

## ÉVALUATION DE L'EFFET DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES FEUILLES DU PEUPLIER NOIR (*POPULUS NIGRA* L.) SUR LE PUCERON NOIR DES AGRUMES *TOXOPTERA AURANTII* (BOYER DE FONSCOLOMBE, 1841)

ARAB Karim<sup>1\*</sup>, BOUCHENAK Ouahiba<sup>1</sup>, YAHIAOUI Karima<sup>1</sup>, LAOUFI R.<sup>2</sup>, BENHABYLES Narimen<sup>1</sup> et BENDIFALLAH Leila<sup>2</sup>

1. Laboratoire Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.

2. Laboratoire de Technologie Douce, Valorisation, Physico-chimie des Matériaux Biologiques et Biodiversité, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.

Reçu le 30/07/2018, Révisé le 24/11/2018, Accepté le 29/11/2018

### Résumé

**Description du sujet :** les pucerons comptent parmi les ravageurs des cultures les plus nuisibles. Le présent travail tente de valoriser l'utilisation des extraits d'une plante médicinale pesticide en lutte biologique.

**Objectifs :** l'objet de notre travail a porté sur l'évaluation de l'effet aphicide de l'extrait méthanolique des feuilles de l'espèce *Populus nigra* L., utilisé traditionnellement contre le Puceron noir des agrumes (*Toxoptera aurantii*).

**Méthodes :** l'extraction est faite par macération dans le méthanol. La teneur en polyphénols a été déterminée par spectrophotomètre en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Enfin, le test aphicide est réalisé par contact.

**Résultats :** le rendement en extrait méthanolique enregistré est de 71,35%, avec une concentration de 0,511mg EAG/mg. Le TL<sub>50</sub> est obtenu avec les doses D1 (10,47 h) et D2 (15,13h). La meilleure valeur de la DL<sub>50</sub> est enregistrée à 96h heures, soit 281,51mg/ml. Enfin, l'analyse de la variation temporelle a fait ressortir une diminution très hautement significative (p<0,001) de la toxicité de l'extrait enregistrée en fonction des différentes dilutions de la solution mère.

**Conclusion :** l'extrait méthanolique de *Populus nigra* L. a montré une certaine toxicité envers *Toxoptera aurantii*, ce qui favorise son intégration en industrie des pesticides.

**Mots clés :** *Populus nigra*, polyphénols, activité aphicide, *Toxoptera aurantii*, TL<sub>50</sub> et DL<sub>50</sub>.

## EVALUATION OF THE EFFECT OF THE METHANOLIC EXTRACT OF BLACK POPLAR (*POPULUS NIGRA* L.) ON THE BLACK CITRUS APHID *TOXOPTERA AURANTII* (BOIS DE FONSCOLOMBE, 1841)

### Abstract

**Description of the subject:** aphids are among the pests of the most harmful crops. This work attempts to promote the use of extracts of a pesticide medicinal plant in biological control.

**Objectives:** The aim of our work was to evaluate the aphicidal effect of the methanolic extract of the leaves of the species *Populus nigra* L., traditionally used against the black citrus aphid (*Toxoptera aurantii*).

**Methods:** The extraction is made by maceration in methanol. The content of polyphenols is determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent. Finally, the aphicide test is performed by contact.

**Results:** the yield of methanolic extract recorded is 71.35%, with a concentration of 0.511 mg EAG / mg. LT<sub>50</sub> is obtained with doses D1 (10.47 h) and D2 (15.13 h). The best value of the LD<sub>50</sub> is recorded at 96h hours (281.51mg / ml). Finally, the analysis of the temporal variation showed a very highly significant decrease (p<0.001) in the toxicity of the extract recorded as a function of the different dilutions.

**Conclusion:** The methanolic extract of *Populus nigra* L. has shown some toxicity towards *Toxoptera aurantii*, which favors its integration into the pesticide industry.

**Keys words:** *Populus nigra*, polyphenols, aphicide activity, *Toxoptera aurantii*, LT<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub>.

\*Auteur correspondant: ARAB Karim, E-mail: arabkarim3@gmail.com

## INTRODUCTION

Dans les milieux agricoles, les ravageurs des cultures peuvent causer des dégâts très importants [1]. Parmi les ravageurs des cultures, les pucerons infestent la majorité des cultures, et constituent donc un des groupes d'insectes les plus nuisibles en région tempérées [2]. Ils sont d'autant plus graves, car ces insectes sont de véritables vecteurs de virus végétaux [3].

L'utilisation répétée des produits chimiques a causée l'apparition d'une certaine résistance des pucerons, ce qui risque d'induire des échecs aux programmes de lutte. Selon Kogan [4], des méthodes alternatives à la lutte chimique comme la lutte physique, la lutte culturale et la lutte biologique sont appliquées. Les plantes pesticides sont largement disponibles et peuvent remplacer les pesticides synthétiques. Elles sont selon Amoabeng *et al.* [5] et Mkenda *et al.* [6] sans danger pour l'environnement, et dans la plus part des cas moins toxiques pour les insectes utiles. Cependant, plusieurs plantes dotées d'un pouvoir insecticide reste rarement utilisées. Le Peuplier noir est une espèce largement distribuée et dont la biologie a fait l'objet de plusieurs travaux de son importance écologique et économique [7 et 8]. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur l'évaluation de son pouvoir aphicide. Ce manque d'information nous a poussés à valoriser l'intégration du Peuplier dans le domaine de lutte biologique. Le travail consiste à tester une stratégie de lutte biologique, basée sur l'utilisation d'un extrait méthanolique du Peuplier noir contre le Puceron noir des agrumes *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe, 1841) par contact.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

La récolte des feuilles du Peuplier noire (*Populus nigra* L.), a été faite au mois d'avril 2018 dans la willaya Boumerdes. Le choix de ce matériel végétal repose sur la disponibilité de la plante en Algérie et sur son usage en pharmacopée traditionnelle local.



Figure 1: Feuilles du Peuplier noir

### 2. Matériel animal

L'effet insecticide de l'extrait phénolique des feuilles de *Populus nigra* a été testé sur *Toxoptera aurantii*. Le choix de cette espèce est justifié par l'ampleur des dégâts causés sur les agrumes. Au total 380 pucerons ont été récoltés sur le Pittospore du Japon (*Pittosporum tobira* Banks (Gaertn, 1788)) (Fig. 2).



Figure 2 : Population de *Toxoptera aurantii*

### 3. Préparation du matériel végétal

Les feuilles de *Populus nigra* ont été récoltées au mois d'avril (2018) à Boumerdes. La région est située sur le littoral centre du pays, et dispose d'une façade maritime de 100 Km. Elle est limitée par la mer méditerranée au Nord, la wilaya de Bouira au Sud, la wilaya d'Alger à l'Ouest et la wilaya de Tizi-Ouzou à l'Est.

Les échantillons du Peuplier noir ont été lavés, séchés à 40°C pendant 3 jours, puis broyées à l'aide d'un broyeur à hélice, afin d'augmenter la surface du contact avec le solvant d'extraction utilisé. Enfin, la poudre obtenue est conservée à l'abri de l'air et de l'humidité dans des bocaux en verre hermétiquement fermés.

#### 4. Extraction des polyphénols totaux

La méthode utilisée consiste en une macération de la poudre végétale dans une solution méthanolique. C'est une méthode très utilisée pour extraire les métabolites secondaires. La méthode adaptée dans ce travail est celle décrite par Owen et Johns [9]. L'extrait méthanolique a été préparé à partir de 40g de broyat des feuilles macérés dans 100ml de méthanol. L'ensemble est incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 72h, sous agitation magnétique. L'extrait a été filtré à l'aide d'un papier filtre Wattman, puis évaporé à l'étuve pendant à 45°C et, enfin conservé à 4°C et à l'abri de la lumière. Le rendement d'extrait a été calculé par la formule suivant :

$$R (\%) = \frac{M - M_0}{M_T} \times 100$$

Avec : R% : rendement de la matière extraite ; M : masse du bécher et extrait ;  $M_0$  : masse de bécher vide ;  $M_T$  : masse totale de la poudre végétale utilisée dans l'extraction.

#### 5. Dosage spectral des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique est estimée par la méthode de Folin –Ciocalteu's décrite par Singleton et Ross [10]. Le test consiste à mélanger une quantité de 0,5 ml de l'extrait avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu (10 fois dilué) et 1ml de carbonate de sodium à 20 % ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). L'ensemble est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 60 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 760nm. La quantification des polyphénols a été déterminée en fonction d'une courbe d'étalonnage, réalisée par l'acide gallique à différentes concentrations, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligrammes

équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche.

#### 6. Activité larvicide de l'extrait polyphénolique contre le puceron noir *Toxoptera aurantii*

Le mode de traitement adopté est une application par contact. L'étude consiste à déterminer les taux de mortalité des pucerons chaque 24 heures, pendant 4 jours. Ainsi, différentes doses (D1, D1/2, D1/4, D1/8 et D1/16) correspondant chacune à 100, 50, 25, 12,5 et 6,25% successivement ont été préparé. La méthodologie est inspirée des tests de sensibilité normalisés par l'Organisation Mondiale de la Santé, pour des insecticides utilisés en campagnes de lutte [11]. Les tests sont réalisés dans des boîtes de Pétri contenant chacune 1ml de chaque solution et 20 pucerons. Le même nombre de pucerons est placé dans deux boîtes de Pétri témoin contenant respectivement 1ml du solvant d'extraction et 1ml d'eau distillée. Pour chacune des concentrations de l'extrait ainsi que pour les témoins, trois répétitions sont effectuées. Les mortalités ont été calculées après un temps de contact de 24h, 48h, 72h et 96 heures.

##### 6.1. Traitement des pucerons

Les solutions préalablement préparées ont été déposées sur une rondelle de papier filtre (Whatman n°1) de 9 cm de diamètre (soit 63,62 cm<sup>2</sup> de surface) posée dans une boîte de Pétri, puis laissée à la température ambiante pour permettre l'évaporation complète du solvant de dilution. Le volume appliqué est de 16 µl/cm<sup>2</sup>. Pour le témoin, la rondelle était traitée par méthanol ou par l'eau distillée. Pour ce test, un lot de 20 pucerons a été introduit dans chaque boîte de Pétri contenant une rondelle traitée, puis les boîtes ont été immédiatement refermées. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque dose et les insectes morts ont été comptés toutes les 24 heures pendant quatre jours.

##### 6.2. Calcul des taux de la mortalité

Le pourcentage de mortalité des pucerons (MO) traités par les différents extraits est calculé par la formule suivante :

$$MO = \frac{Nbr\text{individus}\text{morts}}{Nbr\text{total}\text{'individus}} \times 100$$

Les mortalités observées ont été corrigées à l'aide de la formule d'Abbott (1925), en tenant compte des mortalités naturelles dans les lots témoins.

### 6.3. Calcul de $DL_{50}$ et $TL_{50}$

La dose létale 50 ( $DL_{50}$ ) est calculée à partir de la droite de régression des probits  $Probits = f(\log \text{ dose})$  correspondants aux pourcentages des mortalités corrigées en fonction des logarithmes des doses de traitement. La table des probits utilisée est celle de Cavelier [12]. Pour calculer le  $TL_{50}$ , les temps ont été transformés en logarithme décimaux et les valeurs de mortalité en probits en se servant de la table des probits.

### 6.4. Evaluation statistique

Les résultats obtenus ont été statistiquement analysés à l'aide d'une analyse de variance à un facteur en utilisant le logiciel STATISTICA.

Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  Erreur Standards à la Moyenne. Le seuil de signification a été fixé à  $p < 0,05$ .

## RÉSULTATS

### 1. Rendement d'extraction des polyphénols

L'extrait des polyphénols obtenu, par macération de la poudre des feuilles de Peuplier noire (*Populus nigra*) dans le méthanol, est de couleur verte foncée. Le rendement enregistré est de 71,35%.

### 2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La détermination de la concentration des polyphénols nécessite préalablement l'établissement d'une courbe d'étalonnage en utilisant comme standard l'acide gallique (Fig. 3).

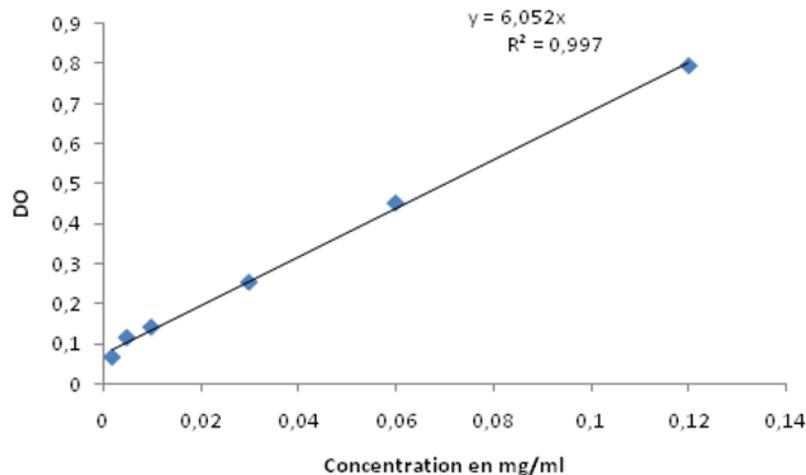


Figure 3 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

La concentration des polyphénols, en mg EAG/mg de matière végétale, de l'extrait brut et des différentes dilutions est portée sur le tableau 1.

Tableau 1: Teneur en polyphénols en mg EAG/mg de matière végétale des différentes doses testées.

Dose	Concentration (mg EAG/mg)
Solution mère (sm)	0,511
1/2	0,323
1/4	0,318
1/8	0,229
1/16	0,125

Les résultats de la présente étude indiquent des concentrations en polyphénols totaux comprises entre 0,511 mg EAG/mg (solution mère) et 0,125 mg EAG/mg (D1/16).

### 3. Activité insecticide des polyphénols de l'extrait méthanolique du Peuplier noire (*Populus nigra* L.)

Les taux moyens de mortalité corrigée exprimés en moyenne  $\pm$  ESM sont mentionnés sur la figure 4. D'après le graphique, une diminution de pourcentage de mortalité en fonction des différentes doses utilisées est observée.

La toxicité la plus élevée est notée pour la dose D1 (70%). La dose D2 a engendrée un pourcentage de mortalité de 58,33%. C'est justement la dose qui va nous servir pour calculer le  $TL_{50}$ .

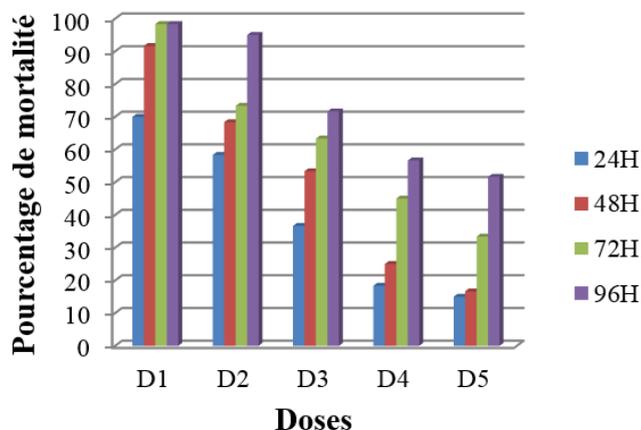


Figure 4 : taux de mortalité corrigée chez *Toxoptera auantii* traité par contact avec les polyphénols de *Populus nigra*.

### 3.1. Calcul du $TL_{50}$

Les équations des droites de régression obtenues nous permettent d'avoir un aperçu sur l'efficacité de l'extrait polyphénolique au travers de leur  $TL_{50}$  (Tableau 2).

Tableau 2 : Équations des droites de régression, et les valeurs des  $TL_{50}$ .

Doses	Equations	$TL_{50}$
D1	$y=0,67x+4,32$	10,47h
D2	$y=2,83x+1,65$	15,13h
D3	$y=1,74x+2,22$	38,01h
D4	$y=1,64x+1,75$	95,49h
D5	$y=0,84x+4,07$	469,77h

L'analyse des  $TL_{50}$  a montré des valeurs de mortalité de 50% de la population de Pucerons noire *Toxoptera auantii* à des temps précis, selon la concentration des polyphénols. Le  $TL_{50}$  le plus probable est obtenu avec les doses D1 et D2, soit respectivement 10,47 et 15,13h.

### 3.2. Calcul de la $DL_{50}$

Les valeurs des  $DL_{50}$  obtenues sont notées sur le tableau 3. Le calcul des concentrations létales  $DL_{50}$  des Pucerons noirs soumis à l'effet des polyphénols des feuilles du Peuplier noir a révélé l'existence d'une faible activité en termes de toxicité. La meilleure valeur est enregistrée à 96h heures, soit 281,51mg/ml.

Tableau 3 : équations des droites de régression, et valeurs des  $DL_{50}$

Temps	Equations	$DL_{50}$
24h	$Y=1,35x+0,92$	1019,53 mg/ml
48h	$Y=1,79x+0,11$	541,13mg/ml
72 h	$Y=2x+0,11$	364,25 mg/ml
96h	$Y=2,29x+0,61$	281,51 mg/ml

### 3.3. Variation temporelle de la mortalité des larves de *Toxoptera aurantii* en fonction des doses

L'analyse de la variance du taux de mortalité en fonction des doses et du temps a montré une différence très hautement significative pour les deux facteurs ( $p=0,000$  ;  $p<1\%$ ) (Tableau 4).

Tableau 4 : Variation temporelle de la mortalité des pucerons noir en fonction des doses et du temps

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F	P
Dose	61048,61	5	12209,72	137,25	0,00
jours	8412,50	3	2804,16	31,52	0,00

L'analyse de la variation temporelle à fait ressortir une diminution de la toxicité de l'extrait enregistrée en fonction des différentes dilutions de la solution mère. La dose D1 s'est révélé la plus toxique, avec un pourcentage de mortalité de 95%. Elle est suivie par la dose D2 (75%), la dose D3 (60%), la dose D4 (35%) et la dose D5 (28 %) (Fig. 6).

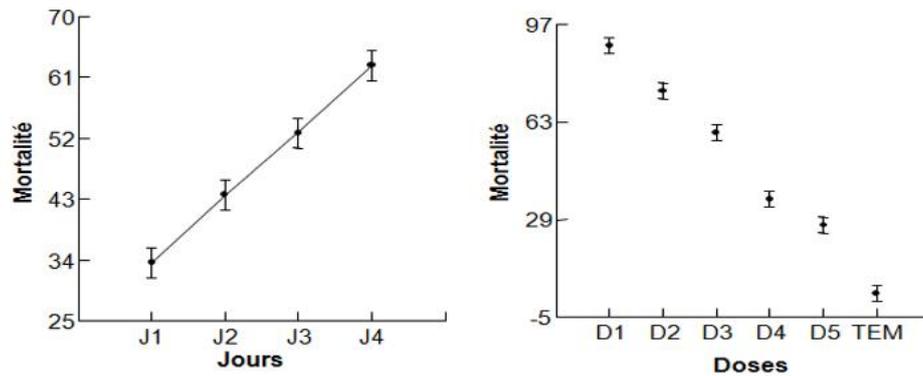


Figure 6 : variation temporelle du pourcentage de mortalité en fonction du temps

## DISCUSSION

Debbache-Benaidia *et al.* [13], en étudiant des échantillons de *P. nigra* récoltés en mars de la forêt de Tizi Neftah (Amizour, Béjaia), ont obtenus des concentrations plus faibles en polyphénols totaux ( $0,517 \pm 4,56$  mg EC/mg), flavonoïdes ( $0,136 \pm 0,34$  mg EQ/mg) et tannins ( $0,228 \pm 6,90$  mg EAG/mg) à partir d'un extrait éthanolique de *P. nigra*. Cette différence peut être due à la méthode d'extraction [14] et la région de récolte. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les teneurs en composés phénoliques d'une plante sont étroitement liées à la complexité de ce groupe de composés, aux méthodes d'extractions et à la concentration du solvant utilisé. En effet, plusieurs contraintes rendent difficile l'extraction des composés phénoliques d'un tissu végétal. La présence dans les cellules végétales de plusieurs types d'enzymes est susceptible de modifier les composés phénoliques, en particulier les polyphénols oxydases et les glycosidases. De plus, la méthode de séchage de la plante peut être un facteur de détérioration de la structure des polyphénols [15]. D'autres paramètres peuvent influencer le taux et la nature des composés phénoliques, notamment la nature du solvant, la taille des particules et le temps d'extraction [16]. Enfin, selon Regnault-Roger *et al.* [17] le dosage des polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu donne une évaluation brute de tous les composés d'un extrait. Il n'est donc pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé.

Dans nos conditions expérimentales, l'extrait méthanolique des feuilles du Peuplier noir a montré des effets très variables sur la mortalité des formes aptères de *Toxoptera aurantii*.

La toxicité des composés phénoliques envers les insectes a été signalée par Raymond *et al.* [18]. D'après ces derniers, ces métabolites secondaires riches en groupement fonctionnels provoquent le plus souvent une perturbation de la motricité naturelle de l'insecte. Selon Raymond *et al.* [18] et Vanden Borre *et al.* [19], les tanins présentent un effet toxique direct pour plusieurs insectes ravageurs, en agissant sur leur croissance, leur développement et leur fécondité.

## CONCLUSION

Le test aphicide a révélé une diminution de pourcentage de mortalité en fonction des différentes doses utilisées. La toxicité la plus élevée est notée pour la dose D1. Le  $TL_{50}$  le plus probable est obtenu avec les doses D1 et D2, soit respectivement 10,47 et 15,13 h. La meilleure valeur de la  $DL_{50}$  est enregistrée à 96 h, soit 281,51 mg/ml. Il serait donc nécessaire d'évaluer l'effet aphicide par d'autres méthodes : ingestion et inhalation *in vitro* et *in vivo*.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Daily G.C., Ehrlich P.R. et Alberti M. (1996). Managing earth's life support systems: The game, the players, and getting everyone to play. *Ecological Applications* (6): 19-21.
- [2]. Dedryver C.A. (2010). Les pucerons: biologie, nuisibilité, résistance des plantes. *Journées Techniques Fruits et Légumes Biologiques* – 14 et 15 déc. 2010 à Angers.
- [3]. Ronzon B. (2006). Biodiversité et lutte biologique : Comprendre quelques fonctionnements écologiques dans une parcelle cultivée, pour prévenir contre le puceron de la salade. Certificat d'Etude Supérieures en Agriculture Biologique, ENITA de Clermont Ferrand.

- [4]. **Kogan M., (1998).** Integrated Pest Management : Historical Perspectives and Contemporary Developments. *Annual review of entomology*, 43:243-270.
- [5]. **Amoabeng B.W., Gurr G.M., Gitau C.W., Munyakazi L. et Stevenson P.C., (2013).** Tri-trophic insecticidal effects of African plants against cabbage pests. *PLoS One*. 8(10): e78651.
- [6]. **Mkenda P., Mwanauta R., Stevenson P.C., Ndakidemi P., Mtei K. et Belmain S.R. (2015).** Extracts from field margin weeds provide economically viable and environmentally benign pest control compared to synthetic pesticides. *PLoS One*. 10(11): e0143530.
- [7]. **Bradshaw RD., Heilman P.E., Hinckley T.M., et Stettler R. F., (1996).** *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, Ottawa: NRC Research Press, 542 p.
- [8]. **Peterson E.B. et Peterson N.M. (1992).** *Ecology, management and use of aspen and balsam poplar in the Prairie Provinces*, Canada, northern forestry centre, special report 1, 270p.
- [9]. **Owen P.L. et Johns T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 149-160.
- [10]. **Singleton V.L. et Ross A. (1965).** Colorimetric of total phenolcs with. Phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagent. *American journal of Ecology and Viticulture*, 16: 144-158.
- [11]. **OMS (1963).** Méthode à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des larves de moustiques aux insecticides. Résistance aux insecticides et lutte contre les vecteurs. Treizième rapport du comité OMS d'experts des insecticides, Genève : OMS, Série de Rapport Technique, 265, 55-60.
- [12]. **Cavelier A. (1976).** *Cours phytopharmacie*. Ed. I.N.R.A., Alger, tome 1, 90p.
- [13]. **Debbache-Benaida N., Atmani-Kilani D., Schini-Keirith V.B., Djebbli N. et Atmani Dj. (2013).** Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 3(9): 697-704.
- [14]. **Lee J.Y., Chang E.J., Kim H.J., Park J.H. et Choi S.W. (2003).** Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. *Archives of pharmacal research*, 25(3): 313- 319.
- [15]. **Ribéreau-Gayon P. (1968).** *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Dunod, Paris, 254p.
- [16]. **William P.J. et Douglas Kinghorn A. (2006).** Extraction of plant secondary metabolites. In Satyajit D.S., Alexander I.G. et Zahid L.(Eds). Humana press Totowa, New Jersey, 335p.
- [17]. **Regnault-Roger C., Philogène B.J.R. et Vincent C. (2008).** *Biopesticides d'origine végétale*. Ed. Tec et Doc, Paris, 546p.
- [18]. **Raymond L.A., André VM., Cepeda C., Gladding CM., Milnerwood AJ. et Levine MS. (2011).** Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience*, 15 (198): 252-273.
- [19]. **Vanden Borre G., Smaghe G. et Van Damma E.J. (2011).** Plant lectins as de fense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, 72(13): 1538-1550.