction insoluble dans l'éthanol provoque une mortalité des juvéniles de *M. javanica* statistiquement similaire à celle du témoin mesurée dans les mêmes conditions.

Effet de l'extrait par les solvants apolaires sur les juvéniles. L'extrait par le chloroforme à concentration 10% engendre un effet similaire à celui du témoin (Tableau V). En revanche, le résidu chloroforme à la même concentration agit fortement sur la mobilité des juvéniles de *M. javanica*, atteignant les 100%. Comme pour l'extrait par chloroforme, le pourcentage de mobilité des juvéniles exposés à l'extrait par l'hexane est semblable à celui du témoin. En revanche, l'extrait aqueux de la fraction insoluble dans l'hexane réduit considérablement la mobilité de ces juvéniles (Tableau V). Le pourcentage de mortalité des juvéniles de *M. javanica* exposés à l'extrait par le chloroforme à 10% n'est pas significativement différent de celui du témoin (Tableau VI). Pour sa part, l'extrait aqueux de la fraction insoluble dans chloroforme à concentration 10% entraîne un taux de mortalité qui avoisine 100%. L'extrait d'*H. tuberculatum* par hexane (à concentration 10%) provoque une mortalité des juvéniles qui atteint 21%. Ce pourcentage est différent de celui du témoin. En revanche, comme pour le chloroforme, le pourcentage de mortalité des juvéniles avoisine 100% quand ces derniers sont exposés à l'extrait aqueux de la fraction insoluble dans d'hexane à 10% (Tableau VI).

Tableau V. Effet des extraits d'*H. tuberculatum* par deux solvants polaires (méthanol et éthanol) et deux solvants apolaires (chloroforme et hexane) sur le pourcentage de mobilité des juvéniles de *M. javanica* après 48 heures d'exposition.

Solvant	Fraction soluble à 10%	Témoin/fraction soluble	Fraction non soluble à 10%	Témoin/fraction non soluble
Méthanol	97,1 a	99,4 a	-	-
Ethanol	62,5 b	98,4 a	62,5 b	98,4 a
Chloroforme	98,0 a	98,7 a	0,7 b	99,7 a
Hexane	99,1 a	99,8 a	10,4 b	99,1 a

- = Non effectué

Les moyennes précédant des lettres différentes sont significativement différentes à la probabilité $P = 0,05$ selon le test t pour le méthanol et selon le test de Student-Newman et Keuls pour le reste.

Tableau VI. Effet des extraits d'*H. tuberculatum* obtenu par deux solvants polaires (méthanol et éthanol) et deux solvants apolaires (chloroforme et hexane) sur le pourcentage de mortalité des juvéniles de *M. javanica* après exposition pendant 48 heures, suivie d'une incubation dans l'eau distillée pendant 3 jours.

Solvant	Fraction soluble à 10%	Témoin/fraction soluble	Fraction non soluble à 10%	Témoin/fraction non soluble
Méthanol	47,6 b	3,2 a	-	-
Ethanol	56,8 b	5,4 a	25,5 a	8,3 a
Chloroforme	8,8 a	2,2 a	99,3 b	6,5 a
Hexane	21,2 c	2,0 a	97,8 d	9,1 b

- = Non effectué

Les moyennes précédant des lettres différentes sont significativement différentes à la probabilité $P=0,05$ selon le test t pour le méthanol et selon le test de Student-Newman et Keuls pour le reste.

DISCUSSION

Les coupes histologiques réalisées au niveau des différents organes (feuilles, tige et racine) donnent des structures communes à toute plante appartenant aux dicotylédones à l'exception de la présence de poches de sécrétion qui se forment sur toute la plante comme le décrit Pottier-Alapetite (1979). Contrairement aux parties aériennes, les racines ne possèdent pas de poches à leur surface mais des cellules sécrétrices d'essences au niveau du parenchyme. L'étude de la sécrétion d'essence a été le sujet de plusieurs études; par exemple, Deysson (1965) décrit la structure d'une poche de sécrétion au niveau d'une feuille d'*Eucalyptus*. Cette structure ressemble fortement à celle observée au niveau de la feuille d'*H. tuberculatum*. En ce qui concerne la description des cellules sécrétrices, elle coïncide avec les propos de Pelt (1999) qui mentionne la possibilité de disposition des appareils sécréteurs en cellules isolées d'origine épidermique ou parenchymateuse.

L'étude allélochimique d'*H. tuberculatum* sur la biologie de *M. javanica* montre que l'extrait aqueux n'a d'effet qu'à des concentrations entre 5 et 10%. À ces concentrations, les extraits ont réduit l'éclosion des œufs de *M. javanica*, marquée par une proportion importante des œufs non colorées par le bleu de Meldola à 1‰ et non éclo. La mortalité et l'éclosion des œufs de *M. javanica* soumis aux extraits d'*H. tuberculatum*, pendant un laps de temps court (48 h) afin de prévenir l'effet de la pression osmotique des différentes concentrations des extraits, ne sont pas affectées. Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus par Stephan (2004) montrant l'action ovicide d'*H. tuberculatum*. La proportion élevée des œufs non embryonnés au niveau de l'extrait aqueux de concentration 1% par rapport au témoin pourrait être liée à un effet du principe actif sur le développement embryonnaire et la diapause de ces œufs. En effet, ce résultat est confirmé par la vitesse d'éclosion des œufs traités par l'extrait aqueux à cette concentration. Cependant, l'augmentation de la concentration de l'extrait ne semble pas influencer le développement de l'embryon.

La mobilité des juvéniles de *M. javanica* a été réduite par les concentrations élevées de l'extrait aqueux d'*H. tuberculatum*, ce qui signifie que cet extrait présente une activité nématostatique. Des travaux ont montré que les substances allélochimiques produites en pré-infection (comme les phénols, les terpénoïdes, les alcaloïdes) et les phytoalexines produites en post-infection peuvent avoir un effet sur la mobilité des juvéniles de *Meloidogyne* sp. En post-infection, Tabil et Walia (1996) ont montré que l'extrait de *Chenopodium album* L. et *C. murale* L. induit l'immobilité des larves de *M. incognita* (Kofoid et White) Chitw. (respectivement 55% et 48,6%).

L'étude de l'effet de l'extrait par solvant sur les juvéniles de *M. javanica* a montré une différence du taux de mortalité des juvéniles au niveau des solvants utilisés: l'éthanol constitue le solvant qui restitue la meilleure effi-

cacité, suivi par le méthanol et les solvants apolaires (hexane et chloroforme). Étant donné que les nématodes appartiennent à l'hydrobionte, il est évident que le principe actif doit être soluble dans les solvants polaires. Étant donné que l'extrait par l'éthanol présente la même efficacité que la fraction insoluble, ceci suggère que plusieurs principes actifs sont produits par la plante et qui sont impliqués dans la mortalité des juvéniles.

Al-Buratamani *et al.* (2005) ont montré que les composés les plus abondants, dans l'huile essentielle de *H. tuberculatum*, sont des monoterpènes. L'un de ces composés, le limonène qui représente 12,6% de l'huile essentielle, inhibe la reproduction de *M. javanica*, *M. incognita* et *Heterodera schachtii* Schmidt (Bauske *et al.*, 1994). D'autres terpénoïdes comme le linalool et le *p*-menth-2-en-1-ol (présents dans l'huile essentielle d'*H. tuberculatum*) ont été testés sur *Meloidogyne* sp. Les résultats obtenus ont montré que le menthol inhibe la formation de galles sur coton et le linalool agit sur les juvéniles de *M. javanica* (Bauske *et al.*, 1994) et de *M. incognita* (Leela *et al.*, 1992). Le linalool agit aussi sur les juvéniles d'*Anguina tritici* (Steinbuch) Chitw., de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb et d'*H. cajani* Koshi (Bauske *et al.*, 1994). Pour sa part, Al-Rehaily *et al.* (2001) ont identifié plusieurs alcaloïdes; comme la buchapine, la haplotubinone, l'haplotubine, la tubacétine et la tubasécine qui peuvent conférer à *H. tuberculatum* un effet toxique. La plupart de ces composés (comme le myrcène le limonène et l'alpha-pinène) sont présents chez d'autres plantes comme *Ruta graveolens* L. qui appartient à la même famille que *H. tuberculatum*. La rue a été le sujet de plusieurs recherches afin de démontrer son pouvoir nématocide. En effet, l'extrait de feuilles de *R. graveolens* réduit significativement l'éclosion des différentes espèces de *Meloidogyne* (Sasanelli et D'Addabbo, 1993; Sasanelli, 1997). Le limonène et le menthol, principaux constituants de l'huile essentielle d'*Hyptis suaveolens* (L.) Poit., induisent une mortalité maximale des juvéniles de *M. incognita* après 30 minutes d'exposition (Babu et Sukul, 1990).

En définitif, *H. tuberculatum* a beaucoup plus un effet nématostatique que toxique sur les juvéniles de *Meloidogyne javanica*. Ces principes actifs sur les nématodes présentent la particularité d'être polaires facilement solubles dans l'eau.

LITTÉRATURE CITÉE

- Al-Buratamani S.K.S., Fatope M.O., Marwah R.G., Onifade A.K. et Al Saidi S.H., 2005. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 107-112.
- Al-Rehaily A.J., Tawfeq A.A., Mohammad S.A., Al-Yahya M.A., El-Feray S., Hufford D.C. et McPhail A.T., 2001. Alkaloids from *Haplophyllum tuberculatum*. *Phytochemistry*, 57: 597-602.

- Al-Yahya M.A., Al-Rehaily A.J., Mohammed S.A., Mansourn S. et Farouk S., 1992. New alkaloid from *Haplophyllum tuberculatum*. *Journal of Natural Products*, 55: 899-903.
- Babu S.P. et Sukul N.C., 1990. Essential oils as nematocidal principles. *Environment and Ecology*, 8: 1118-1120.
- Bauske E.M., Rodriguez-Kabana R., Estaun V., Kloepper J.W. et Robertson D.G., 1994. Management of *Meloidogyne incognita* on cotton by use of botanical aromatic compounds. *Nematropica*, 24: 143-150.
- Deysson G., 1965. *La cellule végétale: structure et fonctionnement*. 2e édition. Société d'Édition d'Enseignement Supérieur, Paris, France, 269 pp.
- Gabe M., 1968. *Techniques histologiques*. Edition Masson et Cie, Paris, France, 1113 pp.
- Leela N.K., Khan R.M., Reddy P.P. et Nidiry E.S.J., 1992. Nematocidal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea*, 20: 57-58.
- Miller A.G., Morris M. et Stuart S., 1988. *Plants of Dhofar, the southern region of Oman: Traditional, Economic and Medical Uses*. The Office of the Adviser for Conservation of The Environment, Diwan of Royal Court, Sultanate of Oman, 242 pp.
- Mossa J.S., Al-Yahya M.A. et Al-Meshal I.A., 1987. *Medical Plants of Saudi Arabia*. Vol. 1. King Saud University Libraries, Riyadh, Saudi Arabia, 340 pp.
- Pelt J.M., 1999. Sécrétions végétales. Pp. 1205-1213. In: Dictionnaire de la botanique-Encyclopaedia Universalis. Editeur Albin Michel, Paris, France.
- Pottier-Alapetite G., 1979. *Flore de la Tunisie; Angiospermes-Dicotylédones *Apétales-Dialypétales. Première partie*. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, Tunis, Tunisie, 651 pp.
- Said O., Khalil K., Fulder S. et Azaizeh H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 251-265
- Sasanelli N., 1997. Perspectives for the use of nematocidal plants. *Revue Suisse d'agriculture*, 29 (3): 157-158.
- Sasanelli N. et D'Addabbo T., 1993. Effect of *Cineraria maritima*, *Ruta graveolens* and *Tagetes erecta* leaf and root extracts on Italian populations of *Meloidogyne* species. *Nematologia Mediterranea*, 21: 21-25.
- Stephan Z.A., 2004. Iraq. <http://www.fao.org/docrep/v9978e/v9978e0g.htm>
- Tabil M.A. et Walia K.K., 1996. Effect of two *Chenopodium* species on the hatching and mortality of *Meloidogyne incognita* juveniles. *Annals of Plant Protection Sciences*, 4: 8-15.
- Younis Haggag M., 1997. Herbal medicine in Egypt. Pp.45-55 In: Identification of Wild Food and Non-Food plants of the Mediterranean Region Workshop. Options Méditerranéennes, Série Seminaire Méditerranéennes (Heywood V.H., ed.). CIHEAM/MAICh, Chania, Greece.
- Zohair H.M., Hamed J.J., May A. et Ali Z.S., 1989. Insecticidal effects of *Haplophyllum tuberculatum* against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Crude Drug Research*, 27: 17-21.