HAL open science

Effet de différents paramètres de l'environnement sur le déterminisme biochimique d'exudats racinaires de Crotalaria spp. : application à la nématorégulation en production végétale

Mylène L'Etang

To cite this version:

Mylène L'Etang. Effet de différents paramètres de l'environnement sur le déterminisme biochimique d'exudats racinaires de Crotalaria spp. : application à la nématorégulation en production végétale. Sciences agricoles. Université des Antilles et de la Guyane, 2012. Français. NNT : . tel-02811382

HAL Id: tel-02811382

https://hal.inrae.fr/tel-02811382v1

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

Ecole doctorale pluridisciplinaire
UR1321, ASTRO Agrosystèmes Tropicaux

THESE

présentée par

Mylène L'ETANG

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université des Antilles et de la Guyane

Discipline/Spécialité : Sciences Agronomiques, et Biotechnologies agro-alimentaires

Effet de différents paramètres de l'environnement sur le déterminisme biochimique d'exsudats racinaires de *Crotalaria spp.* : Application à la nématorégulation en production végétale

Thèse soutenue le 3 décembre 2012 devant le jury compose de :

M. BENKEBLIA Noureddine	Full Professor, University of West-Indies	Rapporteur
M. FILS-LYCAON Bernard	CR/HDR, INRA	Rapporteur
Mme ABAUL Jacqueline	Jacqueline Pr UAG, Directrice Ecole Doctorale UAG	Présidente de Jury
M. JOSEPH Henry	Dr. - Directeur Entreprise Phytobokaz	Examinateur
Mme LORANGER-MERCIRIS Gladys	MCF/HDR, Université des Antilles et de la Guyane (Examinatrice)	Examinatrice
M OZIER-LAFONTAINE Harry	Dr, INRA Antilles Guyane	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Il est toujours délicat de remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à l'aboutissement de quatre ans de travaux de recherche. Que ceux qui ne sont pas mentionnés ne m'en tiennent pas rigueur.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Harry Ozier-Lafontaine qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris
.
Merci également à mes deux co- directeurs de thèse M. Patrick Quénéhervé et M. Amadou Bâ qui m'ont transmis nombre de fondements conceptuels et techniques indispensables au bon déroulement de ma thèse, et qui, malgré leur éloignement, se sont toujours montrés disponibles et attentifs à mes requêtes.

Que les deux rapporteurs de ma thèse, le Professeur Noureddine Benkeblia et le chargé de recherches Bernard Fils-Lycaon soient ici remerciés d'avoir accepté cette lourde charge.

Ensuite, que serait cette thèse sans la collaboration de toute une équipe qui m'a suivi du début à la fin, sans relâche, et qui s'est montrée au quotidien d'une grande réactivité. Je tiens à remercier chaudement Chantal Fléreau qui a toujours été à mes côtés et qui fut pour moi une excellente collègue de travail, mais aussi une amie et confidente dans les moments difficiles. Sans elle, le volet nématologique n'aurait pas pu être mené à terme. J'ai une pensée toute particulière pour Lucienne Desfontaines, Directrice du Laboratoire d'analyses chimiques, qui a joué un rôle majeur dans la mise au point méthodologique de la récolte des exsudats racinaires, et leur caractérisation biochimique, et ce, malgré sa charge importante de travail. Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance. Merci également à l'ensemble de l'équipe technique qui m'a beaucoup aidé pour la mise en place de mon dispositif expérimental, et de toute sa chaîne de pilotage. Leur savoir faire et leur implication ont été décisifs pour l'élaboration des différents modules indispensables à la réalisation de ma thèse. Que Thierry Bajazet, Nazaire Robin, Jean-Baptiste Nanette et Sylvestre Jacoby-Koali, Alfred Venthou- Dumaine, trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

J'ai une pensée particulière pour le Docteur Takuro Shinano du National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, au Japon, grâce à qui j'ai pu réaliser mes analyses en GC-MS -sous la bienveillance du Pr. Noureddine Benkeblia (UWI), permettant ainsi une évolution significative de l'interprétation de mes résultats.

Enfin, merci d'une façon générale à l'ensemble des personnes travaillant sur le site de l'INRA de Duclos que j'ai sollicité de façon ponctuelle ou de manière plus répétitive, et qui ont toujours été à l'écoute, et répondu favorablement à mes requêtes.

Pour finir je remercie l'ensemble de ma famille qui m'a soutenue durant toute cette période, et qui m'a permis de garder le cap dans les moments difficiles.

A TOUS MERCI !

RESUME

Dans le cadre de la promotion de systèmes de culture alternatifs à moindres intrants chimiques, des études sur l'introduction de plantes de service ayant vocation à réduire l'usage des pesticides et engrais azotés mobilisent un effort de recherche considérable. Dans le cadre de la production bananière pour laquelle la nuisibilité causée par les nématodes phytoparasites constitue l'une des principales contraintes, une des principales alternatives à l'utilisation de nématicides chimiques repose sur l'usage raisonné en rotation ou en association culturale de plantes de service à propriétés nématorégulatrices.
Parmi les espèces candidates, celles du genre *Crotalaria spp.* ont largement été étudiées en raison de leur aptitude à contrôler les nématodes phytoparasites. Une méta-analyse révèle cependant que même si de nombreux auteurs s'accordent à reconnaître les propriétés allélopathiques des plantes de cette espèce, ils sont également enclins à reconnaître la forte variabilité d'expression de ces propriétés vis-à-vis du contrôle des nématodes selon les situations expérimentées. L'objectif de ce travail repose sur la compréhension du déterminisme biochimique des exsudats.
La stratégie expérimentale mise en œuvre a consisté à tester en conditions contrôlées le comportement biochimique des exsudats racinaires de deux espèces de crotalaires (*C. retusa, C. spectabilis*) et d'une espèce sensible, le bananier dessert (*Musa spp.*) en fonction i) de conditions biotiques variées - i.e. présence ou non de nématodes (*Radopholus similis* et *Meloidogyne arenaria*), et présence ou non de mycorhizes-, ii) de conditions abiotiques contrastées – i.e. utilisation d'un sol naturel *vs.* substrat neutre, ajout ou non d'engrais chimique. La méthodologie innovante des « plantes à traire » (Brevet INRA) a été requise pour pouvoir travailler sur les exsudats racinaires des plantes conditionnées plutôt que sur des lixiviats, comme réalisé dans des expérimentations antérieures.
Les résultats obtenus en spectrophométrie visible montrent que la présence ou l'absence de nématodes affecte de manière importante les profils biochimiques des plantes étudiées. En présence du nématode *M. arenaria* les profils biochimiques des deux crotalaires sont également modifiés. Des biotests réalisés à l'aide des exsudats racinaires conditionnés au préalable par les modifications biotiques ont permis de démontrer l'effet nématostatique des crotalaires. Des analyses biochimiques en GC-MS mettent en évidence de manière plus précise des molécules actives mises en jeu sous différentes modalités biotiques et abiotiques.
Ces recherches, de portée générique, permettront de mieux comprendre les conditions de l'environnement qui régulent les profils biochimiques des exsudats racinaires des crotalaires et par extension, seront applicables aux recherches menées sur d'autres plantes de service candidates. Ceci aidera, à terme, à définir les conditions environnementales à réunir, pour orienter de manière optimale les effets allélopathiques dans une perspective de nématorégulation naturelle.

Mots clés : Allélopathie, *crotalaria spp.*, intensification écologique, nématodes, métabolites secondaires, plantes de service, sol.

ABSTRACT

As part of the promotion of alternative cropping systems at lower chemical inputs, studies on the introduction of cover crops designed to reduce the use of pesticides and nitrogen fertilizers mobilize a considerable research effort. Under banana production for which the harmfulness caused by plant-parasitic-nematodes is one of the main constraints, one of the main alternatives to the use of chemical nematicides is based on the rational use in rotation or intercropping of cover crops to protect crops from plant-parasitic-nematodes.

Among the candidate species, the species from the genus of *Crotalaria spp.* have been widely studied because of their ability to control plant parasitic-nematodes. A meta-analysis reveals that although many authors agree allelopathic properties of these species, they are also likely to recognize the high variability of expression of these properties vis-à-vis the control of nematodes according to the situations experienced. The objective of this work is focused on the understanding of the biochemical determinism of root exudates under environment biotic and abiotic variations.

The experimental strategy was to test under controlled conditions the biochemical behavior of root exudates of two species of crotalarias (*C. retusa, C. spectabilis)* and a susceptible species, the dessert banana crop (*Musa spp.)* with i) modification of biotic conditions - ie presence or absence of nematodes (*Meloidogyne arenaria* and *Radopholus similis*), and presence or absence of mycorrhiza- ii) contrasting abiotic conditions - ie using a natural soil vs. neutral substrate, whether to add fertilizer. The innovative methodology of "milking plants" (Patent INRA) was required in order to work on the root exudates of plants packed rather than leachate, as done in previous experiments.

The results obtained in visible spectrophotometry show that the presence or absence of nematodes affect significantly the biochemical profiles of the studied plants. In the presence of nematode M. arenaria biochemical profiles of both crotalarias are also changed. Bioassays conducted using root exudates conditioned in advance by biotic changes have demonstrated the effect of nématostatique crotalarias. Biochemical GC-MS demonstrate more clearly active molecules that are involved in various biotic and abiotic conditions.

This research, generic scope, to better understand the environmental conditions that regulate biochemical profiles of root exudates crotalarias and by extension, will apply to research on other plants service candidates. This will ultimately define the environmental conditions to meet, to guide optimal allelopathic effects from the perspective of natural nématorégulation.

Keywords: Allelopathy, cover crops, *Crotalaria spp.,* ecological intensification, nematodes, secondary metabolites compounds.

Sommaire

Introduction générale **11**

Partie I : Analyse bibliographique **16**
I.1. Allélopathie et nématorégulation ***16***
I.1.1. L'allélopathie directe ou spécifique et la nématorégulation *18*
I.1.2. L'allélopathie globale ou indirecte et la nématorégulation *19*
I.2. Les métabolites secondaires ***20***
I.2.1. Toxicité reconnue aux trois grandes familles de molécules chez les plantes *23*
I.2.2. Mode d'action des métabolites secondaires sur les nématodes *29*
I.3. Le sol : réceptacle de la vie souterraine ***30***
I.3.1. Le substrat sol *30*
I.3.2. La rhizosphère et les exsudats racinaires *30*
I.4. Les nématodes phytoparasites ***32***
I.4.1. Les différents groupes de nématodes *32*
I.4.2. Stratégies de lutte contre les différents types de nématodes *36*
I.5. Les plantes de service à propriétés nématorégulatrices ***39***

Partie II : Etat de l'art sur les crotalaires - cadrage du sujet de recherche **43**
II.1. Inventaire des propriétés biochimiques des crotalaires ***44***
II.1.1. Méthodologie d'analyse *44*
II.1.2. Articles publiés de 1939 à 2012 ..... *45*
II.1.3. Analyses biochimiques réalisées sur les crotalaires *46*
II.1.4. Molécules présentes chez les crotalaires et localisation dans la plante *47*
II.2. Méta-analyse du système « crotalaires / nématodes » ***48***
II.2.1. Méthodologie d'analyse des interactions « crotalaires/nématodes » *48*
II.2.2. Evolution de la thématique crotalaires/nématodes *50*
II.2.3. Crotalaires étudiées pour leurs effets nématorégulateurs *51*
II.2.4. Réponse nématorégulatrice des principales crotalaires envers les différents types de nématodes selon différents modes expérimentaux *51*
II.3. Démarche de recherche ***57***
II.3.1. Cadrage de la question de recherche *57*
II.3.2. Objectif scientifique, hypothèses de travail, et stratégie expérimentale *59*

Partie III : Matériels et méthodes **65**
III.1. Conception du dispositif expérimental ***65***
III.2. Optimisation du dispositif expérimental ***66***
III.2.1. Choix du matériel végétal *66*
III.2.2. Choix du stade de prélèvement des exsudats racinaires, et choix des substrats *70*
III.2.3. Préparation des substrats *71*
III.2.4. Choix de la composition symbiotique *73*
III.2.5. Choix du nombre de plantes par pot pour la production d'exsudats racinaires *74*
III.2.6. Extraction des exsudats racinaires par la technique des plantes à traire (PAT) *75*

III.2.7. Choix des techniques biochimiques 80
III.2.8. Choix des nématodes étudiés 88
III.2.9. Mise en place des biotests 92
III.2.10. Récapitulatif du dispositif expérimental et des conditions testées 95

Partie IV : Résultats 99
IV. 1. Résultats des dosages spectrophotométriques en fonction des différentes conditions expérimentales 99
IV.1.1. Effet du substrat sur la composition biochimique des exsudats racinaires 99
IV.1.2. Effet du mode de fertilisation sur la composition biochimique des exsudats racinaires 100
IV.1.3. Effet de la présence de nématode sur la composition biochimique des exsudats racinaires 102
IV.2. Les biotests 105
IV.2.1. Etude en conditions contrôlées de l'effet des exsudats racinaires sur les nématodes étudiés 105
IV.3. Analyse des profils biochimiques avec la GC-MS 110
IV.3.1. Analyse quantitative 110
IV.3.2. Analyse qualitative 114

Partie V : Discussion génerale 116
V.1. Analyse des résultats en spectrophotométrie visible 116
V.1.1. Effet du type de substrat et de la fertilisation chimique sur la composition biochimique des exsudats racinaires 116
V.1.2. Effet de la présence ou de l'absence de nématodes et de champignons mycorhiziens sur la composition biochimique des exsudats racinaires 118
V.2. Analyse des résultats en GC-MS 119
V.3. Analyse croisée des données biochimiques et des résultats des biotests 120
V.3.1. Analyse croisée des biotests et de la spectrophométrie visible 120
V.3.2. Analyse croisée des biotests et de la GC-MS 123

Partie VI : Conclusions et perspectives 126

Partie VII : Bibliographie 130

Table des figures

Figure 1. Traits généraux de l'allélopathie (d'après Walker et al., 2003). Représentation des interactions complexes médiées par les exsudats racinaires, qui ont lieu dans la rhizosphère entre les racines des plantes, et d'autres organismes (les organismes ne sont pas représentés à l'échelle ; QS = quorum sensing)..... 17

Figure 2. Cycle de développement des nématodes endoparasites migrateurs..... 33

Figure 3. Cycle de développement des nématodes endoparasites et semi-endoparasites sédentaires (d'après Lambert et Bekal, 2002)..... 35

Figure 4. Cycle de développement des nématodes ectoparasites (d'après Lambert et Bekal, 2002)..... 36

Figure 5. Exemple de crotalaire poussant en milieu naturel. 43

Figure 6. Evolution du nombre d'articles publiés, traitant de l'analyse biochimique des crotalaires. 45

Figure 7. Crotalaires dont la fréquence d'étude est supérieure à 8 (~20% de l'analyse totale). 46

Figure 8. Molécules étudiées chez les crotalaires. 47

Figure 9. Localisation des pyrrolizidines alcaloïdes dans la plante. 48

Figure 10. Localisation des flavonoïdes dans la plante..... 48

Figure 11. Evolution des publications (articles ACL) sur la thématique « crotalaires/nématodes » de 1928 à 2012. 50

Figure 12. Nombre d'expérimentations réalisées pour différentes espèces de crotalaires sur la période allant de 1928 à 2012. 51

Figure 13. Analyse du comportement de quatre variétés de crotalaires en présence de différents types de nématodes, selon trois modalités expérimentales..... 55

Figure 14. Facteurs biotiques, abiotiques, et facteurs techniques pouvant affecter la composition biochimique des plantes (d'après Mazid et al., 2011). 58

Figure 15. Le système « CROSYNERS ». 60

Figure 16. Système CRETS de récupération des exsudats racinaires. 61

Figure 17. Photos de *C. retusa* (feuille, tige, gousses, fleurs, graines). 67

Figure 18. Photos de *C. spectabilis* (feuille, tige, fleurs, graines)..... 68

Figure 19. Photo de bananier du genre *Musa spp.* 69

Figure 20. Verse de bananier causée par la présence de nématodes. 69

Figure 21. Racines de bananier infestées par des *Meloidogyne.* 69

Figure 22. Croissance des crotalaires *C. retusa* et *C. spectabilis* à 3 stades de développement sur deux substrats différents. 70

Figure 23. Illustration de l'augmentation de la taille des grains d'eau après humectation..... 72

Figure 24. Seringue utilisée pour presser, et casser les grains d'eau. 72

Figure 25. Effet de la combinaison des symbiotes sur la croissance des plantes au bout de 2 mois sur les deux substrats sélectionnés. 73

Figure 26. Processus de production des métabolites par la méthode des plantes à traire. 76

Figure 27. Processus de production pilote d'extraction des exsudats racinaires développé par l'équipe 'Métabolites secondaires des végétaux' de l'INRA de Nancy..... 77

Figure 28. Dispositif expérimental de production d'exsudats racinaires en milieu contrôlé. . 79

Figure 29. Plants de *C. retusa* débarrassés 79

Figure 30. Récupération des exsudats racinaires par la technique des plantes à traire. 79

Figure 31. Chromatogramme d'exsudats racinaires de *C. spectabilis* obtenus à 280 nm..... 80

Figure 32. Plaque obtenue en HPTLC avec révélateur NEU/PEG. 81

Figure 33. Cycle de développement de *Meloidogyne arenaria* (d'après Abad et al., 2008)... 91

Figure 34. Cycle de développement de *Radopholus similis* (d'après Brooks, 2008)..... 92

Figure 35. Schéma récapitulatif de l'ensemble du dispositif expérimental..... 95

Figure 36. Schéma récapitulatif des conditions testées. L'ensemble des traitements a été analysé en spectrophotométrie visible..... 97

Figure 37. Dosage en spectrophotométrie visible des trois familles de composés obtenus avec *C. spectabilis*, *C. retusa* et le bananier en réaction à deux substrats contrastés..... 99

Figure 38. Dosage en spectrophotométrie visible de trois familles de composés obtenus chez les trois espèces végétales en fonction de différents modes de fertilisation (« naturelle » avec mycorhize ou chimique avec engrais)..... 101

Figure 39. Dosage en spectrophotométrie visible de trois familles de composés obtenus chez les trois espèces végétales en présence de *M. arenaria* ou de *R. similis.*..... 102

Figure 40. Dosage en spectrophotométrie visible de trois sous familles de composés obtenus chez les trois espèces végétales en présence de *M. arenaria* ou de *R. similis.* 104

Figure 41. Observation de *R. similis* au bout de 48 h après exposition avec des exsudats racinaires de Crotalaire. A : Photos de *R. similis* immobiles en présence des exsudats racinaires ; B : Photos de *R. similis* redevenus mobiles après rinçage à l'eau distillée. 105

Figure 42. Observation de *M. arenaria* au bout de 48 h après exposition avec des exsudats racinaires de Crotalaire. C : Photos de *M. arenaria* immobiles en présence des exsudats racinaires ; D : Photos de *M. arenaria* redevenus mobiles après rinçage à l'eau distillée..... 106

Figure 43. E : Photo de *R. similis* ; F : Photos de *M. arenaria.*..... 107

Figure 44. Pourcentage de nématodes mobiles / nématodes immobiles au bout de 48 h. 108

Figure 45. Analyse de la quantité de molécules répertoriées dans les trois familles de composé recherchées par comparaison entre traitements..... 113

Figure 46. Analyse croisée des résultats obtenus lors des biotests avec les variations quantitatives des composés dosés en spectrophotométrie visible. 121

Table des tableaux

Tableau 1. Familles et sous-familles de métabolites secondaires. 22

Tableau 2. Présence des différents nématodes dans le sol et les racines. 37

Tableau 3. Efficacité relative du moyen de lutte employé sur différents types de nématodes. 38

Tableau 4. Déclinaison des critères pris en compte pour la revue analytique. 45

Tableau 5. Déclinaison des critères pris en compte pour la méta-analyse. 49

Tableau 6. Technique de dosage biochimique envisageable pour les analyses biochimiques. 63

Tableau 7. Récapitulatif des principaux choix expérimentaux réalisés. 66

Tableau 8. Analyse par catégorie de molécules des données en GC-MS, (A) en molécules totales, (B) en pourcentage. 111

INTRODUCTION GENERALE

Les nématodes phytoparasites (PPNs) sont responsables d'importantes pertes économiques pour une grande variété de cultures à l'échelle mondiale (Cayrol et al., 1992 ; Potter et al., 1993 ; Koenning et al., 1999). Les PPNs provoquent une réduction du rendement des cultures par la destruction directe des cellules racinaires, ou, indirectement, en propageant des virus, ou encore, en facilitant l'invasion de champignons et de bactéries par le biais des lésions causées lors de leur pénétration dans les racines (Westerdahl et al., 1998). L'ensemble des pertes causées par les PPNs est estimé à plus de 100 milliards de dollars par an dans le monde, corrélativement à des baisses de rendements de l'ordre de 10-20% pour les cultures de rente (Sasser et Freckman, 1987 ; Cayrol et al., 1992 ; Evans et Rowe, 1998 ; Koenning et al., 1999). Ces pertes sont généralement plus importantes dans les régions tropicales, où le taux de reproduction des nématodes est plus élevé que dans les zones tempérées (Davide, 1995 ; Speijer et Kajumba, 2000 ; Kashaija et al., 2004). Par ailleurs, les baisses de rendement causées par les PPNs pourraient s'intensifier en raison des restrictions imposées à l'utilisation des fumigants chimiques (Noling et Becker, 1994 ; Djian-Caporalino, 2012) et du retrait volontaire de certains nématicides du marché. Les enjeux environnementaux auxquels l'agriculture mondiale doit aujourd'hui faire face, remettent en question les modes de productions conventionnels (Grenelle, 2008 ; Millenium Ecosystem Assessment, 2005). Aussi, la recherche agronomique s'oriente t'elle vers des alternatives visant la diminution, voire la suppression des nématicides de synthèse.

Aux Antilles Françaises, la filière export bananier dessert traverse actuellement une grave crise environnementale, économique et sociale. Au plan environnemental, les pratiques intensives ont eu pour conséquence une baisse de la fertilité physique, biologique et chimique des sols (Clermont-Dauphin et al., 2004), et une contamination des sols, des eaux de surface

et des écosystèmes terrestres et marins en composés organochlorés et organophosphorés, comme en témoigne la récente crise de la chlordécone, molécule pesticide autrefois utilisée pour lutter contre le charançon du bananier (Bonan et Prime, 2001 ; Bocquene et Franco, 2005 ; Houdart et al., 2009 ; Cabidoche et al., 2009). Les problèmes de durabilité sont multiples et sévères, et les attentes locales fortes vis-à-vis de systèmes de culture innovants plus respectueux de l'environnement et de la santé humaine. Le plan Ecophyto 2018 prévoit ainsi une réduction globale de 30 % des pesticides utilisés en routine ; l'utilisation de fumigants et autres nématicides chimiques étant d'ores et déjà proscrite. Ainsi, pour répondre aux enjeux liés au respect de l'environnement, la recherche agronomique porte t'elle une attention accrue aux apports de l'écologie à l'agronomie, comme moyens alternatifs aux intrants chimiques polluants, en vue de concevoir des modes de production plus durables.

Face à la difficulté de proposer des variétés résistantes qui satisfassent le cahier des charges de la filière bananier export – aptitudes à la conservation et à la maturation, propriétés organoleptiques satisfaisantes, etc.-, les alternatives sont majoritairement recherchées dans un cadre global de conception de systèmes de culture écologiquement intensifs. Ces mesures alternatives intègrent :

i) les mesures prophylactiques qui visent à limiter la contamination des parcelles grâce à l'assainissement des plants, d'une part, en recourant à des vitroplants sains, et du sol, d'autre part, en pratiquant des rotations/jachères et/ou associations culturales avec des plantes non hôtes de nématodes ; ces plantes non-hôtes peuvent être des cultures de rente (ananas, canne à sucre, …) ou des plantes de service (PDS) à propriétés nématorégulatrices (*les plantes de service sont des espèces végétales destinées à fournir -en association (moyennant une compétition maîtrisée) ou en rotation-, des services de capture-fourniture d'azote, de contrôle parasitaire (notamment nématorégulation), de contention de l'enherbement, de*

réduction du lessivage des minéraux. Ce concept est un élargissement du concept de plantes de couverture, essentiellement dédié, initialement, à la protection des sols contre l'érosion, et à la fourniture de matière organique) ;

ii) la lutte physique via le recours à la solarisation et à la biofumigation permettant d'associer le contrôle thermique aux propriétés allélopathiques pour éliminer les nématodes du sol ;

iii) la lutte biologique, basée sur l'utilisation d'agents biologiques nématovores.

Parmi ces alternatives, l'intérêt pour les plantes de services, résistantes aux nématodes ou antagonistes, s'est accru, comme démarche compatible avec les exigences du développement durable. Différentes espèces de plantes candidates ont été répertoriées en relation avec leur potentiel allélopathique contre les PPNs. Ces plantes de services à propriétés nématicides ont fait l'objet de nombreuses études dans des contextes expérimentaux divers. Elles montrent des résultats globalement avérés, quoique nuancés, vis-à-vis de nombreux nématodes. Parmi ces plantes candidates, les espèces du genre *Crotalaria* suscitent un intérêt croissant depuis une trentaine d'années, en vertu de leurs propriétés nématicides (Wang et al., 2002). Les propriétés nématicides, ovocides ou encore larvicides des différentes parties de la plante (racine, tige, feuille, fleur, graines, écorce, …) ont, en effet, été mises en évidence lors de nombreux essais au champ (rotation, jachère, amendement au sol, ou association) ou en milieu contrôlé.

Aux Antilles, une vingtaine d'espèces de crotalaires ont été recensées, dont certaines possèderaient potentiellement les propriétés recherchées pour une lutte contre les PPNs. Des études plus approfondies sont donc requises pour avancer dans cette voie, et pour définir les bases scientifiques des possibilités de valorisation des espèces du genre *crotalaria* dans la lutte contre les PPNs.

Notre problématique générale a pour enjeu d'améliorer la compréhension globale des mécanismes mis en œuvre dans l'interaction « plantes de services x nématodes », et de définir les questions de recherche et les hypothèses originales qui seront traitées dans le cadre de ce travail de thèse. Nous chercherons donc, dans un premier temps, à clarifier le concept d'allélopathie, et ses modalités d'expression par les voies du métabolisme secondaire, au regard des propriétés du sol, et de la biologie des nématodes. Dans une seconde étape, nous nous focaliserons sur l'interaction « crotalaires x nématodes » proprement dite, que nous aborderons dans le cadre d'une démarche de méta-analyse. La finalité étant de mieux appréhender les conditions environnementales et techniques susceptibles d'influencer le déterminisme biochimique des exsudats racinaires des crotalaires.

PARTIE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Allélopathie et nématorégulation

L'allélopathie est « l'effet positif ou négatif, direct ou indirect, de végétaux ou de micro-organismes sur des végétaux ou des micro-organismes, par le biais de composés chimiques libérés dans l'environnement » (Rice, 1984).

C'est par le biais de ce mécanisme que s'établissent des relations positives ou négatives entre les plantes de services et les autres plantes (ex : inhibition de la germination des adventices, activation de mécanismes de défense), entre les plantes de services et les micro-organismes du sol (ex : activation de mécanismes de défense ou activation de réseaux trophiques), et entre les plantes de services et le sol (ex : biodisponibilité des nutriments par altération des éléments chimiques du sol, ou par stimulation de processus biologiques).

Les mécanismes de type allélopathique impliqués dans le contrôle des populations de nématodes relèvent de deux sortes :

i) **l'allélopathie « directe »** : elle concerne la production de composées chimiques toxiques, inhibiteurs, répulsifs ou attractifs, par les parties aériennes ou racinaires (Haroon and Smart, 1983a,b ; Gommers et Baker, 1988 ; Halbrendt, 1996 ; Bais et al., 2006) de certaines espèces végétales, soit de manière spontanée, soit en réaction à une attaque *i.e.* fonction de piégeage des nématodes (Gallaher et al., 1991 ; La Mondia, 1996) ;

ii) **l'allélopathie « indirecte »** : elle intervient dans la fourniture de niches pour l'installation de flore et de faune antagonistes (Caswell et al., 1990 ; Kloepper et al., 1991 ; Bais et al., 2006), en particulier les champignons et bactéries nématophages dont l'activité est particulièrement stimulée en présence de

légumineuses. Cette stimulation peut être le fait de la décomposition de la matière organique enfouie, mais peut être également induite par les exsudats racinaires qui fournissent une source de carbone organique aux micro-organismes du sol, favorisant l'hébergement d'importantes populations microbiennes dans la rhizosphère. Ces interactions sont facilitées par les exsudats racinaires produits par la plante, qui sont libérés dans la rhizosphère (Figure 1).

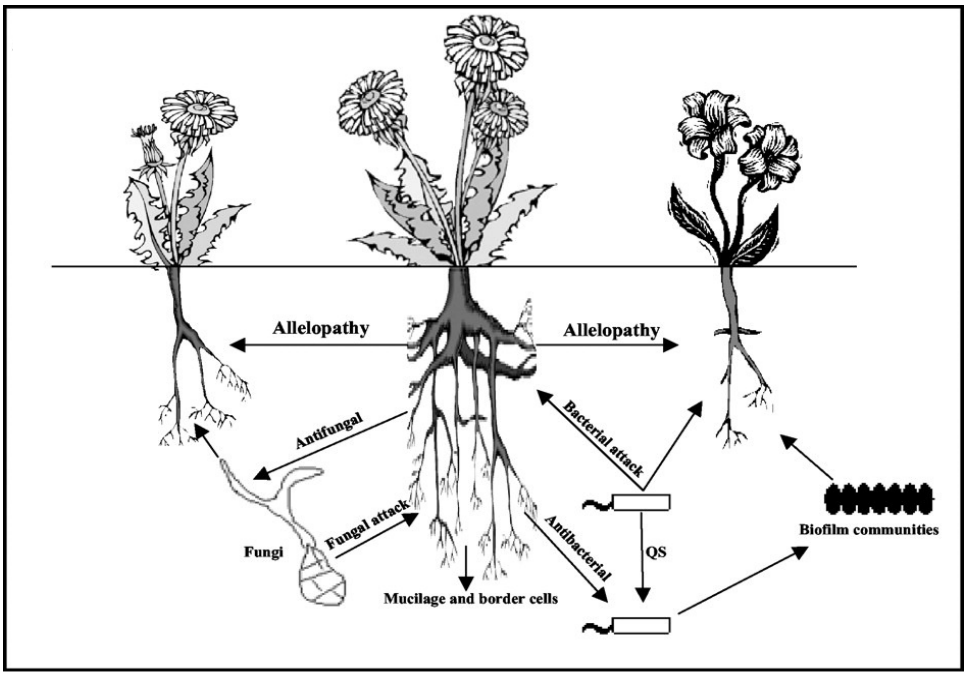


Figure 1. Traits généraux de l'allélopathie (d'après Walker et al., 2003). Représentation des interactions complexes médiées par les exsudats racinaires, qui ont lieu dans la rhizosphère entre les racines des plantes, et d'autres organismes **(les o**rganismes ne sont pas représentés à l'échelle **;** QS **= quorum sensing).**

Les processus allélopathiques sont réalisés par l'intermédiaire de composés qui sont libérés de différentes façons dans l'environnement : émis par les feuilles, par le biais de la dégradation des tissus végétaux, par les exsudats racinaires.

Les exsudats racinaires sont représentés par un ensemble d'ions, d'enzymes, de mucilages, d'oxygène libre et par les divers composés contenant des métabolites primaires et secondaires,

qui sont produits par la plante, et qui sont, par la suite, libérés dans le sol au niveau de son système racinaire.

I.1.1. L'allélopathie directe ou spécifique et la nématorégulation

Cette forme d'allélopathie est rendue possible grâce à des molécules synthétisées par la plante, qui agissent de différentes façons selon l'endroit où elles sont localisées :

- Exsudation au niveau des racines de substances actives qui inhibent l'éclosion des œufs, ou agissent sur la mobilité des nématodes (Subramaniyan et Vadivelu, 1990 ; Jasy et Koshy, 1992 ; Sellami et Mouffarrah, 1994 ; Wang et al., 2001).
- Présence de molécules au niveau des racines, tiges, feuilles, fleurs et graines qui agissent par empoisonnement des larves dès pénétration (Cayrol et al., 1992).
- Production de molécules (phytoalexine, Pathogens Related protéine,…) en réaction à la pénétration des nématodes et qui bloquent leur développement et leur multiplication une fois à l'intérieur (Peacock, 1957 ; Huang et al., 1981 ; Sano et al., 1983 ; Sano et Nakasano, 1986 ; Subramaniyan et Vadivelu, 1990 ; Jasy et Koshy, 1992 ; Sellami et Mouffarrah, 1994 ; Wang et al., 2001).
- Exsudation au niveau des racines de substances actives qui inhibent la pénétration des larves dans les racines ou les paralysent (Jourand et al., 2004a et 2004b).

I.1.2. L'allélopathie globale ou indirecte et la nématorégulation

Les légumineuses utilisées comme engrais vert permettent la libération d'ions ammonium (NH3) dans le sol. Il a été démontré qu'une grande quantité d'azote dans le sol (C/N faible) serait responsable de la plasmolyse de nématodes d'une part (Fassuliotis et Skucas, 1969), mais aussi de la prolifération de champignons nématophages et de champignons producteurs de chitinase qui s'attaquent à la coquille des œufs des nématodes (Rodriguez-Kabana, 1986), d'autre part. L'utilisation de légumineuses en temps qu'engrais vert (incorporation, puis décomposition de la matière organique) permet également une augmentation des populations de bactéries ayant un rôle dans la décomposition de cette matière organique ; ces bactéries servant, à leur tour, de nourriture à des nématodes bactériophages qui sont eux-mêmes recyclés par des champignons nématophages (Van den Boogert et al., 1994 ; Wang, 2000).

Il a aussi été démontré que la microflore présente au niveau de la rhizosphère de plantes présentant des propriétés antagonistes vis-à-vis des nématodes était différente de celle présente au niveau de plantes ne possédant pas ces propriétés (Kloepper et al., 1991). En comparant les microorganismes présents au sein de la rhizosphère de plantes dites nématicides (*Mucuna deeringiana*, *Ricinus communis*, *Canavalia ensiformis*, et *Seacale cereale*), et ceux d'une plante sensible au nématode (le pois), Kloepper et al. (1991), révèlent que les densités de populations de bactéries et de champignons varient d'une espèce végétale à l'autre, mais aussi en fonction de leur stade de développement. Cette étude ne traite pas, cependant, de l'effet direct des micro-organismes sur les populations de nématodes.

Une étude menée par Hauggaard-Nielsen et Jensen (2005), a démontré, par ailleurs, que dans des cultures associées avec des légumineuses, ces dernières favorisent la mise en place de réseaux mycorhiziens à partir de leur système racinaire. Outre leur rôle dans la facilitation de

la nutrition des plantes, ils contribuent à protéger les racines contre des infections possibles par des micro-organismes pathogènes du sol en permettant :

- une compétition avec les nématodes lors de la mise en place du réseau mycélien interne dans le cortex des racines ;
- un renforcement de la résistance des plantes sensibles grâce à la facilitation nutritionnelle permise par le réseau mycélien externe (apport en nutriments de la plante donneuse/légumineuse, vers la plante receveuse/sensible) ;
- un masquage du pouvoir attractif des racines vis-à-vis des nématodes.

I.2. Les métabolites secondaires

Les propriétés nématorégulatrices mises en œuvre dans le processus d'allélopathie directe sont dues à la présence de différentes familles de molécules présentes au niveau des différentes parties de la plante. Les plantes produisent, en effet, une grande diversité de produits naturels ayant une fonction importante, soit dans la croissance et le développement des plantes (métabolites primaires M1), soit dans la protection contre les prédateurs et agents pathogènes microbiens, ceci sur la base de leur nature toxique ou répulsive pour les herbivores et les microbes (métabolites secondaires M2) (Bais et al., 2006 ; Mazid et al., 2011). Ces métabolites secondaires peuvent être stockés dans une vacuole ou vésicule (détoxification ou réservoir en molécules), ou synthétisés dans les divers organes de la plante, et, souvent, produits seulement sur une durée spécifique du développement de la plante. Ils sont souvent synthétisés en situation de stress biotique ou abiotique.

De nombreuses propriétés sont attribuées aux métabolites secondaires :

- protection contre l'attaque de pathogènes (i.e. production de phytoalexines qui empêchent la germination de spores de champignons) ou d'herbivores (menthe) ;

- attraction des pollinisateurs (couleur des fleurs) ;
- participation à des réponses allélopathiques (inhibition de la germination, de la croissance et du développement d'autres plantes) ;
- fonction signalétique ;
- influence de l'activité métabolique des autres cellules.

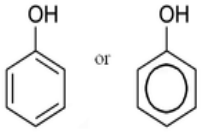
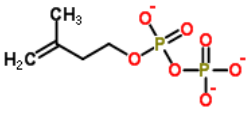
Un métabolite secondaire peut être présent dans la plante mais non exsudé. Il peut être dégradé ou présent à des concentrations non détectables, tout en ayant un impact sur le contrôle d'un ravageur.

Il existe 3 grandes catégories de métabolites secondaires :

	Origine	*Nb de molécules*
Terpénoïdes ou isoprénoïdes →	l'IPP (isopentenyl diphosphate), une molécule à 5 C →	25000
Alcaloïdes (composés azotés) →	Acides aminés →	12000
Molécules phénoliques →	Voie de l'acide shikimique et acétate/malonate →	8000

Le tableau 1 synthétise les grandes familles et sous familles de métabolites secondaires, indiquant des plantes ou espèces dans lesquelles ils se retrouvent.

Tableau 1. Familles et sous-familles de métabolites secondaires.

Famille	Sous-famille	Exemple
Composés phénoliques 	phenols simples	Arbutin dans les Rosaceae et Ericaceae
	hydroxybenzoates	4-Hydroxybenzoate dans plusieurs familles
	Acetophenones	Picein dans *Picea abies*
	Phenyl acetates	4-Hydroxyphenylacetate dans *Taxacum officinale*
	Hydroxycinnamates	Chlorogenate dans les Solanaceae
	Phenylpropenes	Eugenol dans les huiles essentielles de plusieurs espèces
	Coumarines	Cichoriine dans *Cihorium intybus*
	Chromones	Eugenine dans *Eugenia aromatica*
	Naphthoquinones	Juglone dans les Juglandaceae
	Xanthones	Mangiferine dans *Mangifera indica*
	Stilbenes	Resveratrol dans *Eucalytpus*
	Anthraquinones	Emodine dans *Rheum palmatum*
	Flavonoides	Rutine et anthocyanines dans plusieurs familles
	Lignanes	Pinoresinol dans *Picea* et *Pinus*
	Biflavonoides	Amentoflavone dans les gymnospermes
	Catechol melanines	polymères de Naphtalène dans *Daldinia concentrica*
	Tannins hydrolisables	tannin chinois dans *Rhus semialata*
	Lignines	Lignines guaiacyl dans les gymnospermes
	Tannins condensés	Tannins dans *Quercus robur*
Composés azotés	Acides aminés non protéiques	acide L-azetidine-2-carboxylique dans les Liliaceae
	Amines	amines aliphatiques, putrescine, spermidine, tryptamine dans la plupart des plantes, cadaverines dans les Leguminosae
	Glycosides cyanogéniques	Linamarine, lotaustraline, lucumine dans plusieures familles
	Glycosinolates	Glucobrassicine, sinalbine, sinigrine dans les dicotylédons
	Alcaloïdes	Cocaïne dans les Solanaceae, nicotine dans les différentes *Nicotiana*, ajmalicine, vincristine dans *Catharanthus roseus*, sanguinarine et berberine dans les Papaveraceae
Isoprenoides 	Monoterpenoides	geraniol, menthol, iridoides (loganine, secologanine dans *Catharanthus roseus*)
	Sesquiterpenoides	Acide abscisique dans la plupart des plantes, lactones sesquiterpenoides
	Diterpenoides	Gibberellines dans toutes les plantes
	Triterpenoides	Phytosterols, saponines, cardenolides dans la plupart des plantes
	Carotenoides	β-carotène dans *Daucus carota*, prolycopène dans *Escultentum*, persicaxanthine dans *citrus*
	Polyterpenoides	Caoutchouc dans *Hevea brasilienesis*

IPP

I.2.1. Toxicité reconnue aux trois grandes familles de molécules chez les plantes

I.2.1.1. Les alcaloïdes

Le principal rôle des alcaloïdes est un rôle de protection de la plante contre les mammifères et les insectes. Parmi les effets physiologiques produits par certains d'entre eux, on recense :

- des effets sur l'activité cérébrale et le système nerveux : stimulant, euphorisant, excitant, hallucinogène, antalgique, hypnotique, paralysant, tétanisant, dilatateur ou constricteur de la pupille, vomitif, analgésique (comme la morphine, la codéine) dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie) souvent accompagnés d'hypnotiques ;
- des effets sur le système cardio-vasculaire : régulateur de la tension sanguine (hypertension, hypotension), anti-arythmique, bronchodilatateur ;
- sans effet direct sur le système nerveux : lutte contre le paludisme, inhibiteur de la division cellulaire (quinine, chloroquinine), agent anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine).

Les sous-familles d'alcoïdes présentant des effets intéressants pour la némato- régulation se répartissent en 2 groupes :

i) Les acides aminés non protéiques : on dénombre environ 250 **acides aminés non protéiques** chez les plantes (Swain, 1977), parmi lesquels certains jouent un rôle de défense, dont certains sont toxiques.

ii) Les **alcaloïdes pyrrolizidiniques** (PAs) forment une classe d'alcaloïdes et de métabolites secondaires, caractérisés par une structure pyrrolizidine formée de

deux cycles pyrroles. Les diesters macrocycliques (**sénécionine**, rétrorsine, sénéciphylline, ridelline) sont les plus toxiques. Ensuite viennent les diesters qui sont plus toxiques que les monoesters.

Selon Bouchelta et al. (2005), les alcaloïdes peuvent avoir des effets toxiques par contact chez les embryons, et par contact et/ou par ingestion chez les adultes de *Bemisia tabaci*. L'effet insecticide du fruit de *Capsicum frutescens* a été observé chez *C. maculatus* (Gakuru et Foua, 1996).

La monocrotaline est un alcaloïde de type pyrrolizidine chez les crotalaires (Stoeckli-Evans, 1979), qui a montré un effet inhibant sur le pouvoir infestant et la mobilité de juvéniles infestantes, ainsi que sur la mobilité de *M. incognita* sur des cultures de tomate (Fassuliotis et Skucas, 1969).

Jourand (2004a et 2004b) a pu démontrer que l'effet nématostatique observé sur les juvéniles de *Meloidogyne* serait vraisemblablement dû à la présence de substances toxiques dans les tissus des crotalaires tels que des alcaloïdes de type pyrrolizidinique comme la monocrotaline (Polhill, 1982). Cette molécule fut isolée pour la première fois sur des crotalaires à partir de *C. spectabilis*. Elle engendre, d'une part, une paralysie réversible des juvéniles, et, d'autre part, une perturbation dans l'orientation et dans la recherche de la plante hôte (due à la perturbation des chimio-récepteurs sensitifs et des organes sensoriels). Jourand (2004a) a pu isoler, outre la monocrotaline, divers autres types d'alcaloïdes à partir de 15 crotalaires sélectionnées, ce qui expliquerait la différence des effets nématostatiques observés sur les juvéniles (plusieurs alcaloïdes pouvant être présents dans une même espèce).

Marie-Magdeleine et al. (2010), démontrent une activité anti-helmintique d'extrait de *Tabernaemontana citrifolia* envers des nématodes présents chez les petits ruminants

(*Haemonchus contortus),* qui pourrait être due à la présence d'alcaloïdes présente au niveau des différentes parties de la plante.

I.2.1.2. Les polyphénols

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois), et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins.

Les composés phénoliques comme la lignine ont des rôles structurels. Tous les herbivores sont sensibles à cette molécule. Elle a des propriétés de défense mécanique contre les attaques. D'autres composés phénoliques comme les flavonoïdes possèdent des rôles variés. Ce sont des phyto-œstrogènes. Ils ont une action néfaste sur l'activité testiculaire de certains prédateurs. Ces molécules sont principalement responsables de la couleur, des arômes et des parfums des plantes. Les flavonoïdes ont également d'autres fonctions. Ils ont un effet attracteur sur les pollinisateurs, et protègent également les plantes des rayons UV. Les coumarines interviennent dans un mécanisme de défense contre les herbivores. Les tanins ont également cette propriété. Ils sont présents dans l'écorce, le bois et les feuilles, et sont stockés dans la vacuole. Certains mammifères comme les moutons et les antilopes, sont sensibles aux tanins. Ces molécules ont, en effet, un pouvoir d'astringence. Ils agglomèrent les glycoprotéines de la salive qui lubrifient la langue grâce à leurs nombreux groupements hydroxyles, ce qui provoque le dessèchement de la bouche.

Les polyphénols regroupent un ensemble de sous familles de molécules possédant diverses propriétés protectrices :

- résistance aux stress biotique et abiotique (Delalonde et al., 1996),

- action comme herbicide par le biais de l'allélopathie en accumulant des phénols simples, des acides phénoliques, des coumarines, des flavonoïdes, des isoflavonoïdes, des tannins, et une variété de composés phénoliques conjugués, en empêchant la germination des graines ou la croissance des plantes voisines (Whitehead, 1964 ; Baskin et al., 1967 ; Einhellig, 1995 ; Leather et Einhellig, 1986 ; Fisher, 1987 ; Patterson, 1981),
- action comme pesticides: répulsif d'insecte, anti fongique, nématicide (Rich et al., 1977 ; Marston et al., 1988 ; Vidhyasekaran, 1988 ; Waterman et Mole, 1989 ; Beier, 1990; Dakora, 1995 ; Dakora et Phillips, 1996 ; Ndakidemi et Dakora, 2003),

Selon Bouchelta et al. (2005), les flavonoïdes issus de *Capsicum frutescens* ont peu, ou pas, d'effets sur l'éclosion des œufs, et sur la survie d'adultes de *Bemisia tabaci*. Ce résultat concorde avec celui observé chez *Manduca sexta* avec la rutine (Barbosa et al., 1991). L'effet de ces composés peut être anti-appétant et/ou toxique, comme, par exemple, chez les chenilles de *Utetheisa ornatrix* (Gronquist et al., 2001). *In vitro*, certains flavonoïdes inhibent la réductase d'aldose. C'est le cas de la quercitrine (Lee, 2002).

Une étude, menée par Soriano et al. (2004), a permis d'isoler trois molécules de défense (apigenin -*C*- hexoside -*O*- pentoside, *O*- methyl-apigenin -*C*- deoxyhexoside -*O*- hexoside, luteolin -*C*- hexose -*O*- pentoside) qui sont des flavones -*C*- glycosides extraites de racines et de jeunes pousses d'avoine (*Avena sativa*), et produites en réponse à une attaque par des nématodes phytoparasites (*Ditylenchus dipsaci, Pratylenchus neglectus,* et *Heterodera avenae*). Une, parmi ces trois molécules, (*O*- methyl-apigenin -*C*- deoxyhexoside -*O*- hexoside) inhibe l'invasion et le développement d'*H. avenae*. Une réduction de l'invasion par *H. avenae* et par *P. neglectus,* additionnée à une augmentation de la masse végétale pour faire

face à l'attaque, et réparer les dommages causés par ces nématodes, est observée en présence de ces flavones -*C*- glycosides.

Selon Ayers et al. (2008), trois flavonols (5,6,2',5',6'-pentamethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone ; Yuankanin ; Amentoflavone) extraits d'une plante appartenant à la famille des Thymelaeaceae (*Struthiola argentea*) possèdent des propriétés anti- helminthiques contre des nématodes gastrointestinaux. Ces flavonols inhibent, en effet, significativement, la mobilité d'*Haemonchus contortus*.

Du et al. (2011), démontre que deux flavones -*C*- glycoside (schaftoside et isoschaftoside) issus de tubercules *d'Arisaema erubescens* possèdent des propriétés nématicides contre *Meloidogyne incognita*.

Selon Barrau (2005), trois flavonols glycosides (rutin, nicotiflorin et narcissin) extraits de sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) possèdent des propriétés antihelminthiques contre des nématodes gastro-intestinaux. Ils inhibent, en effet, significativement la mobilité de larves (L3) d'*Haemonchus contortus*.

Selon Singh et al. (2011), la quercétine (flavonoïde de type flavonol), extraite de *Cassia renigera,* possèderait une activité antibactérienne inférieure à celle de la gentamycine, mais une activité anti fongique supérieure voir égale à celle de la mycostatine.

I.2.1.3. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes, aussi appelés terpènes, existent chez toutes les plantes, et représentent de loin, la plus vaste catégorie de métabolites secondaires, avec plus de 22 000 composés décrits. Les terpénoïdes sont, pour la plupart, des anti-herbivores. Ils ont des effets différents selon la plante. Ils peuvent provoquer des convulsions, des allergies de la peau. Ils ont un goût amer, et peuvent également inhiber les microsymbioses de l'appareil digestif. Les terpénoïdes

contenus dans le latex sont utiles à la plante pour lutter contre les prédateurs. En effet, quand des insectes, comme les chenilles, pénètrent dans l'écorce d'un arbre producteur de latex, celui-ci va réagir en produisant un gel collant. Celui-ci empêche les insectes de se nourrir, et ces derniers finissent par mourir de faim.

Les stéroïdes constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), majoritairement du squalène. Ils ne sont pas des métabolites « secondaires », et sont indispensables au développement. Les cardenolides sont un type de stéroïde contenu dans de nombreuses plantes. Les cardenolides glycosilés sont souvent toxiques, entraînant des arrêts cardiaques. De nombreuses plantes et animaux utilisent les cardenolides comme mécanisme de défense.

Marie-Magdeleine et al. (2009), démontrent une activité antihelminthique d'extrait de graines de *Cucurbita moschata* envers des nématodes présents chez les petits ruminants (*Haemonchus contortus),* qui pourrait être due à la présence de terpénoïdes présents au niveau des extraits.

Selon Wang et al. (2009), qui testa, pour la première fois, les effets nématicides des cardénolides, trois cardenolides (3*β*-*O*-(*β*-D-diginosyl)-14,15α-dihydroxy-5α-card-20(22)-enolide ; uzarigenin ; cardenolide N-1) extrait de *Nerium indicum* MILL., ont démontré un effet nématicide sur trois nématodes (*Bursaphelenchus xylophilus, Panagrellus redivivus* et *Caenorhabditis elegans*).

Selon Wang et al. (2010), les saponines possèdent une activité antihelminthique contre *Dactylogyrus intermedius*, un parasite que l'on retrouve chez le poisson *Carassius auratus*. Cette activité a aussi été observée sur des nématodes des petits ruminants, entraînant une paralysie de ces derniers, notamment avec le lupéol (Shai et al., 2010).

Des effets nématicides ont également été mis en évidence à partir de saponines extraites de *Medicago spp.* sur des nématodes phytoparasites (Argentieri et al., 2008 ; D'Addabbo et al., 2009 ; 2010).

I.2.2. Mode d'action des métabolites secondaires sur les nématodes

Cette première analyse permet d'identifier certaines sous familles de molécules exprimant une capacité bio-régulatrice vis-à-vis de différents organismes (micro-organismes, nématodes, insectes, mammifères). Ainsi, dans la famille des alcaloïdes, les acides-aminés non protéiques, ainsi que les pyrrolizidines alcaloïdes, ils sont reconnus pour leur toxicité. Chez les composées phénoliques, on retrouve les flavonoïdes, et plus précisément les flavones et les flavonols glycosilés. Parmi les terpénoïdes, ce sont les cardénolides glycosilés, et les saponines qui possèdent ces caractéristiques toxiques.

Au-delà des propriétés intrinsèques de ces molécules, leur mode de diffusion peut agir sur leur devenir, à travers les interactions possibles. Les métabolites secondaires sont, en effet, libérés de la plante vers l'environnement selon quatre processus écologiques : l'émission de molécules volatiles via les différents tissus, l'exsudation racinaire -le maximum d'effet se produisant près des racines-, le lessivage et la décomposition des résidus végétaux.

Par ailleurs, trois modes de contrôle des nématodes, ou némato- régulation (maintient des populations de nématodes à un seuil ou à un niveau de pathogénicité non néfaste à la culture), ont été identifiés, via l'action de ces métabolites :

- la **némato-répulsion** : molécules qui, par leur présence, éloignent les pathogènes, ou qui dissuadent leurs agresseurs par leur odeur ou par leur goût ;
- la **némato-staticité** : molécules qui, par leur présence, agissent sur les fonctions motrices du nématode en le paralysant ;
- la **némato-toxicité** : molécules qui, par leur présence, tuent les nématodes.

C'est donc au travers de ces propriétés et relations complexes que nous chercherons à appréhender le processus de nématorégulation.

I.3. Le sol : réceptacle de la vie souterraine

I.3.1. Le substrat sol

Le sol constitue un réservoir de composés allélopathiques qui, compte tenu de ses propriétés mécaniques, physiques, et biologiques, ne se comporte pas comme un milieu neutre, mais influence d'une façon décisive le devenir de ces composés (Fisher, 1987).

Les colloïdes sont ainsi capables d'adsorber la plupart de ces substances (Huang et al., 1977) ; conduisant à une perte temporaire de leur activité toxique.

Il peut également y avoir formation de complexes entre ces composés et les acides humiques du sol ; rendant ainsi la molécule temporairement indisponible (simple adsorption), ou irréversiblement récupérable (précipitation ou complexation).

Enfin ces molécules peuvent être dégradées par les micro-organismes du sol qu'elles soient libres dans la solution du sol, ou adsorbées (Turner et Rice, 1975), entraînant ainsi une détoxification complète de la molécule, ou encore la production de nouvelles molécules allélopathiques. Ainsi, selon la nature et le type de sol utilisé, le devenir des molécules allélopathiques peut-il varier. Le pouvoir d'action de ces molécules sur des microorganismes présents dans ce sol pourra donc être altéré par les propriétés du sol.

I.3.2. La rhizosphère et les exsudats racinaires

La rhizosphère peut être décrite comme étant le gradient longitudinal et radial en contact direct avec la zone d'extension des racines, où se fait la croissance des racines, siège de l'extraction hydrominérale, de l'exsudation et de la croissance microbienne (Uren, 2007).

C'est ainsi la partie du sol en contact avec les racines, ou qui en subit l'influence. Cette zone comprend la majorité des organismes du sol car ils bénéficient des exsudats racinaires.

La haute densité de micro-organismes associés aux racines des plantes est, d'ailleurs, caractéristique de « l'effet rhizosphère ». Pour schématiser, celui-ci se traduit à la fois par l'augmentation de cette densité microbienne, et par une diminution de la diversité des micro-organismes associés aux plantes, liée à leur sélection par l'environnement végétal. Cette sélection résulte, en grande partie, de la mise à la disposition des micro-organismes de nutriments d'origine végétale, par le processus de « rhizodéposition ». On peut distinguer au moins deux origines de composés rhizodéposés. Les premiers proviennent de l'activité métabolique du végétal, et constituent les exsudats. Ces derniers sont libérés au niveau des feuilles ou des racines. Dans ce dernier cas, on les appelle « exsudats racinaires ». Ils peuvent représenter de 10 à 30 % du carbone fixé par photosynthèse. D'autres composés proviennent de la mort de certaines cellules végétales au cours de la croissance et de la maturation de la plante. Ainsi, la rhizosphère peut-elle être assimilée très schématiquement à un « milieu riche » (dit hétérotrophe), en comparaison du sol nu qui reste un milieu pauvre (dit oligotrophe).

La composition des exsudats racinaires est susceptible de varier en fonction des conditions biotiques et abiotiques de l'environnement, mais aussi du stade de développement de la plante et de son état physiologique (âge, plante saine ou malade). Les racines sont, en effet, constamment exposées à de nombreux stress biotiques et abiotiques, et produisent un éventail de composés chimiques afin de se protéger des influences négatives, ou d'encourager les interactions positives (Bertin et al., 2003 ; Uren, 2007).

I.4. Les nématodes phytoparasites

Les nématodes phytoparasites sont des vers ronds qui constituent un embranchement de vers non segmentés. Ils sont classés parmi les ecdysozoaires, car recouverts d'une épaisse cuticule. Ils mènent une vie libre ou parasitaire. Il est commode de les classer selon leur mode de transmission. Ils ont un tube digestif complet, comportant bouche et anus. Par contre, ils ne possèdent ni appareil respiratoire, ni appareil circulatoire, ni de tunique musculaire. Ils possèdent des microfilaments orientés dans le sens antéro-postérieur qui leur servent de moyen de locomotion. Cela induit un déplacement imprécis, par ondulations. Ces mouvements ne sont pas très efficaces dans l'eau, mais ils sont facilités par la présence de particules sur lesquelles le nématode peut prendre appui. Il existe différents types de nématodes phytoparasites des racines des plantes qui se différencient selon leur comportement alimentaire, et leur mobilité.

I.4.1. Les différents groupes de nématodes

I.4.1.1. Les endoparasites migrateurs

Chez les nématodes endoparasites migrateurs, tous les stades sont mobiles à l'exception de l'œuf. Les nématodes traversent les tissus végétaux de cellule en cellule, et peuvent quitter les tissus végétaux à la recherche de nouvelles sources alimentaires. Au cours de leur migration et de leur alimentation, ces nématodes pondent des œufs, soit à l'intérieur du cortex racinaire, soit dans le sol environnant les racines. Les cellules endommagées sécrètent des toxines qui peuvent tuer les cellules adjacentes, conduisant à la formation de petites tâches ou de lésions nécrotiques. Des champignons et des bactéries, agents de pourriture secondaire des racines,

sont souvent associés aux déplacements et aux points d'entrée créés par les nématodes endoparasites migrateurs.

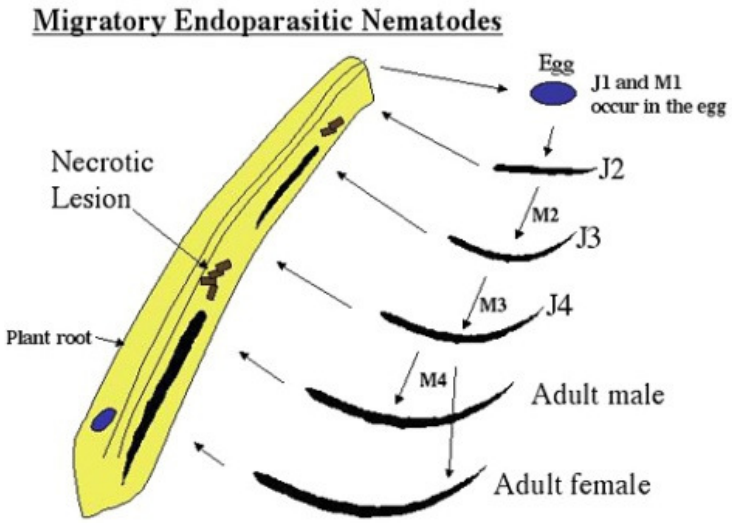


Figure 2. Cycle de développement des nématodes endoparasites migrateurs (d'après Lambert et Bekal, 2002).

I.4.1.2. Les endoparasites et les semi-endoparasites sédentaires

Les nématodes endoparasites sédentaires sont capables d'envahir les tissus végétaux dès l'éclosion du second stade juvénile – stade infestant vermiforme. Ils se déplacent dans le sol à la recherche de racines d'une plante hôte, traversent les tissus végétaux afin de trouver un site nourricier. Une fois le site trouvé, le juvénile s'y établit de manière permanente jusqu'à la fin de son cycle de développement en femelle adulte. Au fur et à mesure de son développement, son corps arrondi prend une forme sphérique, de citron, de rein ou ovoïde. Le nématode s'alimente sur un très petit nombre de cellules, régulées par le nématode lui-même, à l'aide de

substances de croissance. Certaines espèces, dites nématodes à kystes, et nématodes à galles, conduisent à la formation de cellules géantes à l'intérieur des racines de la plante hôte.

Les mâles demeurent filiformes, se nourrissant à la surface des racines pour quelques jours pendant lesquels ils peuvent, ou non, féconder les femelles avant de migrer à nouveau dans le sol pour y mourir.

Les femelles de nématodes endoparasites sédentaires produisent, généralement, un très grand nombre d'œufs qui demeurent à l'intérieur de leurs corps (e.g. nématodes à kystes *Heterodera* spp.), ou s'accumulent dans des masses d'oeufs (e.g. nématodes à galles *Meloidogyne* spp.) rattachées à leurs corps.

Quelques autres espèces sont sédentaires mais seulement semi-endoparasites, comme le nématode réniforme (*Rotylenchulus* spp.) et le nématode des citrus (*Tylenchulus semipenetrans*), qui sont partiellement intégrés dans les tissus racinaires.

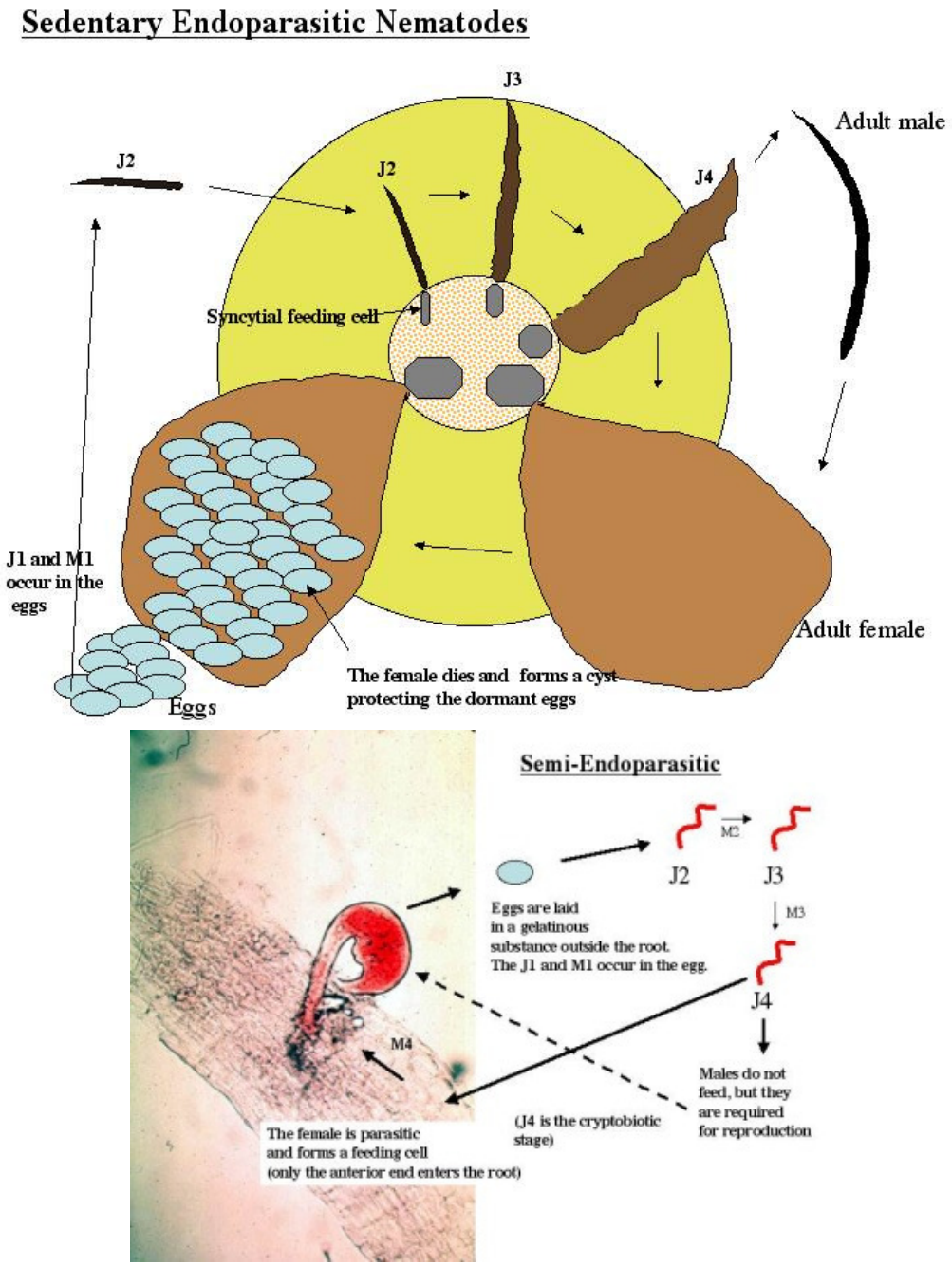


Figure 3. Cycle de développement des nématodes endoparasites et semi-endoparasites sédentaires (d'après Lambert et Bekal, 2002).

I.4.1.3. Les ectoparasites

Les nématodes ectoparasites s'alimentent de manière externe, à la surface des plantes, généralement sur les poils absorbants ou sur le tissu cortical externe des racines. On les

retrouve souvent, en très grand nombre, sans que cela soit un problème. Cependant, ils peuvent occasionner de sérieux dommages aux plantes souffrant de stress d'origine biotique ou abiotique (e.g. attaque fongique, ou faible disponibilité en eau). Les exemples de nématodes ectoparasites sont : les nématodes « annelés » (*Criconemoides* spp.), les nématodes spiralés (*Helicotylenchus* spp.) et le nématode agent du bout blanc sur le riz (*Aphelenchoides besseyi*).

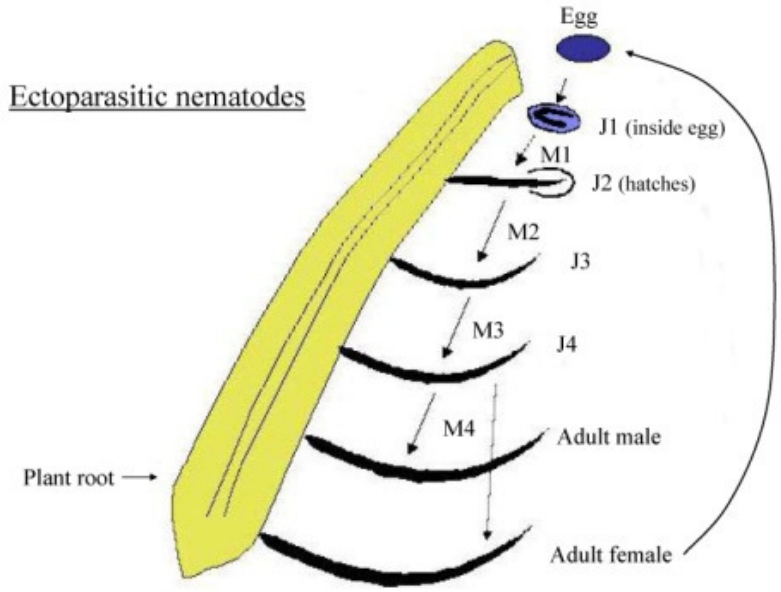


Figure 4. Cycle de développement des nématodes ectoparasites (d'après Lambert et Bekal, 2002).

I.4.2. Stratégies de lutte contre les différents types de nématodes

Parmi les moyens de lutte alternatifs actuellement préconisés, figurent, en premier lieu, les techniques prophylactiques à vocation d'assainissement des sols, qui on été mises en œuvre avec succès, dans certains systèmes de culture aux Antilles. Ces dernières reposent principalement, sur la mise en œuvre de jachères assainissantes, ou de rotations à durée

variable, à base d'espèces non hôtes visant à rompre le cycle des bioagresseurs, et combinées ou non, à l'utilisation de vitro-plants sains. Selon leur cycle de développement (Tableau 2), les différents types de nématodes vont se retrouver plutôt dans le sol (+ : très peu présents; +++ : très présents) ou plutôt dans les racines de la plante (- : absents ; +++ : très présents).

Tableau 2. Présence des différents nématodes dans le sol et les racines.

	Racine	Sol
Endoparasite migrateur	+++	+
Endoparasite sédentaire	+++	+++
Ectoparasite	-	+++

Aussi, il sera possible d'agir de façon plus ou moins efficace sur les différents types de nématodes, selon les méthodes culturales utilisées (Tableau 3) :

i) La rotation/jachère avec l'utilisation de cultures dites assainissantes, qui vont créer des ruptures de cycle chez le nématode visé.

ii) L'association culturale, en cultivant de manière conjointe, une culture d'intérêt, avec des plantes de service à propriétés nématicides.

iii) L'enfouissement des résidus de plantes de service au sol, qui lors de leur dégradation, vont libérer des molécules toxiques.

Tableau 3. Efficacité relative du moyen de lutte employé sur différents types de nématodes.

	Rotation/jachère	**Association culturale**	**Enfouissement de résidus**
Endoparasite migrateur	Efficace[1]	Efficacité partielle[2]	Efficace
Endoparasite sédentaire	Efficace	Efficace	Efficace
Ectoparasite	Efficace	Efficace	Efficace

[1] action sur la phase infestante résiduelle dans le sol

[2] action sur les nématodes qui passent dans le sol à la recherche de nouvelles racines à infester

Les nématodes à galles ont une large gamme d'hôtes, en particulier les plantes dicotylédones que l'on trouve, entre autres, dans les zones où poussent les bananiers et bananiers plantains. Une attention particulière doit, par conséquent, être accordée au désherbage des terres en jachère, et à la sélection de cultures de couverture, ou associées dans les systèmes de cultures intercalaires ou de rotation. La mise en jachère des terres pour éradiquer les nématodes à galles des racines peut cependant ne pas être efficace. A Cuba, par exemple, on rapporte que les *Meloidogyne spp.* persistent dans la terre jusqu'à 29 mois, même quand il n'y a pas de bananier. En Inde, la culture intercalaire de *Coriandrum sativum, Sesamum indicum, Crotalaria juncea, Tagetes erecta* et *Acorus calamus* a fait diminuer de façon significative les populations de *Meloidogyne incognita* sur les bananiers de type Robusta (sous-groupe Cavendish) dans des essais au champ. Le même effet, sur *Meloidogyne spp.*, a été obtenu à Cuba lors d'essais de cultures de rotation associant herbe de Pangola, maïs et canne à sucre, et avec *Tagetes patula* en Afrique du Sud. L'association avec le riz irrigué peut aussi, grâce à la

période d'inondation, réduire considérablement les populations de nématodes à galle (De Waele et Davide, 1998).

I.5. Les plantes de service à propriétés nématorégulatrices

De nombreuses espèces végétales ont été répertoriées pour leurs aptitudes à la nématorégulation. De façon générale, ces espèces candidates sont utilisées principalement en rotation, plus rarement en cultures associées, ou encore apportées au sol comme amendement organique afin de provoquer un assainissement phytosanitaire des sols.

Ainsi, l'utilisation des tagètes (astéracées) en tant que plantes de couverture (Good et al., 1965 ; Suatmadji, 1969) ou engrais vert (Siddiqui et Alam, 1987) est abondamment citée pour leur efficacité dans le contrôle de populations de *Meloidogyne spp*. Dans leur article de synthèse portant sur le mode d'utilisation des œillets d'inde (*Tagetes spp*.), Hooks et al. (2010), attestent de l'aptitude des plantes de cette famille à produire des molécules toxiques envers les nématodes phytoparasites. Ces auteurs ont également montré une variabilité des réponses vis-à-vis des nématodes selon le mode de conduite cultural (utilisation des *tagetes* en rotation, ou en culture intercalaire, etc.), mais aussi selon les conditions biotiques et abiotiques (espèces, variété, âge de la plante, température, nématode cible, etc.).

Dans la famille des graminées, il a été démontré que leur décomposition dans le sol, mais aussi leur utilisation en pré-culture, permet un contrôle des populations de nématodes à galles (*Meloidogyne spp., Pratylenchus*) en libérant des composés toxiques (Endo, 1959 ; Jonhson,1975 ; Merwin et Stiles, 1989 ; Koenning, 1985 ; Minton et Parker, 1987 ; Oostendorp et al., 1991).

Cette aptitude a été également mise en évidence pour les plantes de la famille des solanacées (Miller et al., 1973 ; Winslow, 1995).

Il en est de même pour certaines plantes de la famille des crucifères, pour lesquelles des travaux de recherche ont démontré que leur utilisation dans des rotations permet de diminuer des populations d'*Heterodera spp.* et de *Meloidogyne spp.* (Den Ouden, 1956 ; Mojtahedi et al., 1991).

De nombreuses plantes de la famille des légumineuses utilisées comme engrais vert permettent en corollaire, une réduction des populations de *Meloidogyne* dans la majorité des cas (Brodie et al., 1970 ; Reddy et al., 1986). Leur ajout au sol en tant qu'amendement organique induit en effet, selon les plantes considérées, une inhibition du développement, ou la mort des nématodes (Good et al., 1965 ; Miller et al., 1973), ou encore, empêche la reproduction ou l'éclosion des œufs (Johnson et Shamiyeh, 1975). Parmi les espèces légumineuses, on retrouve les crotalaires qui ont fait l'objet de nombreuses études, et qui, selon l'espèce considérée, manifestent un caractère non hôte plus ou moins marqué vis-à-vis de certains nématodes à galles, ou encore de nématodes foreurs des racines, en empêchant leur reproduction ou leur développement à l'intérieur de leurs tissus. Concernant les nématodes du genre *R. similis*, des études ont montré que *C. striata* et *C. spectabilis* ont entravé la reproduction de ce nématode à l'intérieur de leurs racines (Birchfield et Bistline, 1956). Par ailleurs, d'autres travaux rapportent que *C. juncea* permet la réduction de populations de *R. similis* en culture associée avec des bananiers (Charles, 1995), et que l'usage de ses extraits foliaires est létal à une dilution de 1/5e pour ce dernier pendant 24 h (Jasy et Koshy, 1994). De manière contradictoire, d'autres études révèlent que *C. juncea* s'avère être une plante hôte pour ce nématode car les quantités retrouvées au niveau des racines étaient les mêmes que celles retrouvées chez une plante dite sensible (Inomoto, 1994). Les travaux menés par Jourand (2004a) ont permis de tester ou de valider un certain nombre

de mécanismes. Dans un premier temps cet auteur a comparé 15 espèces de crotalaires à une espèce sensible (la tomate) et a ainsi pu confirmer les hypothèses de Santos et Ruano (1987), de Silva et al. (1989), et de Gonzaga et Ferraz (1994), qui stipulaient un taux de pénétration des juvéniles de *M. incognita* et *M. javanica* au stade J2, inférieur à 5 % pour un grand nombre d'espèces de crotalaires. Il a confirmé par ailleurs, les travaux réalisés par Sano et al. (1983), concernant *C. spectabilis,* en mettant en évidence le blocage du développement des nématodes au stade larvaire.

Jourand a par ailleurs testé l'activité biologique d'extraits de feuilles et de racines sur des juvéniles de *Meloidogyne*. Une activité nématostatique réversible a ainsi été mise en évidence, avec des extraits aqueux de racines, ou de feuilles de *C. grantiana,* retardant ainsi l'infestation de l'espèce sensible. Il a pu ensuite démontrer la relation entre l'augmentation de la concentration de l'extrait, et celui du taux de paralysie des nématodes, traduisant une inhibition des récepteurs de l'acétyl-cholinestérase. Son efficacité sur les nématodes du genre *Meloidogyne,* en tant que plante non hôte, a donc été démontrée, mais également sur *R. similis* lorsqu'elle est en culture associée avec des bananiers (Charles, 1995). En **annexe 1,** est présentée une liste plus complète de plantes à propriétés nématicides.

PARTIE II : ETAT DE L'ART SUR LES CROTALAIRES – CADRAGE DU SUJET DE RECHERCHE

PARTIE II : ETAT DE L'ART SUR LES CROTALAIRES - CADRAGE DU SUJET DE RECHERCHE

Les crotalaires sont des espèces de la famille des *Fabaceae*. Il existe environ 550 espèces de plantes appartenant au genre *Crotalaria*. C'est une espèce herbacée terrestre, annuelle, dressée, pouvant atteindre jusqu'à 150 cm de hauteur ; la racine est pivotante, de couleur blanche ou brune ; la tige cannelée, pleine, glabre, avec présence de stipules ; les feuilles sont le plus souvent trifoliolées, alternes spiralées, pétiolées ; la fleur est hermaphrodite, et l'inflorescence regroupée en grappe terminale, pédonculée à 5 pétales, le plus souvent jaunes (l'étendard, les 2 ailes, la carène). Le fruit est une gousse arrondie. La graine est de forme réniforme. La reproduction et la dissémination se font par graines.

Figure 5. Exemple de crotalaire poussant en milieu naturel.

Pour tenter d'approfondir l'état des connaissances sur l'interaction entre crotalaires et nématodes, **deux études complémentaires ont été réalisées** :

i) **une revue analytique des molécules biochimiques** présentes chez les crotalaires, leur lieu d'extraction, et leur effet potentiel contre les nématodes ;

ii) **une méta-analyse relative aux expérimentations** réalisées sur l'utilisation de crotalaires dans la lutte contre les nématodes phytoparasites, ceci, en vue de dégager des hypothèses sur les voies de recherche à développer pour prétendre à une meilleure maîtrise des crotalaires dans la nématorégulation des systèmes de culture.

II.1. Inventaire des propriétés biochimiques des crotalaires

La recherche a porté dans un premier temps, sur l'identification des familles de composés retrouvées de façon générale chez les crotalaires puis, sur celles possédant potentiellement des effets nématorégulateurs. Dans une seconde étape, une recherche d'articles a été réalisée en fonction des familles de composés retenues précédemment.

II.1.1. Méthodologie d'analyse

La démarche adoptée procède i) de l'inventaire des articles portant sur le sujet, ii) de la création d'une base de données permettant de recenser et d'harmoniser les principaux traits descriptifs pour en faire une analyse statistique. L'analyse a porté sur tous les articles recensés dans ISI Web of Knowledge parus sur le sujet dans l'intervalle 1939-2012, en excluant tous ceux n'étant pas publiés dans des revues à comité de lecture (ACL).

Une base de données analytique a été créée à cet effet permettant de décrire chaque expérimentation de manière détaillée (Tableau 4).

Tableau 4. Déclinaison des critères pris en compte pour la revue analytique.

Critères
Grandes familles de molécules
Famille
Sous famille
Molécules
Crotalaires
Analyses biochimiques réalisées
Action, effet dans la littérature
Effet observé dans l'article
Partie de la plante
Année
Revue
Auteurs

II.1.2. Articles publiés de 1939 à 2012

Le premier article recensé traitant de l'analyse biochimique des crotalaires date de 1939. Depuis, le nombre d'articles traitant du sujet a cru régulièrement (toutes proportions gardées) pour atteindre le chiffre de 95 articles en 2012 (Figure 6). Ces articles sont généralement répertoriés dans un éventail de 24 revues, la majorité étant publiée dans *Phytochemistry* (42 %) et dans *Journal of Natural Product* (11 %).

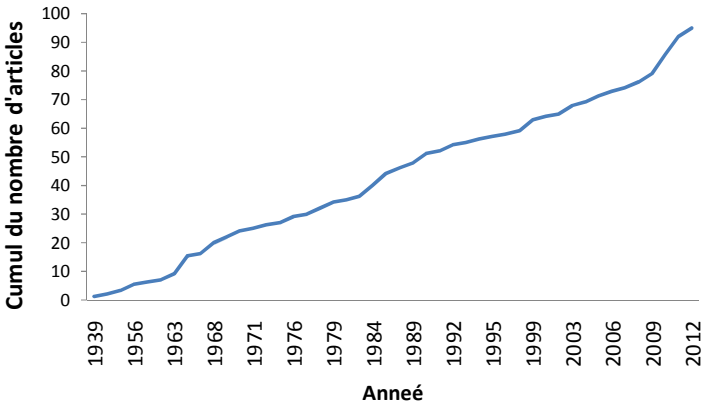


Figure 6. Evolution du nombre d'articles publiés, traitant de l'analyse biochimique des crotalaires.

II.1.3. Analyses biochimiques réalisées sur les crotalaires

Dans ces 95 articles, 121 crotalaires ont été analysées, *C. juncea* et *C. axillaris* étant les deux espèces les plus étudiées (Figure 7).

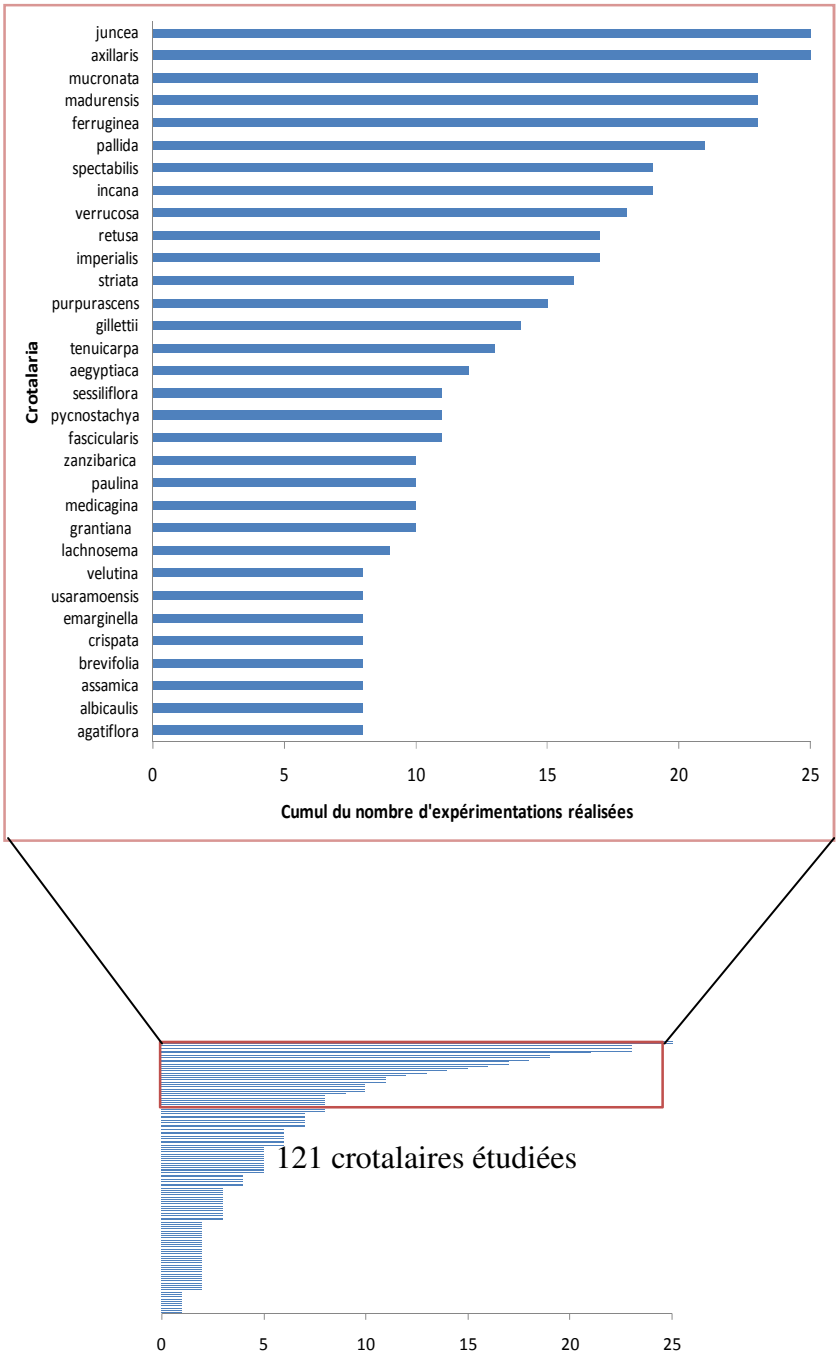


Figure 7. Crotalaires dont la fréquence d'étude est supérieure à 8 (~20% de l'analyse totale).

II.1.4. Molécules présentes chez les crotalaires et localisation dans la plante

Les familles de molécules répertoriées lors de cette synthèse sont celles qui potentiellement possèdent un pouvoir nématorégulateur. Dix sept ont été retenues et deux de ces familles de molécules sont majoritairement représentées. En effet, les pyrrolizidines alcaloïdes (PAs) représentent 79% des analyses réalisés, et les flavonoïdes 12% (Figure 8).

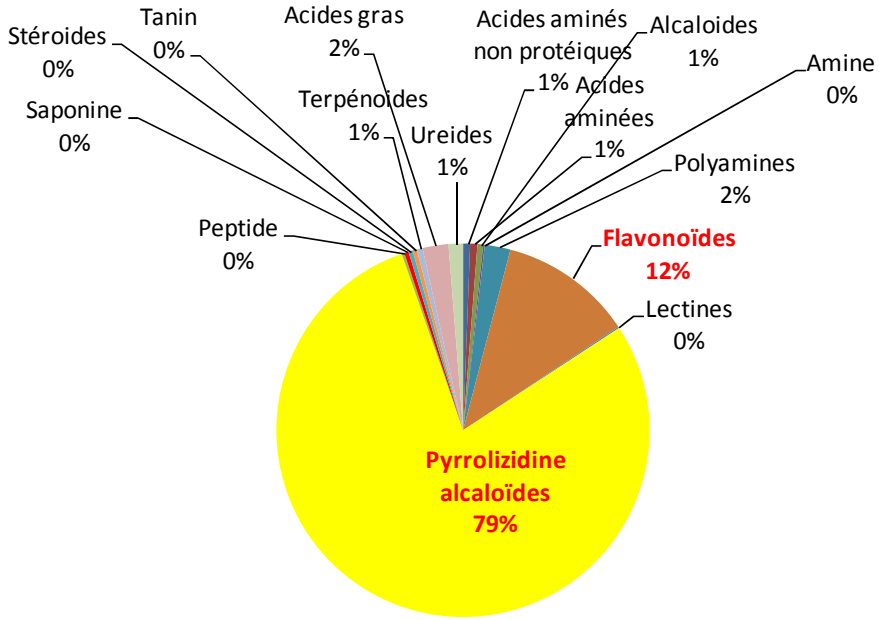


Figure 8. Molécules étudiées chez les crotalaires.

Les pyrrolizidines alcaloïdes ont été identifiés de façon générale dans l'ensemble des parties aériennes de la plante (feuilles, fleurs, tiges, etc.) mais plus précisément dans les graines pour 51 % des cas et dans les jeunes pousses pour 15 % (Figure 9), tandis que les flavonoïdes sont retrouvés au niveau de l'ensemble de la plante (Figure 10).

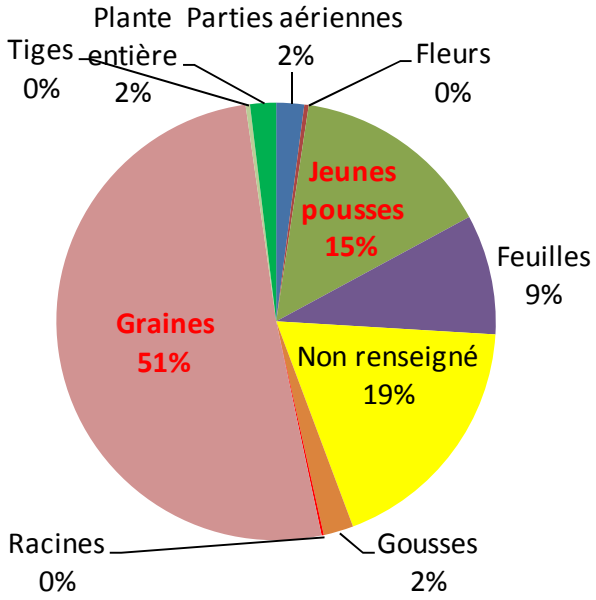


Figure 9. Localisation des pyrrolizidines alcaloïdes dans la plante.

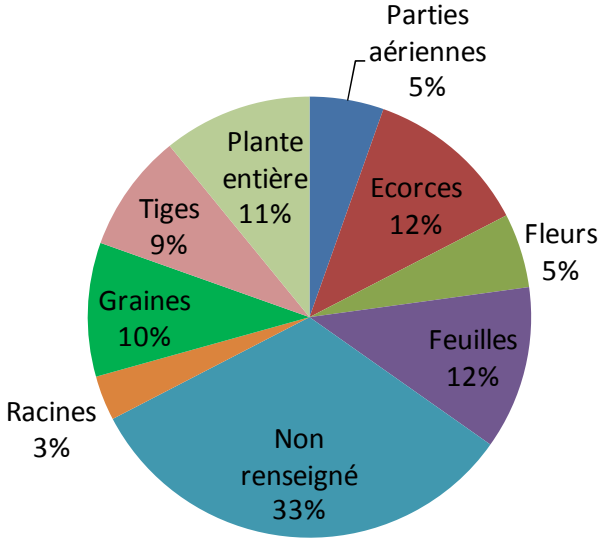


Figure 10. Localisation des flavonoïdes dans la plante.

Les graines et les jeunes pousses sont les parties de la plante où les pyrrolizidines alcaloïdes sont les plus recherchés, car, concernent des travaux portant sur la recherche de molécules toxiques pour l'animal lors de leur ingestion.

II.2. Méta-analyse du système « crotalaires / nématodes »

II.2.1. Méthodologie d'analyse des interactions « crotalaires/nématodes »

La démarche adoptée procède i) de l'inventaire des articles portant sur le sujet, ii) de la création d'une base de données permettant de recenser et d'harmoniser les principaux traits descriptifs pour en faire une analyse statistique. L'analyse a porté sur tous les articles recensés

dans ISI Web of Knowledge, incluant ceux présentés dans la revue de Wang, et parus sur le sujet dans l'intervalle 2002-2012. L'analyse exclut tous les articles n'étant pas publiés dans des revues à comité de lecture (ACL).

La Méta-Analyse à été réalisée selon la méthode de Revue Systématique de la Littérature (MARSL), permettant de décrire chaque expérimentation de manière détaillée (Tableau 5). L'idée était d'effectuer une analyse 'multicritère' prenant en compte i) les espèces de crotalaires, ii) les nématodes cibles, iii) le type de culture, iv) le type d'expérimentation, iv) les résultats obtenus (taux de contrôle des nématodes concernés, performances des cultures, etc.). Etant donné qu'un même article peut rassembler plusieurs expérimentations complémentaires avec différents types de crotalaires ou de nématodes, et des modalités expérimentales différentes (laboratoire, serre, champ cultivé), il nous a paru judicieux de privilégier comme entrée principale 'la modalité expérimentale' comme critère pour l'analyse statistique.

Tableau 5. Déclinaison des critères pris en compte pour la méta-analyse.

Critères
Crotalaires cibles
Traits fonctionnels recherchés
Nématodes visés
Type de nématodes
Type de réaction provoqué par le nématode
Lieu de l'expérimentation
Climat
Sol, substrat
Mode expérimental (champs, serre, laboratoire)
Type d' expérimentation (rotation, association, amendement…)
Mesures effectuées (Pf/Pi,…)
Hôte, non hôte, pauvre hôte
Rémanence
Effet sur le nématode visé
Autres effets
Revue
Année
Auteurs

II.2.2. Evolution de la thématique crotalaires/nématodes

Dans la bibliographie, de nombreuses utilisations des crotalaires sont répertoriées. Selon la synthèse présentée par Wang et al. (2002), les plantes de cette famille permettraient le contrôle d'un large spectre de nématodes, mais seraient également utiles pour divers services annexes (apport d'éléments nutritifs, plante de couverture, etc.).

La figure 11 présente l'évolution cumulée de la production scientifique traitant de l'interaction entre crotalaires et nématodes. Quatre vingt huit articles ACL ont été écrits sur le sujet entre 1928 et 2012.

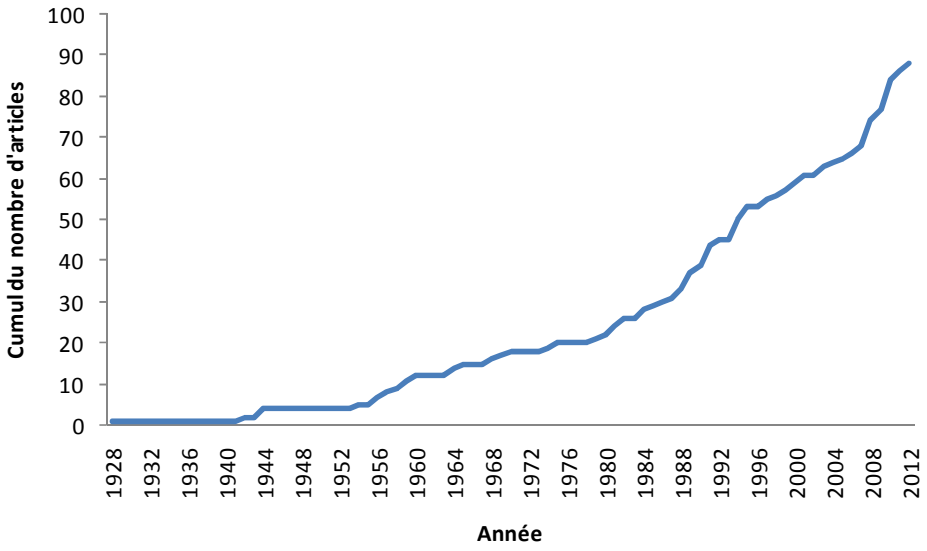


Figure 11. Evolution des publications (articles ACL) sur la thématique « crotalaires/nématodes » de 1928 à 2012.

Les articles sont publiés dans 30 revues, dont trois dominantes : *Journal of Nematology* (20 %), *Nematropica* (16 %) et *Nematologia Brasilaera* (16 %).

II.2.3. Crotalaires étudiées pour leurs effets nématorégulateurs

La plupart des recherches menées concernant le genre *Crotalaria* portent sur *C. juncea,* et *C. spectabilis* (Figure 12).

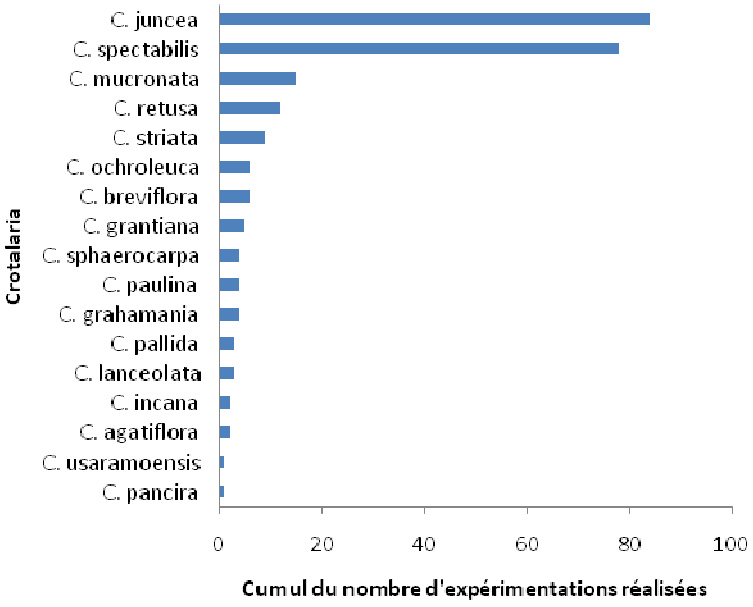


Figure 12. Nombre d'expérimentations réalisées pour différentes espèces de crotalaires sur la période allant de 1928 à 2012.

II.2.4. Réponse nématorégulatrice des principales crotalaires envers les différents types de nématodes selon différents modes expérimentaux

Dans le cadre de la lutte contre les nématodes, les crotalaires sont utilisées de 2 façons différentes :

i) en temps que **plante de couverture** dans des rotations culturales, où, dans la majorité des cas, une diminution des populations de nématodes est observée

(Guérout, 1969 ; Huang et al., 1981 ; Moura, 1991 ; McSorley et al., 1994). Généralement, ces plantes utilisées lors de rotations, finissent par être enfouies au sol pour être utilisées comme engrais verts. Cette technique permet dans un premier temps un apport en éléments minéraux, (notamment en azote car il s'agit d'une légumineuse), mais aussi semble très efficace pour réduire les populations de nématodes (Sharma et Scolari, 1984 ; Gongaza et Ferraz, 1994 ; Rich et Rahi, 1995). Ce type d'utilisation permet également de lutter contre l'érosion des sols, de réduire la présence de certaines adventices (propriétés herbicides conférées par les propriétés allélopathiques), ou encore de diminuer le compactage du sol ;

ii) en **culture intercalée**, ce qui permet de diminuer les populations de certains phytoparasites, mais aussi d'améliorer significativement les rendements des récoltes concernées (Charles, 1995).

Les racines d'une plante sont constamment exposées à de nombreux stress biotiques et abiotiques, concourant à la sécrétion d'un éventail de composés biochimiques, permettant une protection contre des influences négatives, ou une stimulation des interactions positives. Une modulation de la nature, de la qualité, ou de la quantité des composés biochimiques contenus dans les exsudats racinaires peut être observée selon différentes conditions environnementales :

- composition différente des composés contenus dans les exsudats racinaires en fonction des moyens employés pour la croissance des plantes (ex : utilisation ou pas de solution nutritive) (Jones, 1998) ;
- augmentation des métabolites secondaires qui servent à augmenter la disponibilité des nutriments en cas de carence (Jones, 1998) ;

- modulation du processus d'exsudation en fonction de la température (Bekkara et al., 1998), de la lumière (rythme diurne provoquant une modification de la photosynthèse) (Hughes et al., 1999 ; Watt et Evans, 1999), humidité du sol (anaérobie ou aérobie) (Rivoal et Hanson, 1994 ; Xia et Roberts, 1996) ;
- sécrétion de molécules pour détoxifier le sol si présence ou absence de minéraux particuliers ou de métaux toxiques (Ma, 2000 ; Liao et al., 2006 ; Wang et al., 2006) ;
- sécrétion de molécules (ex : acide oxalique) qui permettent la détoxification de molécules produites par d'autres plantes (e.g. catéchine) par oxydation, par conjugaison d'hydrates de carbone, ou par séquestration (Inderjit et Duke, 2003) ;
- quantité et qualité des exsudats racinaires qui varient en fonction du stade de développement de la plante (faible quantité au stade plantule, puis augmentation jusqu'au stade fleur, puis diminution lors de la maturation) (Aulakh et al., 2001 ; Garcia et al., 2001), ou des différents génotypes au sein d'une même espèce (Fletcher et Hegde, 1995) ;
- selon la zone de la racine concernées, les composés sécrétés sont différents (Marcar et al., 2006) ;
- modulation des exsudats racinaires en fonctions des microorganismes présents au niveau du sol, et en fonction des plantes avoisinantes présentes (De-la-Pena et al., 2008).

Une analyse a été réalisée sur le comportement des quatre principales crotalaires étudiées (Figure 13) (*C. juncea, C. spectabilis, C. mucronota, et C. retusa*) vis-à-vis de différents types de nématodes, et en fonction du choix expérimental (champ, serre, laboratoire). Nous observons i) que les nématodes les plus étudiés sont du type endoparasites sédentaires, ii) que

les réponses nématorégulatrices obtenues sont en majorité de type non-hôte, voire pauvre-hôte, quelque soit le type de nématode considéré.

De plus, il existe une variation des réponses en fonction du mode expérimental retenu. En effet, si l'on observe les réponses obtenues pour les différents types de nématodes, on note que celles obtenues au champ varient beaucoup plus que celles obtenues en serre ou en laboratoire. Il est à souligner, néanmoins, que quelque soit le mode expérimental choisit, la majorité des réponses reste de type « non hôte ».

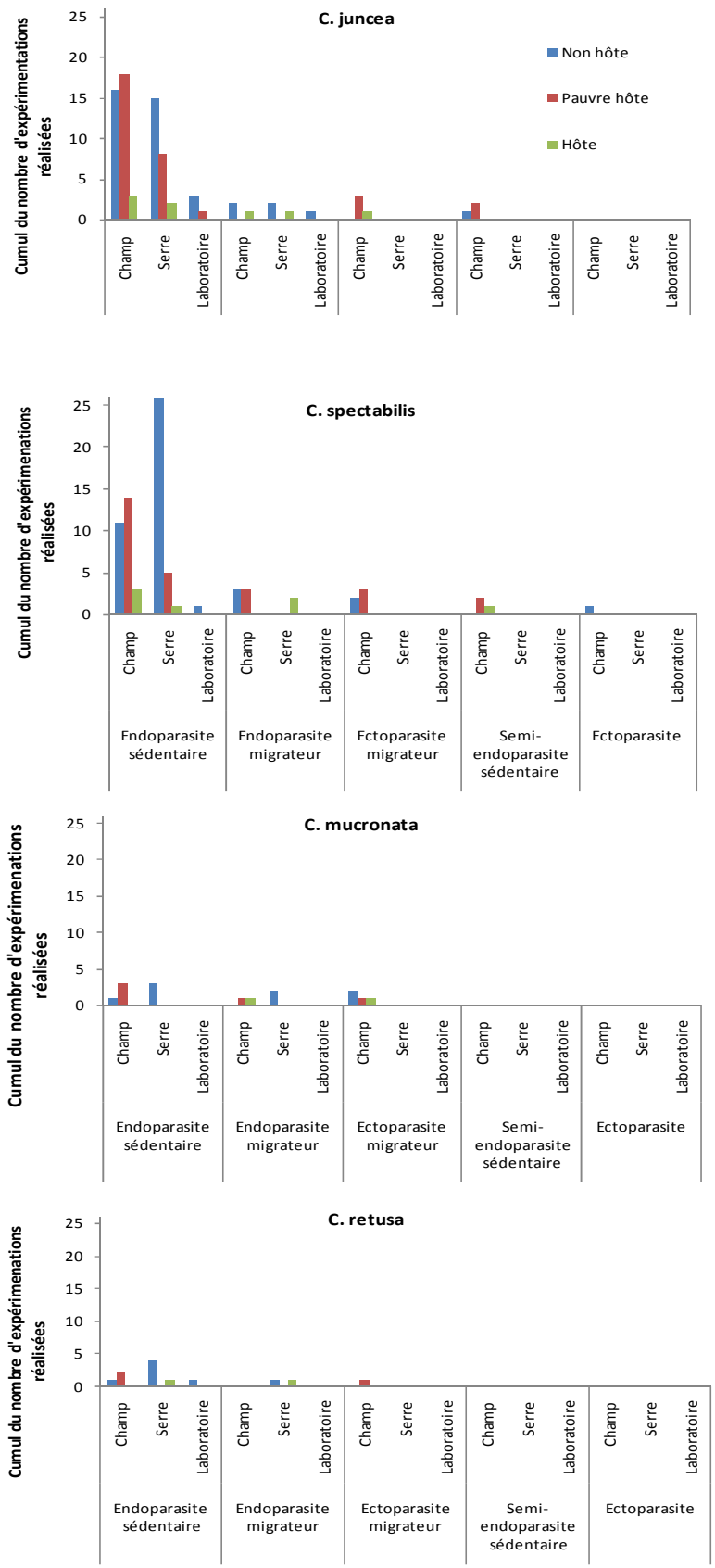


Figure 13. Analyse du comportement de quatre variétés de crotalaires en présence de différents types de nématodes, selon trois modalités expérimentales.

L'analyse révèle une grande diversité de conditions expérimentales (milieux, protocoles, combinaisons « crotalaires/nématodes », …) rendant parfois difficile l'évaluation objective des propriétés nématicides des crotalaires, et de leur expression. La méta-analyse réalisée permet néanmoins, de dégager des éléments de diagnostic, de discuter de la portée des résultats obtenus en fonction des conditions expérimentales, et de proposer des pistes d'amélioration. Ainsi, le mode de conduite est-il déterminant vis-à-vis du nématode cible. Par exemple, il n'y pas d'intérêt de recourir à des crotalaires en association sur des nématodes endoparasites stricts. De même, quand les résidus de crotalaires sont enfouis dans le sol, il est nécessaire d'utiliser du matériel sain lors de la replantation. Enfin, afin d'optimiser l'efficacité des crotalaires en rotation/jachère, il est nécessaire que cette dernière soit non hôte strict.

A l'avenir, si l'on veut démontrer clairement l'effet des crotalaires sur les différents nématodes, il sera nécessaire de définir un protocole standardisé fondé sur les modalités suivantes :

i) Multiplier les essais d'une même variété de crotalaire sur des cultures sensibles.

ii) Multiplier les essais avec différentes variétés de crotalaires sur sol contaminé.

iii) Vérifier en fin de culture, le caractère non hôte des crotalaires testées.

iv) Vérifier le taux de pénétration, et le taux de développement sur les crotalaires.

v) Vérifier l'effet suppressif par incorporation.

vi) Vérifier la population finale dans le sol.

II.3. Démarche de recherche

II.3.1. Cadrage de la question de recherche

L'analyse préliminaire des travaux réalisés confirme que des espèces du genre *Crotalaria* peuvent être de bonnes candidates pour la nématorégulation. Les principales hypothèses relatives aux traits exploitables recherchés chez les espèces étudiées sont i) le caractère non-hôte, ne permettant pas au nématode de se reproduire, ou bloquant la progression des nématodes dans les tissus infestés en émettant des molécules toxiques pour ces derniers; ii) la production de molécules par les exsudats racinaires à effet nématicide, némato-statique ou répulsif, qui peuvent être libérées dans le sol. Ces molécules peuvent potentiellement agir sur des phases du cycle de reproduction du nématode se déroulant dans le sol.

La synthèse révèle par ailleurs, que des observations contradictoires subsistent sur les effets escomptés, que très peu de travaux portent sur les mécanismes mis en jeu, et qu'aucune réflexion sur la modulation des propriétés nématorégulatrices des plantes concernées n'a été véritablement mise en œuvre en vue d'optimiser les possibilités de contrôle des nématodes. Selon Mazid et al. (2011), le mode de conduite, les conditions biotiques et abiotiques de l'environnement peuvent être en effet déterminants du comportement biochimique des plantes et de leur effet sur les organismes en interaction. Leur composition biochimique est également susceptible de varier en fonction du stade de développement de la plante et de son état physiologique (âge, plante saine ou malade) (Figure 14).

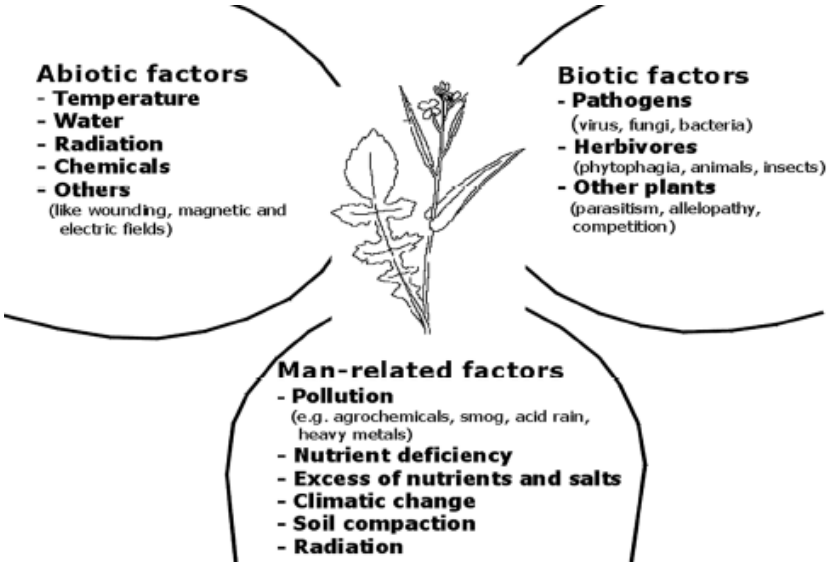


Figure 14. Facteurs biotiques, abiotiques, et facteurs techniques pouvant affecter la composition biochimique des plantes (d'après Mazid et al., 2011).

Les résultats de la méta-analyse confortent en effet, cette hypothèse de l'influence des conditions expérimentales (propriétés biotiques et abiotiques, mode de conduite) sur l'efficacité de la nématorégulation, à travers la variabilité des réponses selon la variété de crotalaire considérée, et le type de nématode visé.

La synthèse des travaux sur le fonctionnement biochimique des crotalaires, et sur les interactions crotalaires/nématodes nous permet de circonscrire notre **question de recherche** à **la compréhension du déterminisme biochimique des exsudats racinaires de crotalaires en relation avec des conditions de l'environnement racinaire, et son activité nématorégulatrice**.

II.3.2. Objectif scientifique, hypothèses de travail, et stratégie expérimentale

Le postulat privilégiant l'hypothèse du déterminisme biochimique des exsudats racinaires des crotalaires sous l'effet de conditions du milieu en relation avec leur capacité nématorégulatrice, est celui que nous approfondirons dans notre étude pour tenter d'expliquer une part de la variabilité des réponses observées.

Pour appréhender cette question, il était crucial de se situer d'emblée dans le cadre des interactions complexes crotalaires/nématodes au sein du système dit « **CROSYNERS** », nous permettant d'analyser les composantes interactives, et les modalités de variation traitées, mettant en jeu :

- les crotalaires : **CRO**
- les symbiotes (champignon mycorhizien + rhizobium) : **SY**
- les nématodes : **N**
- les exsudats racinaires : **ER**
- les substrats : **S**

Ce cadre expérimental qui constitue l'une des aspects originaux de ce travail de thèse - en comparaison avec des approches plus réductrices s'affranchissant de la variabilité de paramètres du milieu -, sera mis en perspective pour la compréhension du fonctionnement des crotalaires, et ce, dans une approche générique, visant à être étendue par la suite, à d'autres plantes de service à propriétés nématorégulatrices. La finalité consiste à mieux comprendre le comportement de ce système pour en maîtriser la conduite dans des stratégies de lutte raisonnée contre les populations de nématodes phytoparasites.

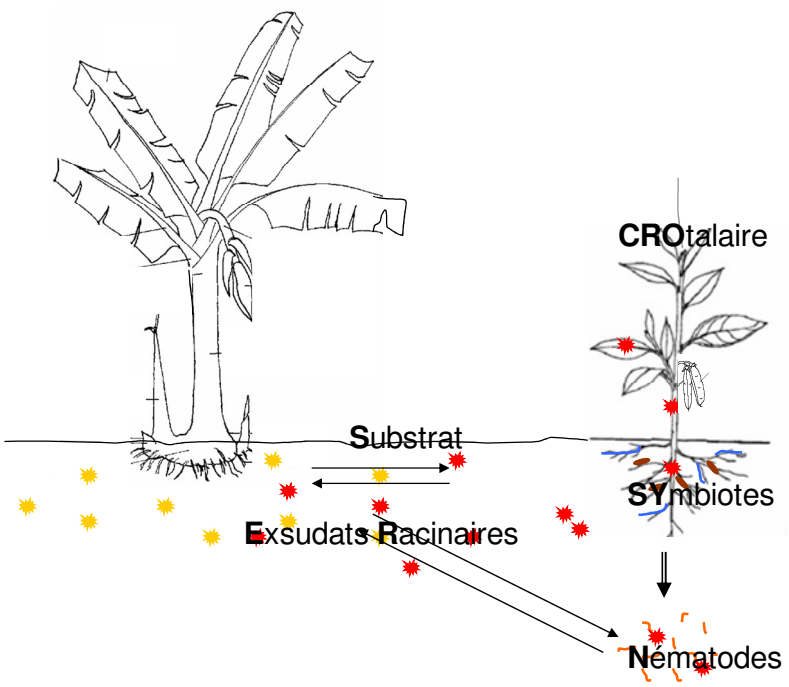


Figure 15. Le système « CROSYNERS ».

Un tel **<u>objectif scientifique</u>** procède d'un **<u>enjeu expérimental et méthodologique fort</u>**. Aussi, pour prétendre à la compréhension de ces mécanismes, il est indispensable i) de d'extraire les exsudats racinaires, en se rapprochant autant que possible des conditions dans lesquelles ils sont émis dans la rhizosphère, ii) de pouvoir disposer des techniques de dosages biochimiques permettant de différencier les effets produits par la modification de conditions définies du milieu iii) de concevoir des biotests permettant d'évaluer les effets nématorégulateurs.

i) **Dans le domaine de la récupération des exsudats racinaires**, des travaux pionniers réalisés par Tang et Young, (1982), ont permis la mise au point de la technique du **CRETS « Continuous Root Exudate Trapping System »**, permettant la récupération de lixiviats en flux continu sur une colonne collectrice contenant une résine (XAD-4) permettant la fixation des molécules émises par les exsudats racinaires. Cette résine ne retient que les composés hydrophobes et partiellement hydrophobes, et ceci jusqu'à saturation (3 jours).

Le CRETS comporte néanmoins un certain nombre d'inconvénients qui le rendent inapproprié aux objectifs fixés :

- la récupération sur 3 jours favorise la photolyse de molécules ;
- l'usage de solvants est requis pour décrocher les molécules fixées par la résine. Ceci nécessite une élution par du méthanol ou de l'éthanol non compatible avec des biotests sur des nématodes, car entachant la composition biochimique des exsudats racinaires;

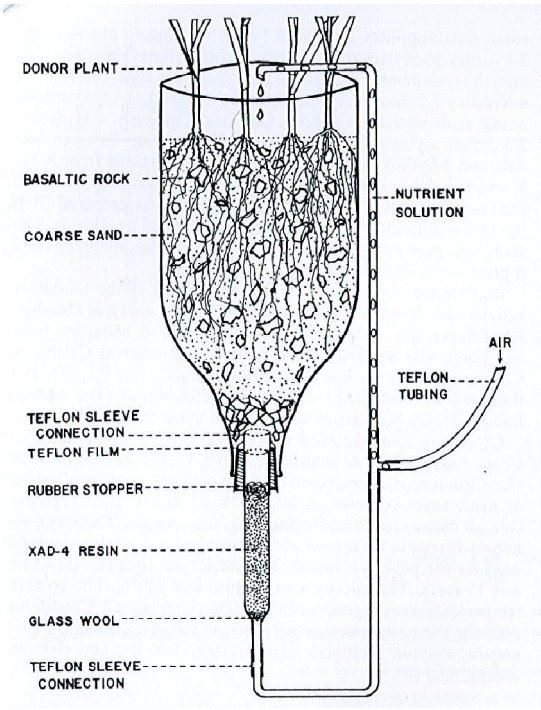


Figure 16. Système CRETS de récupération des exsudats racinaires.

- de même, l'évaporation du solvant d'élution nécessite de passer les éluats au rotavapor à une température de 60 °C ; or, au delà de 45 °C certains composés phénoliques sont dénaturés.

Ainsi, cette méthode présente-t-elle le défaut majeur de récupérer des lixiviats et non les exsudats racinaires proprement dits, et recourt à des techniques pouvant altérer la qualité des exsudats racinaires. La **méthode des plantes à traire** mise au point par deux chercheurs de

l'INRA de Nancy, E. Gontier et A. Clément, et brevetée en 1999, présente dans ce cadre, un intérêt particulier (cf. méthodologie présentée dans le chapitre Matériel et Méthodes).

ii) **Concernant les techniques de dosage biochimique**, il existe un éventail de méthodes permettant de réaliser les analyses requises. Le tableau 6 présente une description synthétique de ces techniques et de leurs avantages et inconvénients.

La partie expérimentale de ce travail de thèse consistera, sur la base du cadrage réalisé, à définir les traitements minimum appropriés pour appréhender de manière générique l'effet de de la modification de conditions du milieu, sur le déterminisme biochimique des exsudats racinaires de crotalaires, et leur efficience némato- régulatrice. Cela consistera à réaliser des traitements contrastés sur les différentes composantes du système CROSYNERS.

L'objectif de ce travail de recherche est double. Il vise à :

- travailler sur les exsudats racinaires propres à la plante (méthode Gontier et al., 2002), et non sur un lixiviat de sol (méthode Tang et Young, 1982), afin de pouvoir mesurer uniquement les effets nématorégulaleurs propres aux différentes plantes étudiées,
- évaluer l'effet des traitements sur le déterminisme biochimique des plantes étudiées et leur aptitude à la nématorégulation.

Tableau 6. Technique de dosage biochimique envisageable pour les analyses biochimiques.

Technique	Principe	Avantages	Contraintes et/ou inconvénients (à notre niveaux)
HPLC (High-performance liquid chromatography UV-visible-MS	Technique utilisée pour séparer un mélange de composés en chimie analytique et en biochimie, dans le but d'identifier, de quantifier et de purifier des composants individuels d'un mélange.	Analyse des résultats en fonction du temps de rétention et de la m/z* → résultats très pointus Permet de donner une image de l'état d'un être vivant à un instant donné, donc de ses capacités fonctionnelles Limites de détection de l'ordre du µg/ml en UV	Nécessite une mise au point expérimentale lourde : choix des colonnes, des solvants, des gradients, des longueurs d'ondes Requiert un travail de collaboration ou une mutualisation de moyens avec base de données disponibles.
HPTLC (Hight Performance Thin Layer Chromatography)	Technique basée sur la séparation des constituants d'un mélange entre une phase stationnaire et une phase mobile par le biais de leurs caractéristiques de polarité.	Possibilité de traiter simultanément plusieurs échantillons (jusqu'à 72) dans des conditions identiques. Clarté inégalée et évaluation visuelle simultanée de tous les échantillons et composants des échantillons. Simplification de la préparation d'échantillons grâce à un usage unique de la phase stationnaire. Technique très flexible dont les différents paramètres peuvent être modifiés à l'infini. Limites de détection de l'ordre du ng/spot.	Pour une même famille de molécules il est possible d'utiliser différents solvants de migrations, différents révélateurs, la plaque de dépôt peut être pré-conditionnée ou pas avec différents niveau d'humidité, et la distance de migration peut être plus ou moins importante en fonction des résultats désirés → mise au point à réalisée en fonction de nos besoins (travail sur exsudats racinaires)
Spectrophotométrie visible	Méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution.	Technique maîtrisée au sein du Laboratoire d'analyse (INRA – UR ASTRO) Limites de détection de l'ordre du µg/ml	Nombreux protocoles expérimentaux existants → nécessite une phase de tests des différents protocoles proposés, suivi d'une mise au point expérimentale en fonction des besoins spécifiques de l'étude.
GC-MS	Technique permettant d'analyser simultanément plusieurs centaines de métabolites à partir d'un extrait total; cette technique permet donc d'obtenir le métabolome.	Analyse des résultats en fonction du temps de rétention et de la m/z → résultats très pointus Permet de donner une image de l'état d'un être vivant à un instant donné, donc de ses capacités fonctionnelles	Nécessite une mise au point expérimentale lourde : choix des colonnes, des solvants, des gradients, des longueurs d'ondes Requiert un travail de collaboration ou une mutualisation de moyens avec base de données disponibles.

*m/z : la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

III.1. Conception du dispositif expérimental

Le test de mes hypothèses de recherche a requis l'élaboration d'un dispositif expérimental très complet, comportant :

i) Un dispositif de production d'inoculum de nématodes nécessitant une chambre de culture pour l'élevage et la multiplication des nématodes, un dispositif d'extraction, et le matériel pour l'observation et la reconnaissance des nématodes.

ii) Un dispositif de préparation et conditionnements de substrats.

iii) Un dispositif de production, et de collecte d'exsudats racinaires en conditions contrôlées.

iv) Une chaîne de conditionnement des exsudats, et d'analyses biochimiques.

v) Un dispositif pour la réalisation des biotests.

Au vu de l'éventail des conditions biotiques, ou abiotiques que nous aurions pu tester, nous avons dû faire des choix concernant, le nombre de traitements, et le nombre d'échantillons à observer, et à analyser. Le tableau 7 en récapitule les modalités. Les raisons de ces choix sont développées dans la suite de ce chapitre. Celles concernant les choix techniques (récupération des exsudats racinaires, les biotests, et les analyses biochimiques), ont été explicités dans le chapitre précédant.

Tableau 7. Récapitulatif des principaux choix expérimentaux réalisés.

Composante expérimentale	Choix à effectuer		Choix réalisé
Conditions biotiques	Variétés de crotalaire	*C. retusa* *C. spectabilis* *C. pallida*	*C. retusa* *C. spectabilis*
	Nématode	*R. similis* *M. arenaria* *P. coffeae*	*R. similis* *M. arenaria*
	Symbiotes	*Glomus intaradices* (Champignon mycorhizien)	*Glomus intaradices* (Champignon mycorhizien)
		Souche de rhizobium sélectionnée suite à des tests de nodulations	Souche de rhizobium présente de façon naturelle
Conditions abiotiques	Substrat	Andosol Nitisol Gravier + coton Silice + Grain d'eau	Nitisol Silice + Grain d'eau
Récupération des exsudats racinaires	CRETS Plante à traire		Plante à traire
Analyse biochimiques	HPLC UV-visible HPTLC Spectrophotométrie-visible GC-MS		Spectrophotométrie-visible GC-MS
Biotests	en mg/ml en nombre de plante		Nombre de plante

III.2. Optimisation du dispositif expérimental

III.2.1. Choix du matériel végétal

Les variétés de crotalaires inventoriées sont des espèces présentes sur le territoire guadeloupéen et sont identifiées comme ayant des propriétés non-hôte vis-à-vis de nématodes (Wang, et al., 2002).

Vingt espèces de crotalaires sont répertoriées aux Antilles :

- *C. berteriana*
- *C. brevidens*
- *C. breviflora*
- *C. guatemalensis*
- *C. incana*
- *C. juncea*
- *C. lanceolata*
- *C. micans*
- *C. misorensis*
- *C. pallida*
- *C. pilosa*
- *C. pumila*
- *C. purdiena*
- *C. quinquefolia*
- *C. retusa*
- *C. spectabilis*
- *C. stipularia*
- *C. verrucosa*
- *C. vitellina*
- *C. zanzibarica*

Parmi ces vingt espèces de crotalaires, deux espèces - *C. retusa* et *C. spectabilis*- ont été retenues pour notre étude. Elles figurent en effet, parmi les crotalaires les plus étudiées pour leurs vertus némato- régulatrices et reconnues pour leur efficacité (Wang et al., 2002).

III.2.1.1. Crotalaria retusa

C. retusa est une plante dressée, mesurant jusqu'à 1 m de hauteur (Figure 17). Ses feuilles sont alternes, simples et entières avec un limbe obové, rétusé, portant deux stipules très réduits à la base. Ses fleurs sont disposées en grappes terminales. Sa corolle est jaune, avec un étendard très arrondi et légèrement strié de rouge. Enfin, son fruit est une gousse cylindrique terminée par un bec oblique contenant des graines réniformes.

Figure 17. Photos de *C. retusa* (feuille, tige, gousses, fleurs, graines).

III.2.1.2. Crotalaria spectabilis

C. spectabilis une plante dressée, pouvant mesurer jusqu'à 170 cm de hauteur (Figure 18). Ses feuilles sont alternes, mesurant de 2 à 6 pouces de long, plus larges au sommet et s'effilant vers la base ; elles sont sans poils sur la surface supérieure et couverte de poils sur la surface inférieure, et présentent des stipules à la base des pétioles qui ne persistent que pendant une courte période. Ses fleurs jaunes, grandes, voyantes, et de couleur vive sont individuelles ; elles se produisent sur les inflorescences allongées, et autour d'un axe central. Les tiges de fleurs sont bractées à leur base. Enfin, le fruit est une gousse cylindrique, terminée par un bec oblique contenant des graines réniformes de couleur noire.

Figure 18. Photos de *C. spectabilis* (feuille, tige, fleurs, graines).

III.2.1.3. Bananier Musa spp.

Les bananiers forment le genre *Musa*. Ce sont des plantes monocotylédones vivaces de la famille des *Musaceae*. Il est d'usage de dire, un peu abusivement, que c'est « la plus grande herbe du monde » (Figure 19). Ce genre comprend environ soixante espèces, toutes tropicales, dont plusieurs sont largement cultivées pour la production de bananes.

Les bananiers desserts (*Musa spp.)* sont particulièrement exposés aux dégâts causés par les nématodes qui fragilisent leur système racinaire, et leur ancrage au sol, ce qui les rend très vulnérables aux coups de vents qui provoquent leur verse (Figure 20). Le nématode du bananier, *Radopholus similis,* et les nématodes à lésion du genre *Pratylenchus*, comme *P. coffeae* et *P. goodeyi*, détruisent sévèrement les tissus corticaux, et réduisent les divisions racinaires, la nutrition hydrique et minérale, ainsi que l'ancrage. D'autres espèces de nématodes, comme les nématodes à galles (Figure 21), du genre *Meloidogyne*, peuvent également interférer avec l'absorption hydrique et minérale, avec pour conséquence, un ralentissement de la croissance végétale et une diminution de la production. Au champ, les pertes de récoltes, qui se traduisent par la chute des plants, la diminution des poids de régime et la diminution de la longévité des plantations, sont influencées par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Parmi ceux- ci, les facteurs les plus importants à considérer sont la sensibilité de la variété de bananier considérée, et le pouvoir pathogène des nématodes. En Guadeloupe, les pertes de rendements causées par les nématodes sont de l'ordre de 30 %. Le bananier constituera le témoin « plante sensible » dans notre dispositif expérimental.

Figure 19. Photo de bananier du genre *Musa spp.*

Figure 20. Verse de bananier causée par la présence de nématodes.

Figure 21. Racines de bananier infestées par des *Meloidogyne.*

III.2.2. Choix du stade de prélèvement des exsudats racinaires, et choix des substrats

Pour déterminer le stade de prélèvement optimal pour les exsudats racinaires chez les crotalaires (stade le plus précoce auquel correspond la fourniture la plus abondante des exsudats racinaires), nous avons étudié la croissance des deux variétés de crotalaires retenues pour l'étude à 3 stades de développement sur deux types de substrats i) du Nitisol qui est le sol sur lequel on retrouve une grande partie de la production bananière en Guadeloupe, ii) du gravier + coton, pour appréhender l'effet des propriétés physico-chimiques sur la production d'exsudats racinaires :

- Au stade 6-9 feuilles
- 2 mois après la plantation
- Au moment de la floraison (dès l'apparition des premières fleurs)

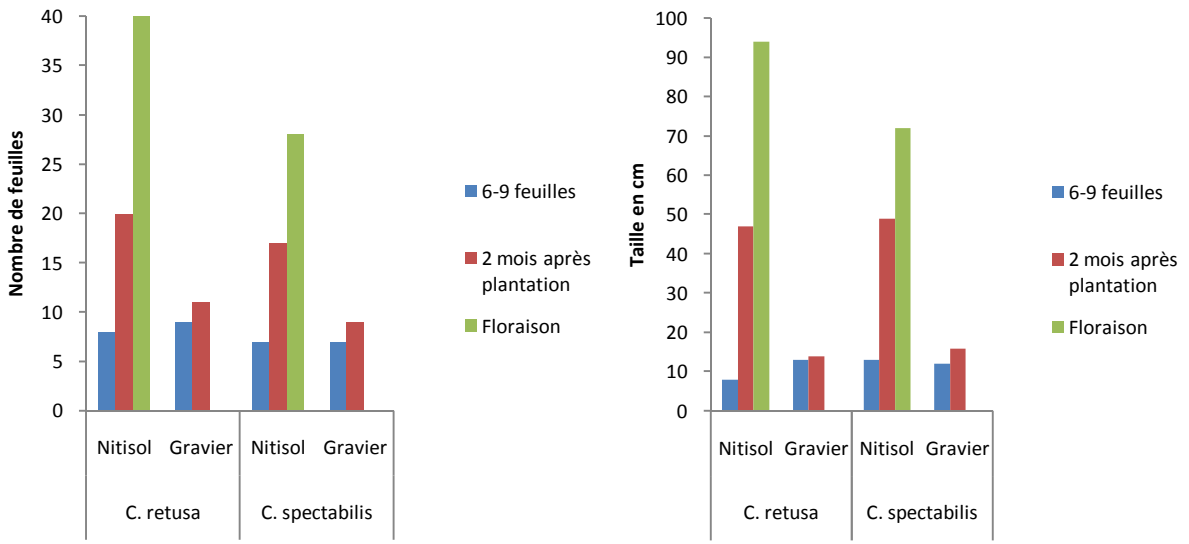


Figure 22. Croissance des crotalaires *C. retusa* et *C. spectabilis* à 3 stades de développement sur deux substrats différents.

Les crotalaires ont été inoculées à l'aide de racines mycorhizées contenant le champignon mycorhizien *Glomus intraradices,* sur les deux substrats différents (Nitisol ou gravier + coton).

Après observation, le meilleur compromis pour le stade de prélèvement des exsudats racinaires est celui correspondant à 2 mois de croissance. Les deux espèces de crotalaires présentent en effet une croissance suffisante permettant la production d'une quantité d'exsudats racinaires en quantité requise pour les analyses à réaliser.

Sur le substrat 'gravier + coton' la croissance des plantes à deux mois est nettement inférieure à celle observée sur le substrat 'nitisol', ces plantes, allant jusqu'à mourir sur 'gravier + coton', et donc, n'atteignent pas le stade floraison. Le substrat 'gravier + coton' n'a donc pas été retenu, et donc abandonné. On s'oriente donc vers un autre substrat artificiel composé de 'silice + grain d'eau'.

III.2.3. Préparation des substrats

Nous avons choisi de travailler sur deux substrats contrastés afin d'en observer l'effet sur le déterminisme biochimique des exsudats racinaires des crotalaires,: i) un sol classique sur lequel on cultive le bananier aux Antilles « le Nitisol » ; ii) un substrat artificiel préparé par nos soins (Quénéhervé et al., 2010).

III.2.3.1. Préparation du nitisol

Le Nitisol (FAO-UNESCO 2006), ou Alfisol / Inceptisol (U.S. Soil taxonomy), a été prélevé sur des parcelles en production bananière en Guadeloupe, à 20 cm de profondeur. Le pH (H20) est de 5,61, le C/N de 12,38, et la capacité d'échange cationique (CEC) de 14,9 cmol

kg-1. Ce sol, une fois recueilli, a été tamisé à l'aide d'un tamis de 1 cm x 0.5 cm de diamètre. Il a ensuite été désinfecté à la vapeur chaude, 2 fois à 100 °C pendant 1h pour éliminer les micro-organismes, et les nématodes présents, puis laissé au repos, et utilisé deux semaines après les deux désinfections.

III.2.3.2. Préparation du subtrat artificiel : silice + grain d'eau

Deux grammes de grain d'eau ® sont mis à tremper dans 200 ml d'eau déminéralisée jusqu'à ce que les grains atteignent 10 fois leur volume initial (Figure 23).

Les grains ainsi imbibés d'eau, sont passés 2 fois dans une seringue munie d'un tamis de 0,25 mm à l'extrémité (Figure 24).

La silice est ensuite ajoutée progressivement au gel en mélangeant à la main avec un gant. Le substrat ainsi obtenu peut être conservé et utilisé ultérieurement.

Figure 23. Illustration de l'augmentation de la taille des grains d'eau après humectation.

Figure 24. Seringue utilisée pour presser, et casser les grains d'eau.

III.2.4. Choix de la composition symbiotique

Les crotalaires sont des plantes considérées aux Antilles, comme des adventices. Ce sont des plantes de la famille des légumineuses, qui vivent en symbiose avec un rhizobium leur permettant de fixer l'azote atmosphérique, et avec un champignon mycorhizien leur facilitant les échanges nutritifs avec le sol (constats vérifiés par des prélèvements sur le terrain, de nodules, afin de réaliser des tests de nodulation, et de racines, afin déterminer les taux de mycorhization sur les espèces sélectionnées). Dans le but de se rapprocher le plus possible des conditions naturelles dans lesquelles poussent les crotalaires, il a été décidé de les inoculer avec la souche de rhizobium sélectionnée suite aux tests de nodulation, mais aussi en présence d'un champignon mycorhizien qui est répandu aux Antilles (*Glomus intraradices*).

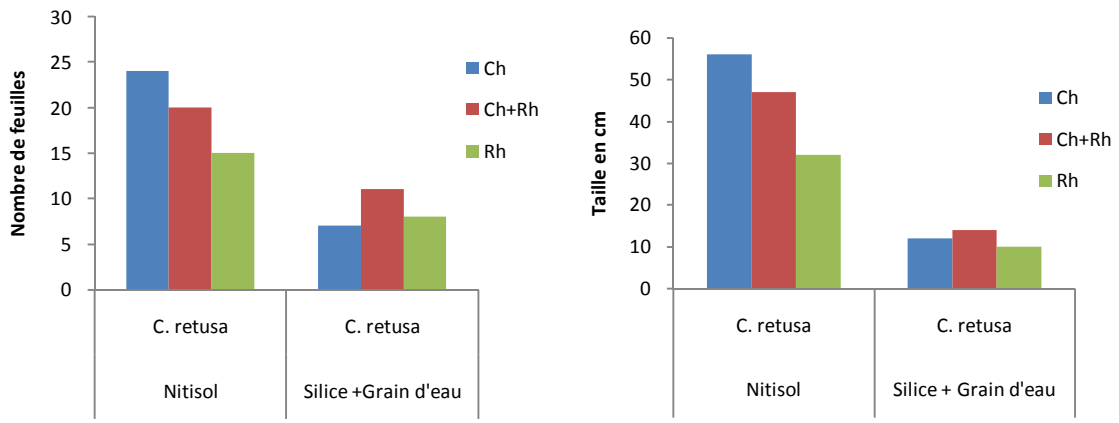


Figure 25. Effet de la combinaison des symbiotes sur la croissance des plantes au bout de 2 mois sur les deux substrats sélectionnés.

Ch : ajout de champignon mycorhizien ; Ch + Rh : ajout de champignon mycorhizien + rhizobium ; Rh : ajout de rhizobium.

Les meilleures croissances sur Nitisol ont été obtenues sur des plantes inoculées avec le champignon seul, alors que les meilleures performances sur 'silice + grain d'eau' sont

obtenues en présence de champignon et de rhizobium (Figure 25). Par la suite, nous n'avons pas fait d'inoculation avec la souche de rhizobium sélectionnée à partir des tests de nodulation, car il y avait une souche naturellement présente, que nous n'avons pas réussit à éliminer, et qui était omniprésente dans tous les traitements.

III.2.5. Choix du nombre de plantes par pot pour la production d'exsudats racinaires

Dans les expérimentations visant à déterminer le choix du stade de prélèvement, et la composition symbiotique, le nombre de plantes est de deux. Or, au vu de l'importance du dispositif et de la place que nécessite de telles manipulations, au lieu d'avoir 2 plantes/pots pour obtenir les 10 plantes au final (soit un total de 5 pots pour obtenir 10 plantes au total), nous avons opté pour 5 plantes/ pots (soit un total de 2 pots pour obtenir les 10 plantes au total). La densité de plantes étant plus importante par pot, leur croissance s'en trouve légèrement diminuée, sans affecter la masse racinaire. Ceci nous permet par ailleurs, de travailler dans des conditions plus proches des densités observées en conditions naturelles.

III.2.6. Extraction des exsudats racinaires par la technique des plantes à traire (PAT)

III.2.6.1.La technique des plantes à traire (PAT) de Gontier et al., 1999

Cette technologie repose sur la récolte non destructrice de métabolites végétaux à partir de plantes cultivées en hydroponie, et pour lesquelles on obtient une excrétion de métabolites à partir des racines. Sa mise en œuvre repose sur deux étapes principales :

- **1ère étape** : Production des métabolites secondaires

La plante est cultivée sur un milieu liquide. Les racines, dont les extrémités trempent dans l'eau, sont régulièrement irriguées avec une solution nutritive composée d'eau et d'éléments minéraux. L'hydroponie présente un double avantage vis-à-vis de la culture en terre : elle permet de doser avec précision les éléments nécessaires à la croissance de la plante, et de la protéger des parasites présents dans le sol. On stimule ensuite la production des métabolites secondaires, afin d'augmenter les quantités d'exsudats racinaires produites. Pour ce faire, deux techniques complémentaires sont employées i) l'éliciteur : on introduit dans la solution nutritive, des extraits du pathogène en question ce qui va simuler l'attaque du parasite. L'éliciteur se fixe sur un récepteur situé sur la paroi de la cellule végétale, et va ainsi déclencher une cascade d'événements, conduisant à la production de métabolites secondaires. Les éliciteurs multiplient le rendement par six ; ii) les précurseurs : ce sont des acides aminés qui, introduits dans la solution nutritive, sont absorbés par les racines, et les nourrissent.

La combinaison des deux techniques permet de multiplier par huit le rendement de fabrication de métabolites secondaires qui sont stockés dans les différents tissus de la racine.

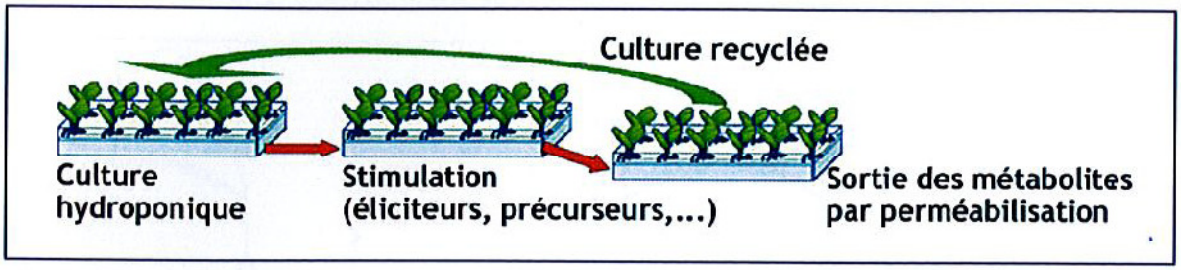


Figure 26. Processus de production des métabolites par la méthode des plantes à traire.

- **2ème étape** : Extraction des métabolites secondaires

La deuxième étape, qui fait toute l'originalité du procédé, est la traite, ou récupération des métabolites secondaires. L'excrétion est obtenue naturellement chez certaines plantes. La solution nutritive qui contient un grand nombre d'agents chimiques est remplacée par de l'eau. Progressivement, les racines libèrent les métabolites secondaires dans l'eau. Dans d'autres cas, l'excrétion doit être forcée par des moyens chimiques (ajout de tensioactifs) ou physiques (ultra-sons, élévation de température). Ainsi, l'ajout de tensioactifs dans la solution nutritive rend les parois des racines perméables en augmentant la différence de pression entre l'intérieur de la cellule et le milieu nutritif et permet de récupérer de 20 à 80 % des métabolites secondaires contenus dans les racines. Les méthodes classiques de la chimie organique sont utilisées pour isoler les métabolites du milieu : extraction par un solvant, chromatographie…

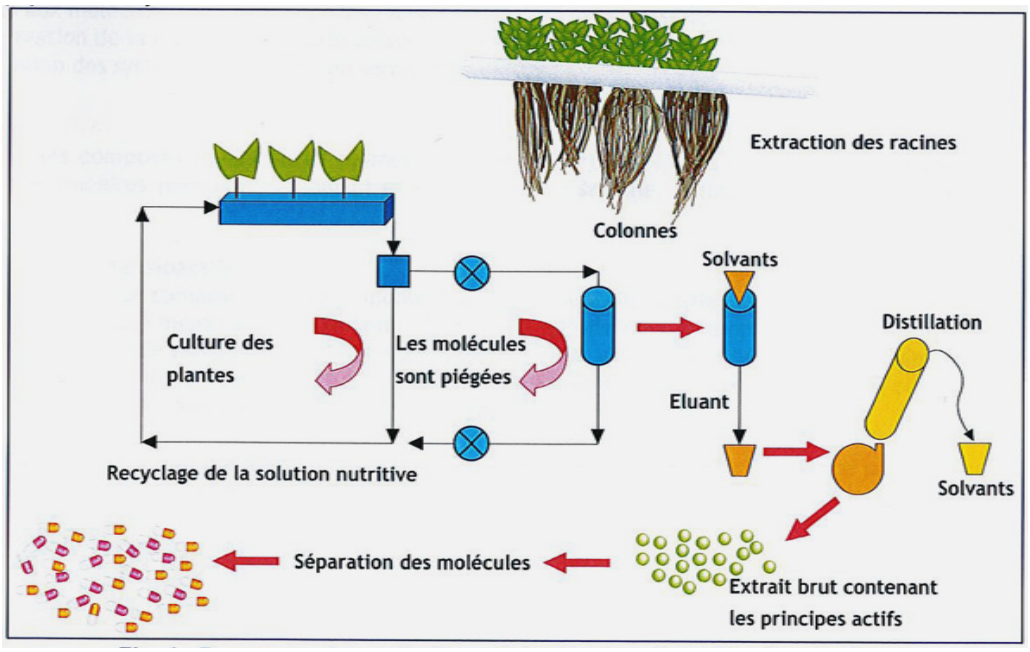


Figure 27. Processus de production pilote d'extraction des exsudats racinaires développé par l'équipe 'Métabolites secondaires des végétaux' de l'INRA de Nancy.

La technique des plantes à traire décrite telle que précédemment est une technique très élaborée. Aussi, a t'-il fallu l'adapter aux besoins et aux matériels dont nous disposions pour notre étude.

III.2.6.2. Technique des plantes à traire, adaptée par nos soins

Afin d'obtenir des exsudats ayant une composition biochimique proche de celle que l'on obtient en conditions naturelles dans la rhizosphère, il est nécessaire d'utiliser un protocole qui évite la photolyse des molécules, l'adsorption des molécules sur les parois des pots, et qui permette une extraction sans solvants. En effet, de nombreux protocoles d'extraction d'exsudats racinaires sont aujourd'hui disponibles (Tang et Young, 1982 ; Minh et al., 2004 ; Gontier et al. 1999 ; 2002 ; Marla et al., 2008), et les précautions prises dans chacun d'entre

eux sont différentes selon les besoins de l'auteur. Le protocole expérimental utilisé lors de ces travaux résulte ainsi de la combinaison de différentes parties de ces protocoles.

Pour faire pousser les plantes, nous avons utilisé le dispositif expérimental de Tang et Young (1982), basé sur l'utilisation de demi-bouteilles en verre brun (le verre brun prévient des phénomènes de photolyse). La récupération des exsudats racinaires a été faite selon la technique des plantes à traire (Gontier et al., 1999 Brevet INRA ; Gontier et al., 2002), ce qui permet d'éviter l'utilisation de solvant d'extraction préconisé dans la technique de Tang et Young (1982). Leur extraction a été réalisée en recourant à une technique de perméabilisation au bain marie à 45°C. Cette technique, testée par Minh et al. (2004), évite l'utilisation de solvants, ou encore l'ajout de solution perméabilisante, et ne dénature pas les molécules. Enfin, afin d'éviter la photolyse des exsudats racinaires (Marla et al., 2008), ceux-ci sont conservés à -20 °C dans des pots en verre peints en noir avant d'être lyophilisés à -54°C. Le lyophilisat est ensuite à nouveau conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse.

- **1ère étape** : Production des métabolites secondaires

Les plantes poussent dans des demi-bouteilles en verre (ceci, permettant d'éviter les interactions possibles entre les molécules sécrétées par les racines et le pot) pendant 2 mois (moment de prélèvement des exsudats racinaires) selon les différentes conditions désirées.

Figure 28. Dispositif expérimental de production d'exsudats racinaires en milieu contrôlé.

- **2ème étape** : Extraction des métabolites secondaires

Une fois ces 2 mois écoulés, on dépote les plantes, et on nettoie soigneusement les racines à l'eau distillée afin de les débarrasser des résidus de substrat.

Perméabilisation des racines : on plonge les racines de ces plantes dans 500 ml d'eau distillée à 45°C (10 plantes pour 500 ml) (Minh et al., 2004). La perméabilisation dure 8 h, puis on laisse les plantes dans le bain marie. On attend ainsi 24 h en comptant à partir du début de la perméabilisation.

Figure 29. Plants de *C. retusa* débarrassés du substrat.

Figure 30. Récupération des exsudats racinaires par la technique des plantes à traire.

- **3ème étape** : Lyophilisation des exsudats racinaires

Une fois ces 24 h écoulées, on aliquote l'extrait brut ainsi obtenu dans des pots en verre à raison de 150 ml/pot, puis on les mets à -20°C. Une fois congelés, le contenu des pots est lyophilisé à -54°C. Le lyophilisat est ensuite conservé à 4°C jusqu'à l'analyse.

Ces lyophilisats sont ensuite repris dans de l'eau pour les dosages biochimiques et les biotests.

III.2.7. Choix des techniques biochimiques

Les premiers tests analytiques ont été effectués en **HPLC UV-visible-MS** par le laboratoire d'analyses biochimiques de Montpellier SupAgro. Après obtention des premiers chromatogrammes HPLC en UV-visible-MS à 280 nm (Figure 31), le laboratoire s'est cependant trouvé dans l'impossibilité de déterminer les molécules présentes dans les différents extraits. Pour cause, travaillant sur le vin, leur base de données ne comportait aucunes molécules identifiées, qui étaient également présentes chez les crotalaires. Pour cette raison, nous n'avons pas poursuivi avec cette technique.

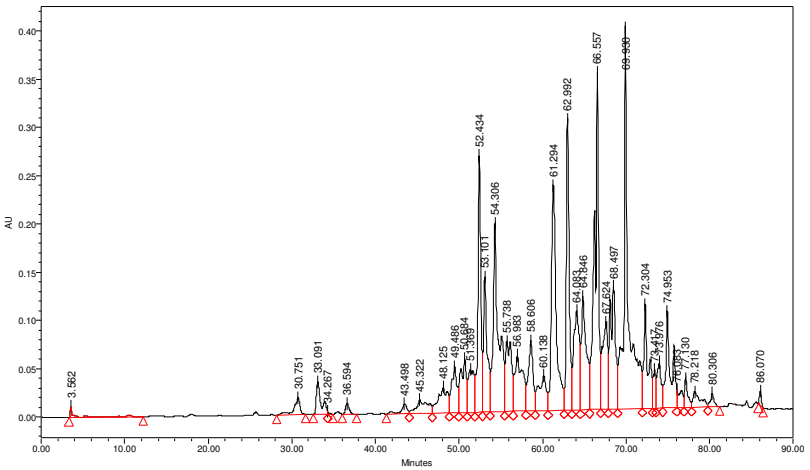
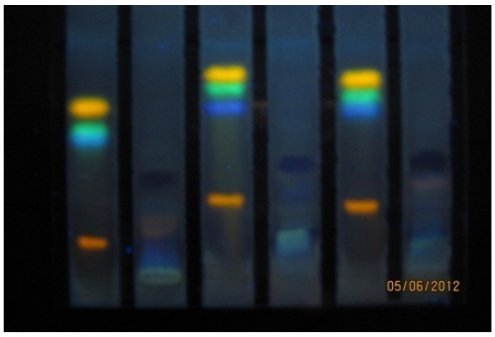


Figure 31. Chromatogramme d'exsudats racinaires de *C. spectabilis* obtenus à 280 nm.

La seconde technique a été l'**HPTLC** (Hight Performance Thin Layer Chromatography). Cette technique a été mise en œuvre au laboratoire de biochimie de l'UR ASTRO à l'INRA des Antilles-Guyane, pour laquelle différents paramètres ont été testés (solvant de migration, humidité, distance du front de migration, saturation, etc.). Tous ces paramètres en font une technique relativement lourde à mettre au point, sans pour autant permettre un niveau de discrimination des molécules suffisant, raison pour laquelle raison elle n'a pas été retenue.



Temps de migration :
1 : 16 min 25
2 : 16 min 25
3 : 29 min 50
4 : 32 min 30
5 : 20 min 50
6 : 20 min 50

Rm:Apparition de compose phénolique ne correspondant pas aux standard déposés.

Etape 7: révélation à 365 nm.
De gauche à droite : pistes 1 et 2: acétate d'éthyle/dichlorométhanel/ac formique/ac acétique/eau : 100/25/10/10/11; pistes 3 et 4: acétate d'éthyle/ac formique/ac acétique glacial/eau : 100/11/11/27; piste 5 et 6: acétate d'éthyle/ac formique/ac acétique glacial/eau : 50/5/5/9 sur exsudat 25.1-3 :1-Cs-Ma à 18,6mg/mL(pistes 2,4 et 6) alterné avec un mélange de 6 standards (G,C,Q, A, M, R)

Figure 32. Plaque obtenue en HPTLC avec révélateur NEU/PEG.

Suite à ces tentatives, nous nous sommes intéressés à deux autres techniques d'analyse biochimiques : i) l'analyse quantitative par spectrophotométrie visible dont la réalisation était possible au sein du laboratoire de biochimie de notre unité de recherche ; ii) l'analyse qualitative (GC-MS), sous-traitée par un laboratoire japonais, le NARCH (National Agricultural Research Center for Hokkaido Region), maîtrisant parfaitement cette technique, et possédant les bases de données et logiciels requis pour l'analyse des données.

Nous avons réalisé le dosage en spectrophotométrie-visible, de trois familles majeures de molécules (polyphénols totaux, alcaloïdes totaux, et stéroïdes totaux), sur tous les exsudats racinaires récupérés lors des divers traitements, et le dosage de trois sous-familles de

molécules (pyrrolizidines alcaloïdes, flavonols, et tanins condensés) sur les exsudats utilisés lors des biotests.

Ensuite, afin d'identifier plus finement les molécules d'intérêt présentes dans les divers traitements, nous avons réalisé la GC-MS sur six traitements. La méthode étant très lourde et confiée à un laboratoire étranger, nous ne pouvions pas expédier tous les échantillons et il a donc fallu faire des choix. Nous avons ainsi décidé de réaliser les analyses sur 4 traitements incluant *C. spectabilis* (espèce ayant démontré les meilleurs résultats lors des biotests), et 2 traitements incluant le bananier (plante sensible, témoin), avec comme seul substrat le nitisol.

Les 4 traitements incluant *C. spectabilis* sont les suivants :

- sur Nitisol seul, sans ajouts d'aucune sorte (témoin),
- sur Nitisol, en présence du champignon mycorhizien (condition la plus proche des conditions naturelles d'une plante non infestée),
- sur Nitisol, en présence du champignon mycorhizien et du nématode *Meloidogyne arenaria* (condition la plus proche des conditions naturelles d'une plante infestée par ce nématode),
- sur Nitisol, en présence d'engrais (condition intéressante à tester dans le cadre d'une culture en association possible avec le bananier).

Les 2 traitements incluant le bananier sont les suivants :

- sur Nitisol seul, sans ajouts d'aucune sorte (témoin),
- sur Nitisol, en présence d'engrais (condition respectant le mode de conduite de cette plante cultivée).

III.2.7.1. La spectrophotométrie visible

Logiciel d'analyse :

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre double faisceau CARY 100 de Varian piloté par un logiciel Cary Win UV pour l'acquisition des données.

Préparation des extraits :

Les lyophilisats d'exsudats racinaires sont repris dans de l'eau distillée à raison de 5 mg ml^{-1} et stockés à 4 °C et les standards dans du méthanol à 80 %. L'analyse est réalisée sur 3 répétitions pour chaque traitement, et chaque répétition est dupliquée 2 fois lors de l'analyse.

III.2.7.1.1. Dosage des polyphénols totaux (PT)

Le dosage des polyphénols totaux s'effectue à partir de la méthode décrite par Singleton et al. (1999), et Heilerová et al. (2003).

L'acide gallique est utilisé comme standard pour faire une gamme étalon de 0 à 50 µg/ml.

Le principe de la méthode repose sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif de Folin–Ciocalteu. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Une coloration bleue est obtenue.

A 500 µl d'extrait ou de standard, on rajoute 2,5 ml de Folin – Ciocalteu 0,2 N. On laisse incuber à température ambiante pendant 5 min. Par la suite, on introduit 2 ml de $NaCO_3$ à 75 g l^{-1}. On porte la solution au bain marie 15 minutes à 20 °C, et on laisse refroidir à température ambiante. La lecture de la DO se fait à 760 nm.

III.2.7.1.2. Dosage des alcaloïdes totaux (AT)

Le dosage des alcaloïdes totaux s'effectue à partir de la méthode décrite par Szabo et al. (2003).

La Piperine est utilisée comme standard pour faire une gamme étalon de 0 à 1 mg/ml.

Aux 500 µl d'extraits ou de standards, on rajoute 2,5 ml du réactif de Marquis (formaldéhyde + acide sulfurique). La lecture de la DO se fait à 600 nm.

III.2.7.1.3. Dosage des stéroïdes totaux (S)

Le dosage des stéroïdes est réalisé selon la méthode de Zak, (1957), avec le chlorure de fer sulfurique.

L'Ergostérol est utilisé comme standard pour faire une gamme étalon de 0 à 1 mg/ml.

Le principe de la méthode est basé sur la solubilisation des stérols par addition des différents réactifs aboutissant à la formation d'une coloration rouge pourpre.

On portera l'échantillon ou l'extrait de 100 µl à ébullition au bain marie pour évaporer le méthanol et le chloroforme pendant 20 minutes. Les extraits secs sont repris dans 3 ml d'acide acétique glacial puis 2 ml de solution de chlorure ferrique sulfurique. La lecture de la DO se fera à 450 nm.

III.2.7.1.4. Dosage des flavonols

Le dosage est effectué avec le réactif de Neu selon la méthode de Brasseur et Angelot (1986).

La Quercétine est utilisée comme standard pour faire une gamme étalon de 0 à 50 µg/ml.

Les flavonoïdes apparaissent de couleur orange, jaune. Cette couleur est due à la formation d'un complexe entre le groupement hydroxyl-flavones avec le réactif selon la réaction.

A 2,4 ml d'extrait ou de standard, on rajoute 120 µl du réactif de Neu à 1 %. L'échantillon sera maintenu à l'obscurité pendant 15 minutes, la lecture de la DO se fera 404 nm.

III.2.7.1.5. Dosage des tannins condensés

Le dosage est réalisé avec la vanilline sulfurique selon la méthode de Swain et Hillis, (1959).

La Catéchine est utilisée comme standard pour faire une gamme étalon de 0 à 15 µg/ml.

Le principe de la méthode est basé sur la condensation des composés phénoliques avec la vanilline en milieu acide, méthode spécifique des flaranes-3-ols (Price et al., 1978).

A 1 ml de standard ou d'échantillon, on rajoute 2 ml d'acide sulfurique à 70 %. Les solutions seront placés au bain marie à 20 °C pendant 15 minutes. La lecture de la DO se fera à 500 nm.

III.2.7.1.6. Dosage des alcaloïdes type pyrrolizidine alcaloïdes (PA)

Les alcaloïdes de type PA ont été dosés par le réactif d'Erlich modifié selon la méthode de Prakash et al. (1999).

La Crotaline est utilisée comme standard pour faire une gamme étalon de 0 à 100 µg/ml.

A 200 µl d'extrait on rajoutera 500 µl de réactif oxydant. Le mélange sera placé dan un bain marie bouillant (110 °C) pendant 20 minutes. On introduit dans le tube en verre, 1ml de diglyme + 0,1 ml d'acide anhydride. On portera le mélange à ébullition pendant 1 minute à 110 °C. On ajoute 600 µl de réactif d'Erlich modifié. Le tube en verre sera de nouveau placé au bain marie à 55 °C pendant 5 minutes pour le développement de la coloration. La température est très importante car au dessus de 60 °C la coloration s'estompe. Après

refroidissement de l'échantillon, on introduit 4 ml d'Acétone. La lecture de la DO se fera à 565 nm.

III.2.7.1.7. Expression des résultats

Nous avons travaillé sur la moyenne des répétitions pour les différents traitements, puis les résultats ont été exprimés en **mg de composés dosés/mg d'exsudats racinaire/mg de matière sèche des parties aériennes/plante**.

III.2.7.2. La Chromatogaphie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS)

L'analyse a porté sur 3 échantillons pour chaque traitement. L'analyse de chaque échantillon ayant été dupliquée, cela nous ramène à 6 analyses par échantillon.

III.2.7.2.1. Extraction et dérivatisation pour l'analyse GC-MS

Les analyses portent sur les échantillons d'exsudats racinaires lyophilisés. Les échantillons subissent une dérivatisation avant leur analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse comme décrit par Broeckling et al. (2005), avec quelques modifications (Benkeblia et al., 2007). Les fractions séchées d'exsudats racinaires ont été remises en suspension dans 500 µl d'eau contenant du ribitol (10 $\mu l/ml^{-1}$) comme standard interne, puis vortexées et soniquées dans un sonicateur jusqu'à la mise en suspension totale du culot sec. Les échantillons sont ensuite déshydratés sous un courant faible d'azote jusqu'au

séchage complet. Les culots secs obtenus sont chimiquement dérivés en premier par méthoxyamination en utilisant 60 µl de 15 mg/ml^{-1} de méthoxyamine-HCl dans de la pyridine (séchée avant utilisation sur tamis de billes moléculaires), puis vortexés et incubés à 50 °C pendant 1 h. Par la suite, les extraits sont traités pour une deuxième dérivatisation avec 60 µl de N-méthyl trimethylsilylfluoroacetamide (MSTFA) + 1 % de trichlormethylchlorsilane (TMCS) pendant 1 h à 50 °C. Les échantillons sont ensuite transférés dans des ampoules de verre inertes de 300 µl, et analysés par GC-MS.

III.2.7.2.2. GC-MS et analyses des spectres

Les échantillons sont analysés par GC-MS (chromatographe en phase gazeuse modèle HP 6890 couplé à un détecteur modèle HP 5973 et à un injecteur automatique modèle HP MS 6890 Series, Agilent Technologies Inc) comme décrit précédemment (Broeckling et al., 2005 ; Roessner et al., 2001). Les données spectrales de masse sont ensuite analysées à l'aide du logiciel AMDIS (Automated Mass Spectra Deconvolution and Identification System, http://chemdata. nist.gov / masse spectres / AMDIS /) et la comparaison est faite en utilisant le NIST 02 Mass Spectral Library National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA), en recourant à une base de données personnalisée interne, générée à partir de composés authentiques. Après ajustement des fichiers de données générés, les données quantitatives et qualitatives sont extraites à l'aide du logiciel MET-IDEA (Noble Foundation, Ardmore. OK, USA) (Broeckling et al., 2006).

III.2.7.1.3. Données et analyses statistiques

Analyse qualitative

Les données et les calculs sont obtenus à partir des mesures de trois répétitions des mêmes exsudats racinaires. Les différentes molécules retrouvées, au niveau des exsudats racinaires pour les différents traitements sont regroupées selon les 3 grandes classes de familles de molécules : stéroïdes, alcaloïdes, et les composés phénoliques. Des clusters sont réalisés afin de pouvoir observer comment se répartissent les divers molécules au travers des différents traitements.

Analyse quantitative

Pour chaque catégorie de molécules (par exemple les alcaloïdes), le nombre de molécules appartenant à la famille les alcaloïdes est déterminé pour un traitement donné (par exemple T1). Le rapport du nombre de molécules appartenant à la famille des alcaloïdes dans ce traitement est rapporté à la quantité totale du nombre de molécules totales retrouvées au niveau de T1.

$$\%\ \text{alcaloïdes dans T1} = \frac{\text{Nombre de molécules appartenant à la famille des alcaloïdes}}{Nombre\ total\ de\ molécules\ dans\ T1}$$

III.2.8. Choix des nématodes étudiés

Le choix des nématodes s'est fait en fonction des besoins en généricité de l'étude, et des possibilités de maîtrise d'élevage.

Radopholus similis est un nématode inféodé aux bananiers, et considéré comme étant le plus virulent sur bananier. *Meloidogyne arenaria* est un nématode qui infeste de nombreuses cultures. Il est choisi comme référence, car la plupart des travaux de recherches sur les

nématodes sont réalisés sur cette espèce. Les conditions d'élevage de ces deux nématodes sont maîtrisées par nos équipes.

Le choix d'un nématode endoparasite sédentaire (*M. arenaria*), et d'un nématode endoparasite migrateur (*R. similis*), devrait par ailleurs nous permettre d'observer d'éventuelles différences entre deux modes contrastés d'infestation vis-à-vis du comportement des crotalaires.

III.2.8.1. Meloidogyne arenaria

Les représentants du genre ***Meloidogyne*** sont des parasites de plantes largement répandus dans les régions tropicales. Les larves infectent les racines, et développent des galles. Ils sucent les photosynthétats et les nutriments du végétal. Si l'infection de plantes adultes ne diminue que leur rendement, l'infection de jeunes plantes peut être fatale. Tous les nématodes traversent une étape embryonnaire, quatre étapes larvaires (J1 - J4) et une étape adulte. Lorsque les nématodes *Meloidogyne* éclosent, ils ont un aspect vermiforme, et ont déjà atteint le deuxième stade larvaire (J2), la première mue ayant eu lieu dans l'œuf. Les larves nouvellement écloses ne peuvent subsister que peu de temps dans le sol ou dans la rhizosphère des plantes-hôtes, car elles s'alimentent sur leur réserve lipidique stockée dans leur intestin. Elles peuvent alors soit réinvestir l'hôte contaminé par leur parent, ou soit migrer dans le sol pour trouver une nouvelle racine à contaminer. Les signaux des larves stimulent les cellules du parenchyme végétal situées près de leurs têtes, provoquant une polynucléose. Des cellules végétales géantes se forment ainsi, qui servent à l'alimentation des larves, et même des adultes.

Les individus du stade infectieux (J2) pénètrent dans la racine, et migrent entre les cellules, afin d'atteindre les cellules de la stèle (cylindre central). Chaque J2 induit la différenciation

de 5-7 cellules, et les transforme en cellules hypertrophiées et multinucléées appelées cellules géantes qui constituent le site nourricier. La croissance des cellules géantes provoque une écorchure du tissu environnant de la racine, dans laquelle la larve en croissance vient se fixer. Les larves s'alimentent d'abord des cellules géantes pendant environ 24 heures après être devenues sédentaires. Elles subissent ensuite des changements morphologiques qui leur donnent une forme boursouflée. Sans s'alimenter davantage, elles subissent alors trois mues successives qui les mènent au stade adulte. Les femelles, qui ont une forme pratiquement sphérique, recommencent à se nourrir, et leur système reproducteur se développe. La femelle adulte peut vivre jusqu'à trois mois, et pondre des centaines d'œufs. Les femelles peuvent continuer à pondre même après la moisson des plantes hôtes. Entre deux récoltes, l'espèce survit par ses œufs. La durée du cycle de vie est fonction de la température. Pour l'essentiel du cycle de vie du nématode à galles, le taux de développement croît linéairement avec la température, bien qu'il soit possible que certaines étapes, comme le développement des œufs, l'invasion des racines hôtes ou la croissance larvaire aient des optimums légèrement différents.

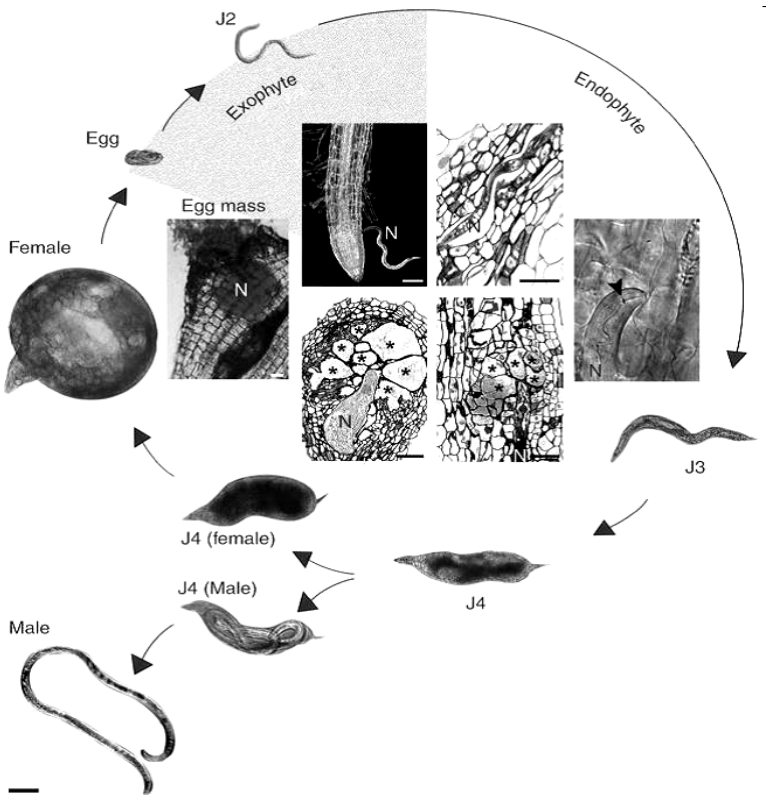


Figure 33. Cycle de développement de *Meloidogyne arenaria* (d'après Abad et al., 2008).

III.2.8.2. Radopholus similis

C'est un parasite important de fruits, de légumes, et d'autres cultures. C'est un ravageur particulièrement important des bananiers et des agrumes, mais il attaque aussi la noix de coco, l'avocat, le café, la canne à sucre, et un assortiment d'autres types d'herbes et de plantes ornementales. Ce nématode provoque des lésions à la racine de la plante qui forment des galeries, ce qui provoque des problèmes de malnutrition alors que le nématode termine son cycle de vie au sein de la racine. C'est un nématode endoparasite migrateur qui complète son cycle de vie dans environ 21 jours à 25 º C dans les tissus des racines.

Le cycle de vie de *R. similis* dans les racines de bananiers, de l'œuf à l'œuf, se produit en 20 à 25 jours entre 24 et 32 ° C. Les œufs sont amenés à éclore en 8 à 10 jours avec des stades juvéniles complets entre 10 et 13 jours. Comme avec toutes les espèces de nématodes, il y a

quatre stades juvéniles : la première étape (J1) se développe dans l'œuf, puis mue et apparaît comme un nématode J2.

Les femelles et les juvéniles sont les deux phases infestantes, et attaquent en particulier près de l'extrémité des racines. Les mâles n'ont pas de stylets, et ne peuvent se nourrir. Les femmes pondent en moyenne 2-6 œufs par jour.

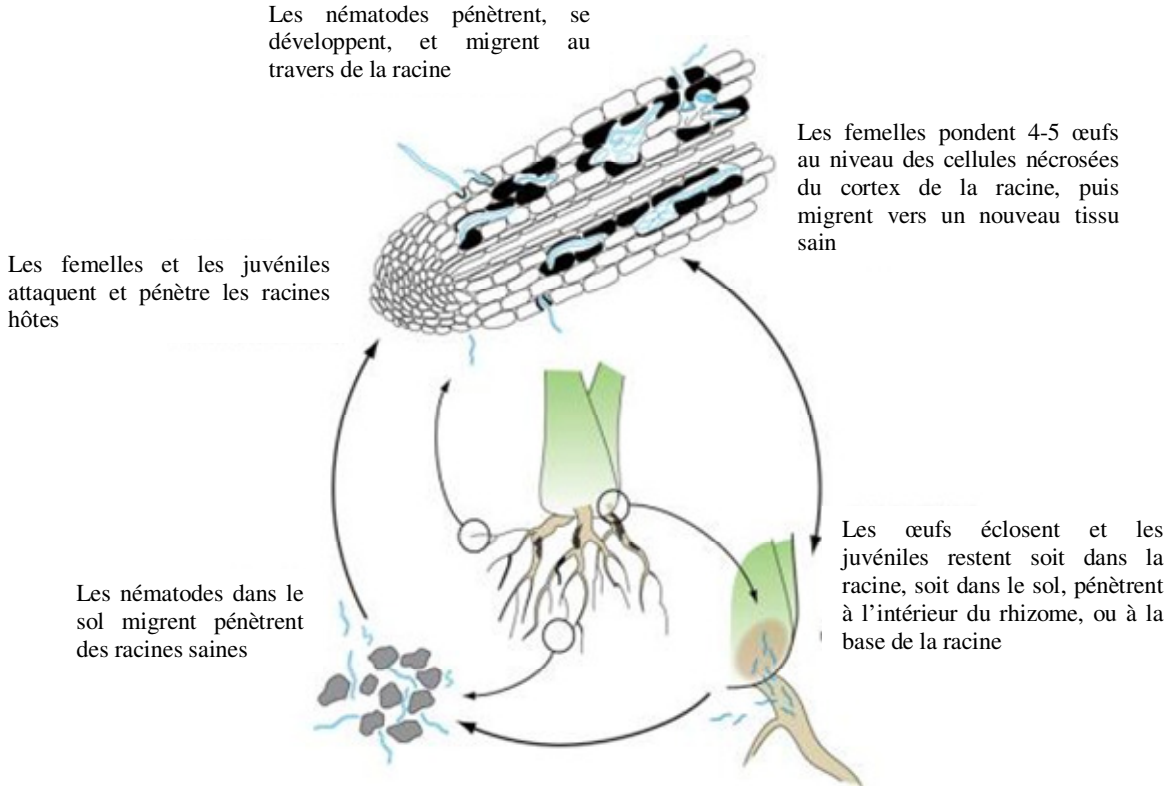


Figure 34. Cycle de développement de *Radopholus similis* (d'après Brooks, 2008).

III.2.9. Mise en place des biotests

Chaque traitement est répété 6 fois. Pour chaque répétition, il y a 3 plants pour le bananier, et 10 plantes pour les crotalaires afin que les quantités d'exsudats racinaires soient à peu près les mêmes pour chaque espèce. Pour évaluer rigoureusement l'effet des exsudats sur les

nématodes, trois niveaux de dilution correspondant aux quantités d'exsudats produits par 1 plante et ½, 1 plante et ½ plante ont été faits pour chaque répétition.

Pour chaque traitement, les concentrations à tester ont été calculés comme suit:

<u>Pour 10 plants de crotalaires</u> :

- Dilution pour 1 plante : d1 $= \sum_{n=1}^{10} \frac{qER}{10}$ où qER est la quantité d'exsudats racinaires recueillis
- Dilution pour ½ plante : d0,5 = d1 * 0,5
- Dilution pour 1 plante ½ : d1,5 = d1 * 1,5

<u>Pour 3 plants de bananiers</u> :

- Dilution pour 1 plante : d1 $= \sum_{n=1}^{3} \frac{qER}{3}$ où qER est la quantité d'exsudats racinaires recueillis
- Dilution pour ½ plante : d0,5 = d1 * 0,5
- Dilution pour 1 plante ½ : d1,5 = d1 * 1,5

Ces dilutions ont été comparées à deux contrôles : un contrôle négatif avec de l'eau distillée, et un contrôle positif à l'eau de Javel à 0,2 %.

Il est à noté que les dilutions effectuées (d0,5, d1, d1,5) n'étaient pas les mêmes que celles normalement requises pour biotests. En effet, en règle générale, les biotests sont effectués sur des gradients de concentration d'extraits (mg/ml), quelles que soient les plantes ou les conditions testées. Toutefois, s'il s'avère que les quantités d'exsudats racinaires, et leur composition biochimique varient avec les conditions environnementales et les plantes considérées. Les normes de dilution à base d'extraits bruts (mg/ml) ne sont donc pas représentatives des quantités réelles de composés synthétisés par les plantes testés dans les

différents traitements. En outre, il nous a semblé plus raisonnable d'effectuer des calculs en fonction de la dilution du nombre de plantes (½ plante, 1 plante, 1 ½ plante) pour tester de manière plus objective (c'est à dire plus près de ce que l'on peut observer dans un environnement naturel), l'effet des exsudats racinaires et leurs propriétés biochimiques sur le comportement des nématodes. Un témoin négatif avec de l'eau distillée, et un témoin positif avec de l'eau de Javel à 0,2 % ont été également mis en place.

Pour étudier la mobilité des nématodes, on place 200 nématodes mobiles (vivants) de chaque espèce (*M. arenaria* ou *R. similis*) en suspension dans 0,5 ml des différentes concentrations d'exsudats racinaires dans une plaque de 24 puits en polystyrène de culture à température ambiante.

Après 48 heures d'incubation, on dénombre les nématodes mobiles et immobiles à l'aide d'un microscope inversé à un grossissement de 100 X. Ensuite, afin d'évaluer la viabilité des nématodes paralysés 50 µl de Meldola's Blue (concentration finale à 1 X) ont été ajoutés aux différentes solutions (Ogiga et Estey, 1974). Après 24 h d'incubation à 20 °C, les nématodes colorés en noir sont considérés morts, tandis que ceux restant non colorées, et immobiles, sont encore en vie, et donc considérés comme paralysés. Les autres nématodes mobiles, et non colorés, sont vivants, et non paralysés. Les nématodes considérés paralysés uniquement dès qu'ils sont en contact avec les exsudats racinaires sont ceux qui étaient immobiles avant l'ajout du Meldola, mais qui sont redevenus mobiles après le rinçage. On les exprime par la quantité de nématodes immobiles après rinçage (a) moins le nombre de nématodes morts avant rinçage (b). Les nématodes considérés comme réellement vivants sont ceux qui n'ont jamais été paralysés. Ils sont donc exprimés par la quantité de nématodes mobiles après rinçage (c) moins le nombre de nématodes paralysés par contact avec les exsudats racinaires (a-b).

III.2.10. Récapitulatif du dispositif expérimental et des conditions testées

III.2.10.1. Dispositif expérimental

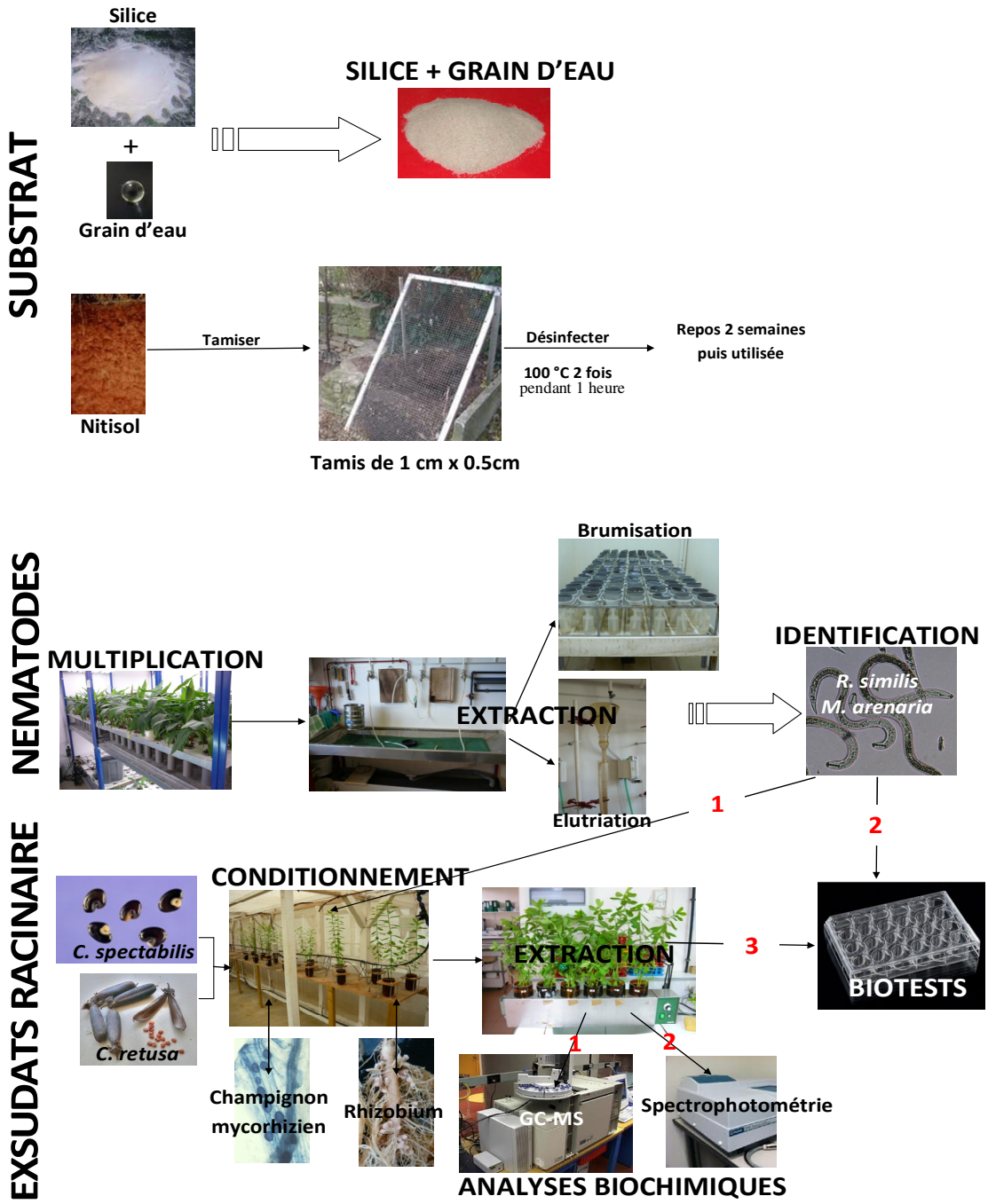


Figure 35. Schéma récapitulatif de l'ensemble du dispositif expérimental.

III.2.10.2. Récapitultatif des conditions testées

Afin de pouvoir mettre en évidence l'effet de la modification des conditions expérimentales choisis sur la composition biochimique des exsudats racinaires, nous avons opéré à partir du système « CROSYNERS ». Au sein de ce système, nous avons fait le choix de retenir certains paramètres de l'environnement de la plante qu'il nous était possible de contrôler dans le cadre de la durée de cette thèse. Les différentes conditions ainsi testées ont été :

i) L'effet du type de plante étudiée (crotalaire ou bananier).

ii) L'effet de la variété de crotalaire (*C. retusa* ou *C. spectabilis*).

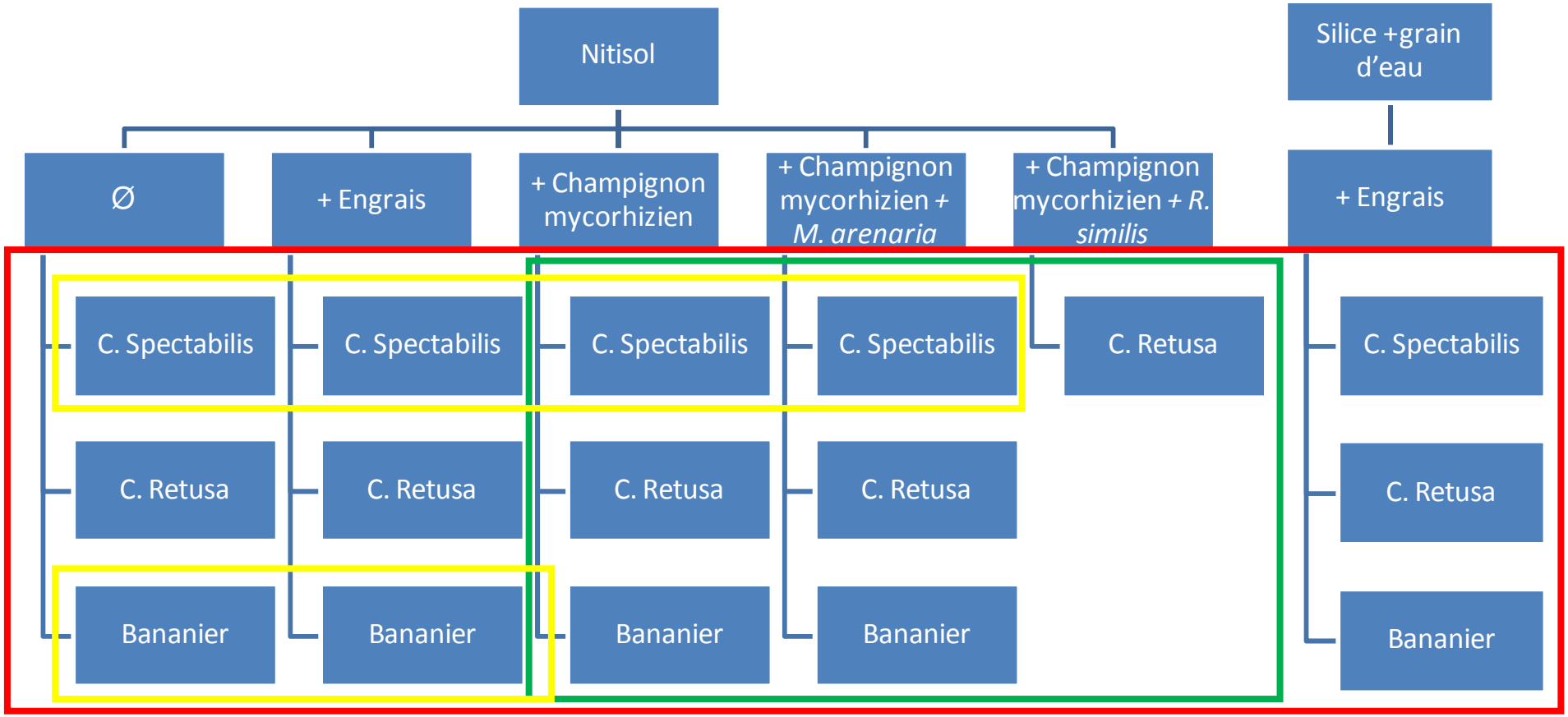
iii) L'effet de la présence de symbiote naturel vs. la fertilisation (champignon mycorhizien, rhizobium, ou engrais de type Mairol).

iv) L'effet de la présence de différents biontes (2 nématodes retenus : *R. similis, M. arenaria*).

v) L'effet de deux substrats contrastés (nitisol ou silice + grain d'eau).

L'ensemble des traitements étudiés, ainsi que les analyses réalisées sont résumés dans la figure 36.

L'ensemble des données a été traité avec le logiciel XL-STAT de Microsoft-Office (2011).
Une comparaison de deux échantillons non appariés à un risque $\alpha = 0,005$ a été réalisée avec les tests t et z. Les différences observées pour les deux tests ont été prises en compte pour déterminer le niveau de signification des valeurs obtenues (**a** pour $P < 0,005$, **b** pour $0,005 < P < 0,006$, et **c** si $P > 0,006$).



ø : aucun ajout ni d'engrais, ni de champignon mycorhizien, ni de nématodes.

Figure 36. Schéma récapitulatif des conditions testées. L'ensemble des traitements a été analysé en spectrophotométrie visible.

Analyses réalisées

Analyse GC-MS

Dosage spectrophotométrie-visible de 3 grandes familles de molécules (alcaloïdes totaux, polyphénols totaux, stéroïdes totaux)

PARTIE IV : RESULTATS

PARTIE IV : RESULTATS

IV. 1. Résultats des dosages spectrophotométriques en fonction des différentes conditions expérimentales

IV.1.1. Effet du substrat sur la composition biochimique des exsudats racinaires

La figure 37 présente la répartition des stéroïdes, des alcaloïdes totaux et des polyphénols totaux dans les exsudats racinaires des trois espèces végétales en fonction du type de substrat utilisé.

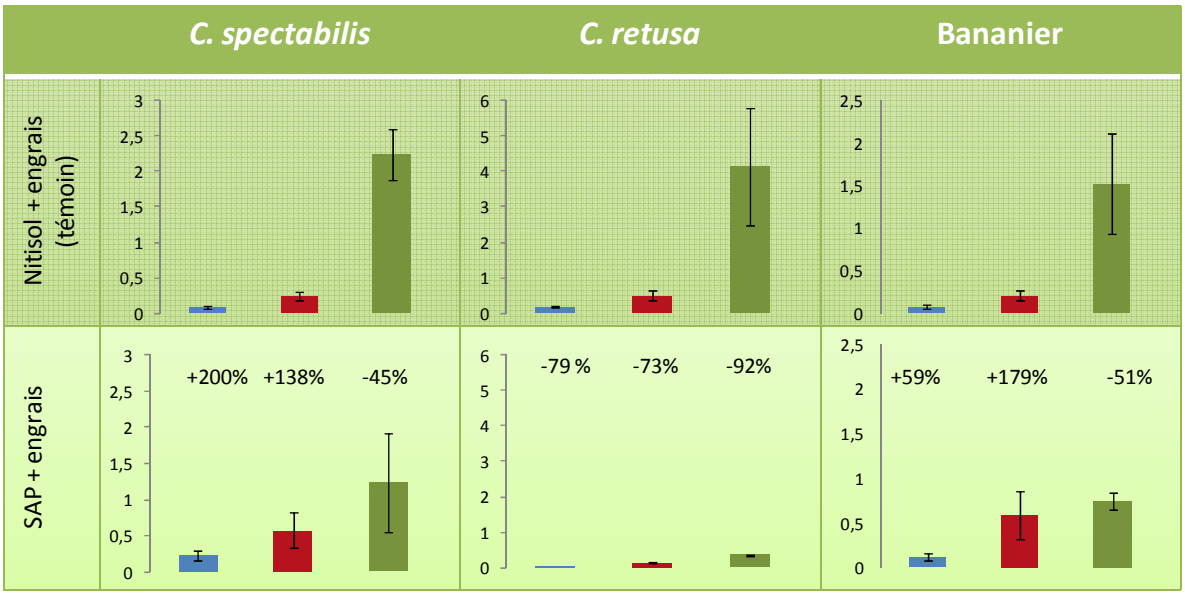


Figure 37. Dosage en spectrophotométrie visible des trois familles de composés obtenus avec *C. spectabilis*, *C. retusa* et le bananier en réaction à deux substrats contrastés.

<u>Axe des y</u>

Standard utilisé pour le dosage des polyphénols totaux: acide gallique

Standard utilisé pour le dosage des alcaloïdes totaux: pipérine

Standard utilisé pour le dosage des stéroïdes totaux: ergostérol

Il ressort que l'utilisation du substrat SAP (silice + grain d'eau) diminue la production de stéroïdes pour les trois types de plante (Cs :-45 % ; Cr : -92 % ; Ba : -51 %) en comparaison avec le nitisol. Les quantités en alcaloïdes totaux et polyphénols totaux augmentent, pour *C.spectabilis* et pour le bananier (respectivement AT : +138 % ; +179 % et PT : +200 % ; +59 %) ; elles diminuent pour *C. retusa* (AT : -73 % ; PT : -79 %).

IV.1.2. Effet du mode de fertilisation sur la composition biochimique des exsudats racinaires

La figure 38 illustre la production de stéroïdes, d'alcaloïdes totaux et de polyphénols totaux dans les exsudats racinaires des trois espèces végétales selon le mode de fertilisation appliqué sur le nitisol.

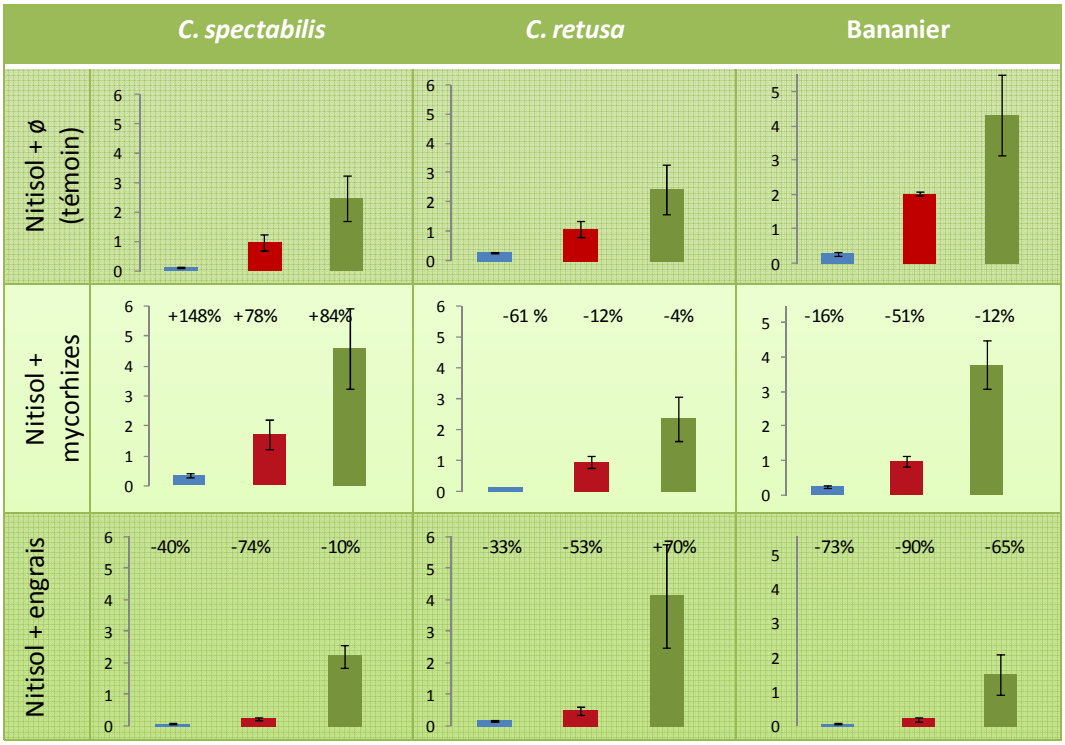


Figure 38. Dosage en spectrophotométrie visible de trois familles de composés obtenus chez les trois espèces végétales en fonction de différents modes de fertilisation (« naturelle » avec mycorhize ou chimique avec engrais).

<u>Axe des y</u>

Standard utilisé pour le dosage des polyphénols totaux: acide gallique

Standard utilisé pour le dosage des alcaloïdes totaux: pipérine

Standard utilisé pour le dosage des stéroïdes totaux: ergostérol

En comparant avec le témoin (Nitisol + ø), on constate qu'en présence du champignon mycorhizien, il se produit une augmentation générale des quantités de composés dosés pour *C. spectabilis* (PT : +148 % ; AT : +78 % ; S : +84 %), tandis que seuls les polyphénols totaux de *C. retusa* et les alcaloïdes totaux du bananier diminuent (respectivement : -61 % et -51 %), les autres composés ne variant pas de manière significative. Lorsque l'on compare le traitement avec ajout d'engrais (Nitisol + engrais) au témoin (Nitisol + ø), on observe une diminution des composés dosés pour les 3 types de plantes en présence d'engrais. Seuls les

stéroïdes dosés pour *C. retusa* augmentent (+70 %) tandis que ceux de *C. spectabilis* ne varient pas significativement.

IV.1.3. Effet de la présence de nématode sur la composition biochimique des exsudats racinaires

La figure 39 illustre les variations de la composition biochimique des exsudats racinaires des trois espèces végétales en présence ou absence de nématode (*Meloidogyne arenaria* ou *Radopholus similis*).

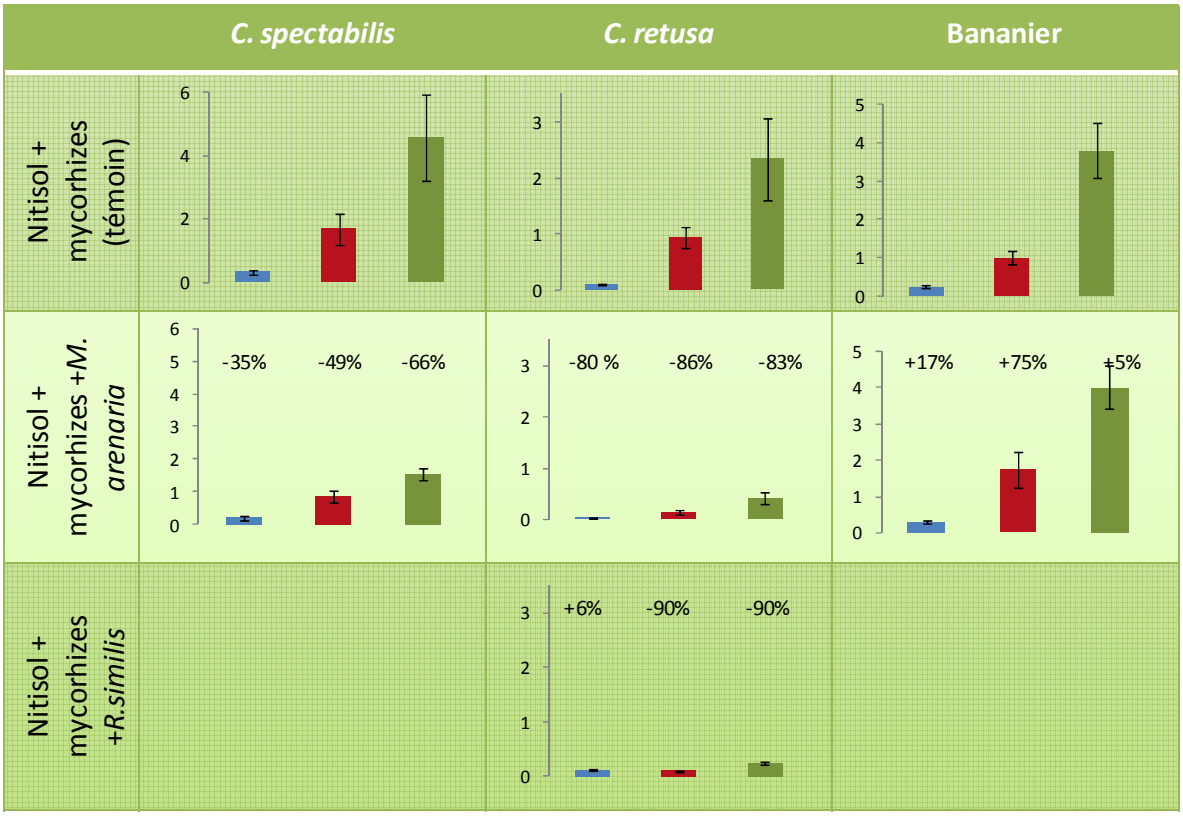


Figure 39. Dosage en spectrophotométrie visible de trois familles de composés obtenus chez les trois espèces végétales en présence de *M. arenaria* ou de *R. similis.*

Axe des y

Standard utilisé pour le dosage des polyphénols totaux: acide gallique

Standard utilisé pour le dosage des alcaloïdes totaux: pipérine

Standard utilisé pour le dosage des stéroïdes totaux: ergostérol

Lorsqu'on inocule les deux crotalaires avec le nématode *M. arenaria,* on observe une diminution des quantités de molécules dosées (Cs : PT : -35 % ; AT : -49 % ; S : -66 % ; Cr : PT : -80 % ; AT : -86 % ; S : -83 %). Chez le bananier, par contre, seule la production en alcaloïdes totaux augmente (+75 %), celle en stéroïdes totaux, et polyphénols totaux ne variant pas significativement. En présence de *R. similis* seul des essais sur *C. retusa* ont été réalisés. Ainsi, lorsque nous comparons ce traitement (Nitisol + Mycorhizes + *R. similis*) avec le témoin (Nitisol + mycorhizes) chez *C. retusa*, nous observons que la production en stéroïdes totaux et en alcaloïdes totaux diminuent de manière significative (-90 % chacun), tandis qu'il ne se produit pas de variation significative en polyphénols totaux (+6 %).

En figure 40, sont représentés les dosages des trois sous familles de molécules appartenant aux polyphénols totaux (flavonols totaux, tanins condensés totaux), et aux alcaloïdes totaux (pyrrolizidines alcaloïdes totaux), obtenues pour les trois espèces végétales en présence, ou en absence de *M. arenaria* ou de *R. similis*.

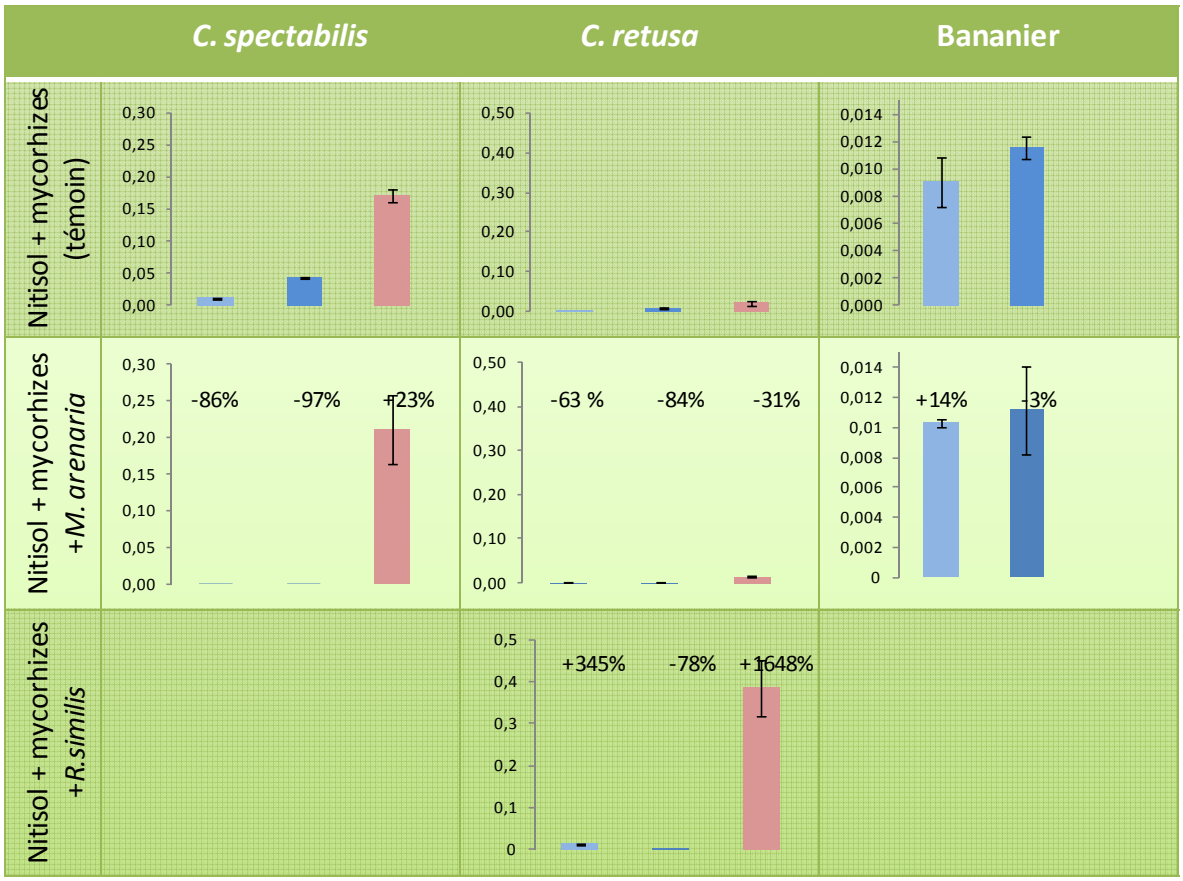


Figure 40. Dosage en spectrophotométrie visible de trois sous familles de composés obtenus chez les trois espèces végétales en présence de *M. arenaria* ou de *R. similis.*

<u>Axe des y</u>

Standard utilisé pour le dosage des tanins condensés : catéchine

Standard utilisé pour le dosage des flavonols : quercétine

Standard utilisé pour le dosage des pyrrolizidines alcaloïde : crotaline

L'ajout de *M. arenaria* entraîne chez les deux crotalaires une diminution de la quantité en flavonols et tanins condensés (Cs-Fla : -86 % ; Cr-Fla : -63 % ; Cs-TC : -97 % ; Cr-TC : -84 %). Les pyrrolizidines alcaloïdes n'augmentent pas de manière significative chez *C. spectabilis* (+23 %), tandis qu'ils diminuent chez *C. retusa* (-31 %). Chez le bananier, il n'y a pas de variation significative des quantités en flavonols et tanins condensés, les pyrrolizidines alcaloïdes étant absents des extraits de bananier.

Chez *C. retusa* en présence de *R. similis*, nous observons une variation très significative de la production des sous familles de molécules, puisque l'on observe +345 % de flavonols, -78 % de tanins condensés, et +1648 % de pyrrolizidine alcaloïdes.

IV.2. Les biotests

IV.2.1. Etude en conditions contrôlées de l'effet des exsudats racinaires sur les nématodes étudiés

Une observation au microscope est réalisée à l'issue des biotests afin de déterminer l'état vital des nématodes. Ci-dessous, sont illustrées des différentes observations réalisées au cours de l'étude.

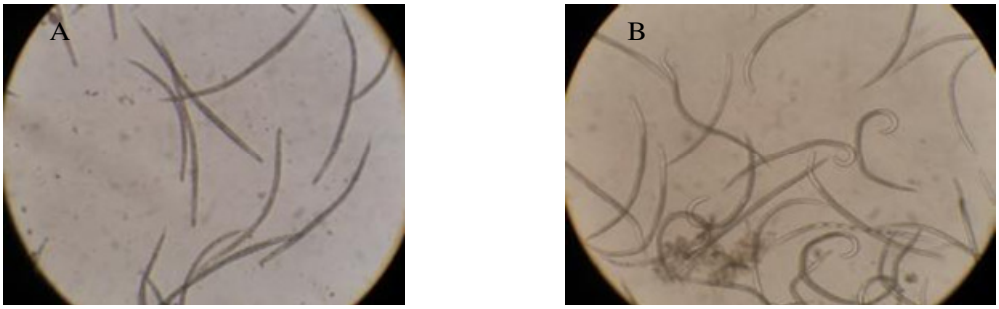


Figure 41. Observation de *R. similis* au bout de 48 h après exposition avec des exsudats racinaires de Crotalaire. A : Photos de *R. similis* immobiles en présence des exsudats racinaires ; B : Photos de *R. similis* redevenus mobiles après rinçage à l'eau distillée.

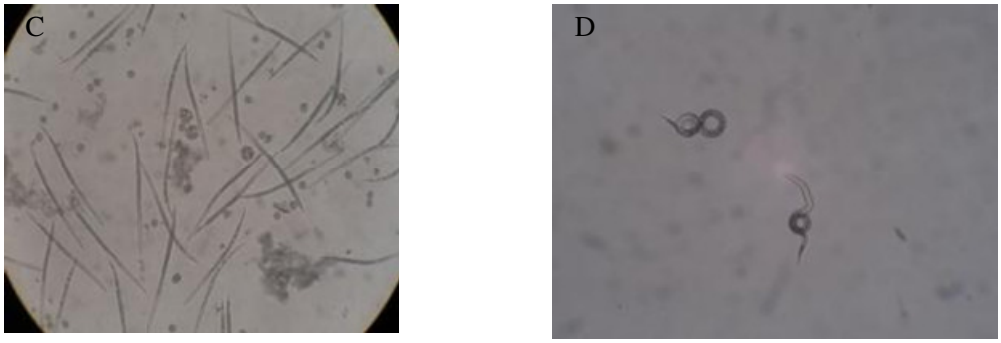


Figure 42. Observation de *M. arenaria* au bout de 48 h après exposition avec des exsudats racinaires de Crotalaire. C : Photos de *M. arenaria* immobiles en présence des exsudats racinaires ; D : Photos de *M. arenaria* redevenus mobiles après rinçage à l'eau distillée.

Plongés dans de l'eau distillée, *R. similis* et *M. arenaria* restent mobiles après 48 h. En comparaison, un effet nématostatique est observé après 48 h, lorsque des deux types de nématodes sont exposés aux exsudats racinaires des crotalaires (Figure 41 A et Figure 42 C). Néanmoins, après ajout du Meldola Blue, et le rinçage des nématodes à l'eau courante, les nématodes redeviennent mobiles (Figure 41 B et Figure 42 D), ce qui est attesté par leur non coloration en présence du Meldola Blue. La petite proportion de nématodes morts (colorés en noir en présence du Meldola Bleu) (Figure 43 E-a et F-a)) représente la fraction de perte en nématodes due à l'état physiologique des nématodes, car cette proportion est équivalente aux quantités de nématodes morts retrouvés chez le témoin eau. Chez le témoin exposé à l'eau de Javel à 0,2 %, tous les nématodes sont colorés en noir, indiquant une mortalité totale des individus.

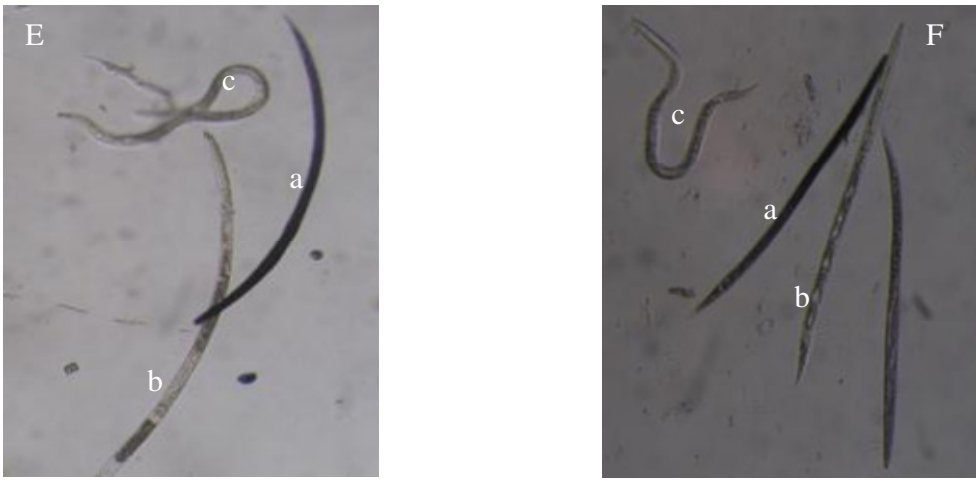


Figure 43. E : Photo de *R. similis* ; F : Photos de *M. arenaria.*

a : nématode mort, b : nématode paralysé, c : nématode vivant.

L'effet paralysant est observé sur les différents nématodes, uniquement lors des biotests où les nématodes sont en contact avec les exsudats racinaires des crotalaires, c'est-à-dire, lors de l'observation au bout de 48 h, avant l'ajout du Meldola Blue, et du rinçage à l'eau courante. Ainsi, est réalisé uniquement le décompte des nématodes immobiles / nématodes mobiles au bout des 48 h (Figure 44).

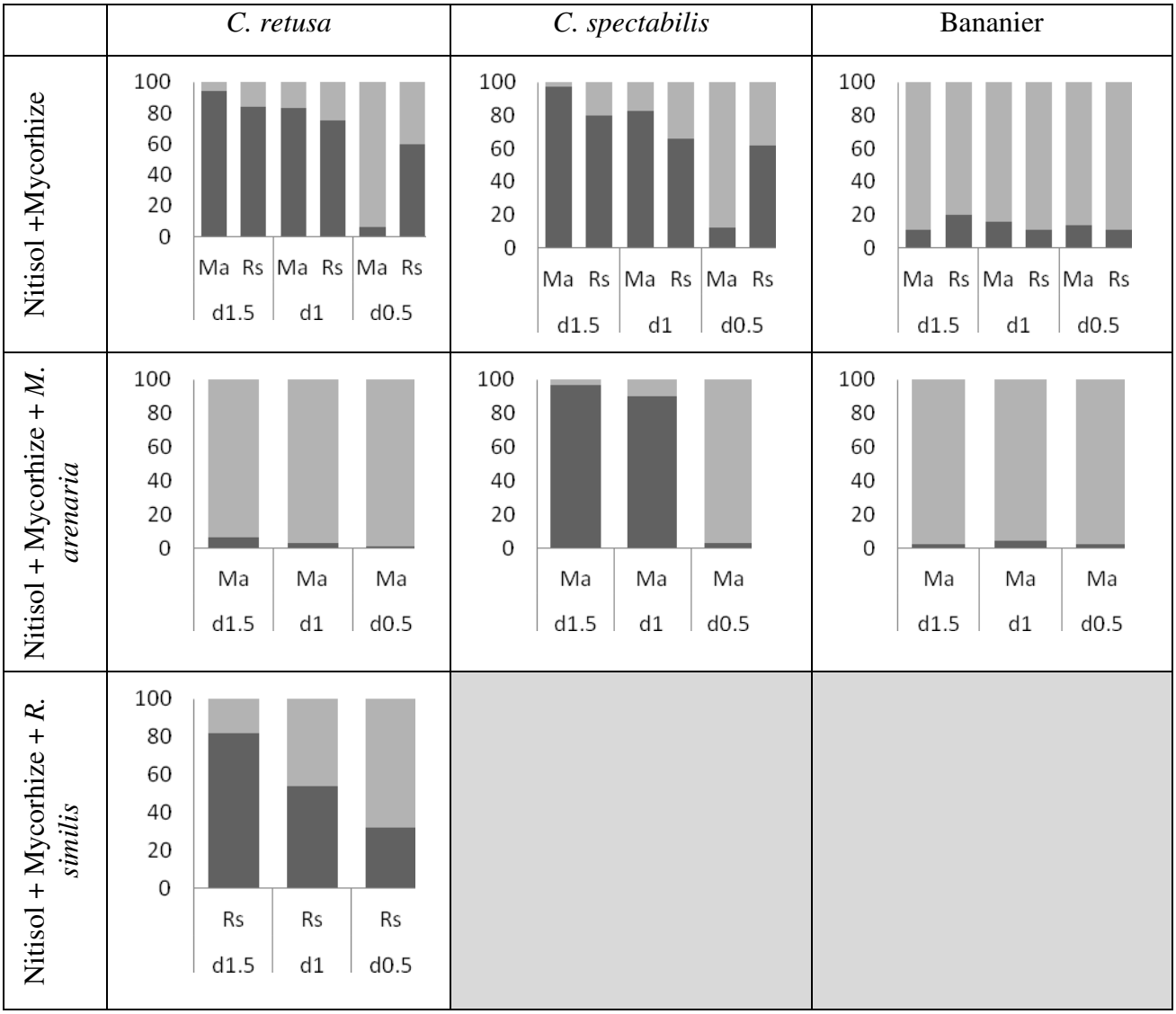


Figure 44. Pourcentage de nématodes mobiles / nématodes immobiles au bout de 48 h.

□ Mobile ■ Immobile

Axe des y : Pourcentage ; Axe des x : Nématodes testés : Ma (*Meloidogyne arenaria*) et Rs (*Radopholus similis*)

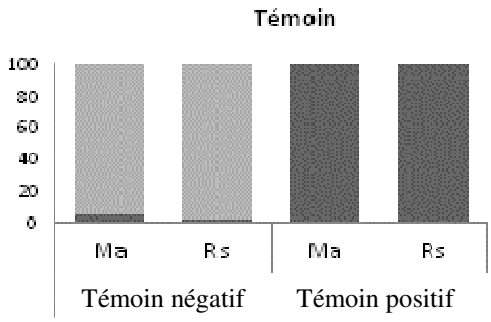
d1.5 : quantité d'exsudats racinaires correspondant à la dilution 1,5 plantes

d1 : quantité d'exsudats racinaires correspondant à la dilution 1 plante

d0.5 : quantité d'exsudats racinaires correspondant à la dilution 0,5 plante

Témoin négatif : eau distillée

Témoin positif : 0,2 % eau de javel



Les exsudats racinaires récupérés en absence de nématodes (Nitisol + mycorhizes) chez les deux crotalaires ont un effet paralysant hautement significatif sur *M. arenaria* aux dilutions d1,5 et d1 mais sont inefficaces à d0,5. Envers *R. similis*, l'effet paralysant de ces exsudats racinaires (Nitisol + mycorhizes) pour les deux crotalaires, a été relativement moins marqué aux dilutions d1.5 et d1, mais conservent un effet paralysant jusqu'à la dilution d0,5.

Les exsudats racinaires de *C. retusa* et du bananier conditionnés en présence de *M. arenaria* (Nitisol + mycorhizes + *M. arenaria*) n'ont aucun effet sur *M. arenaria*, tandis que ceux de *C. spectabilis* ont montré un effet paralysant à d1,5 et d1 qui a disparu à d0,5.

Les exsudats racinaires de *C. retusa* conditionnés en présence de *R. similis* (Nitisol + mycorhizes + *R. similis*) ont montré un effet paralysant moindre que celui observé avec les exsudats racinaires conditionnés sans nématodes chez *C.retusa* (Nitisol + mycorhizes). Les exsudats racinaires du bananier récupérés en absence (Nitisol + mycorhizes) ou en présence de nématode (Nitisol + mycorhizes + *M. arenaria*) n'ont aucun effet paralysant sur ces deux nématodes.

IV.3. Analyse des profils biochimiques avec la GC-MS

IV.3.1. Analyse quantitative

Nous rappelons que les analyses réalisées avec la GC-MS ne concernent qu'une partie des traitements.

Afin d'analyser les données obtenues en GC-MS, nous avons cherché à classer les molécules en respect des trois grandes familles de molécules appartenant aux métabolites secondaires : les alcaloïdes, les composés phénoliques et les stéroïdes. Un certain nombre de molécules n'ont cependant pas pu être clairement identifiées. Il s'agit :

- de métabolites secondaires n'appartenant pas à l'une de ces trois familles : « autres métabolites secondaires » ;
- de métabolites primaires ;
- de molécules qui n'appartiennent à aucunes des deux catégories et qui sont pour la plupart des fragments de molécules : « molécules non identifiées » ;
- de molécules qui appartiennent à une autre catégorie de molécules : « autres molécules » ;
- de molécules qui n'ont pas été identifiées par le logiciel mais qui existent : décrites « Unknown » dans le logiciel.

Le tableau 8 fournit la synthèse de ces différents composés retrouvés.

Tableau 8. Analyse par catégorie de molécules des données en GC-MS, (A) en molécules totales, (B) en pourcentage.

Molécules totales	Cs - Nitisol + ø	Ba - Nitisol + ø	Cs - Nitisol + engrais	Ba - Nitisol + engrais	Cs - Nitisol + mycorhizes	Cs - Nitisol+ mycorhizes + *M. arenaria*
Alcaloïdes	8	5	29	10	39	54
Composés phénoliques	0	1	7	2	10	18
Stéroïdes	0	0	4	1	2	4
Autres métabolites secondaires (composés aromatiques)	1	1	7	3	3	5
Métabolites primaires	29	18	57	24	54	67
Autres molécules (minéraux, siloxane)	1	0	5	2	5	5
Molécules non identifiées (vides)	8	6	66	20	52	57
Unknown	4	0	99	28	89	98
TOTAL	51	31	274	90	254	308

% molécules totales	Cs - Nitisol + ø	Ba - Nitisol + ø	Cs - Nitisol + engrais	Ba - Nitisol + engrais	Cs - Nitisol + mycorhizes	Cs - Nitisol+ mycorhizes + *M. arenaria*
Alcaloïdes	16	16	11	11	15	18
Composés phénoliques	0	3	3	2	4	6
Stéroïdes	0	0	3	1	1	1
Autres métabolites secondaires (composés aromatiques)	2	3	3	3	1	2
Métabolites primaires	57	58	21	27	21	22
Autres molécules (minéraux, siloxane)	2	0	2	2	2	2
Molécules non identifiées (vides)	16	19	24	22	20	19
Unknown	8	0	36	31	35	32

Cs : *C. spectabilis* ; Ba : bananier

Si l'on observe les proportions en % des différentes familles de métabolites secondaires, nous constatons que ce sont les alcaloïdes qui sont majoritaires quelque soient les traitements. Cette observation est néanmoins à nuancer, car si l'on arrivait à déterminer la nature des autres

métabolites secondaires non identifiés ainsi que les molécules « Unknown », cet équilibre pourrait évoluer.

Si l'on se base sur le nombre de molécules détectées lors de notre étude, c'est en présence du nématode *M. arenaria* qu'il y a le plus de molécules synthétisées (Nitisol + mycorhizes + *M. arenaria*), suivi des extraits en présence d'engrais (Nitisol + engrais), puis ceux uniquement en présence du champignon (Nitisol + mycorhizes), et enfin les extraits sans champignons, ni nématodes, ni engrais (Nitisol + ø).

L'analyse quantitative des familles de molécules dosées en GC-MS sur des différents traitements est présentée en figure 45.

Nous constatons i) que nous retrouvons des quantités de composés différentes selon les traitements, ii) qu'il y a des molécules spécifiques qui sont synthétisées à chaque traitement, car nous observons que très peu de molécules communes à plusieurs traitements.

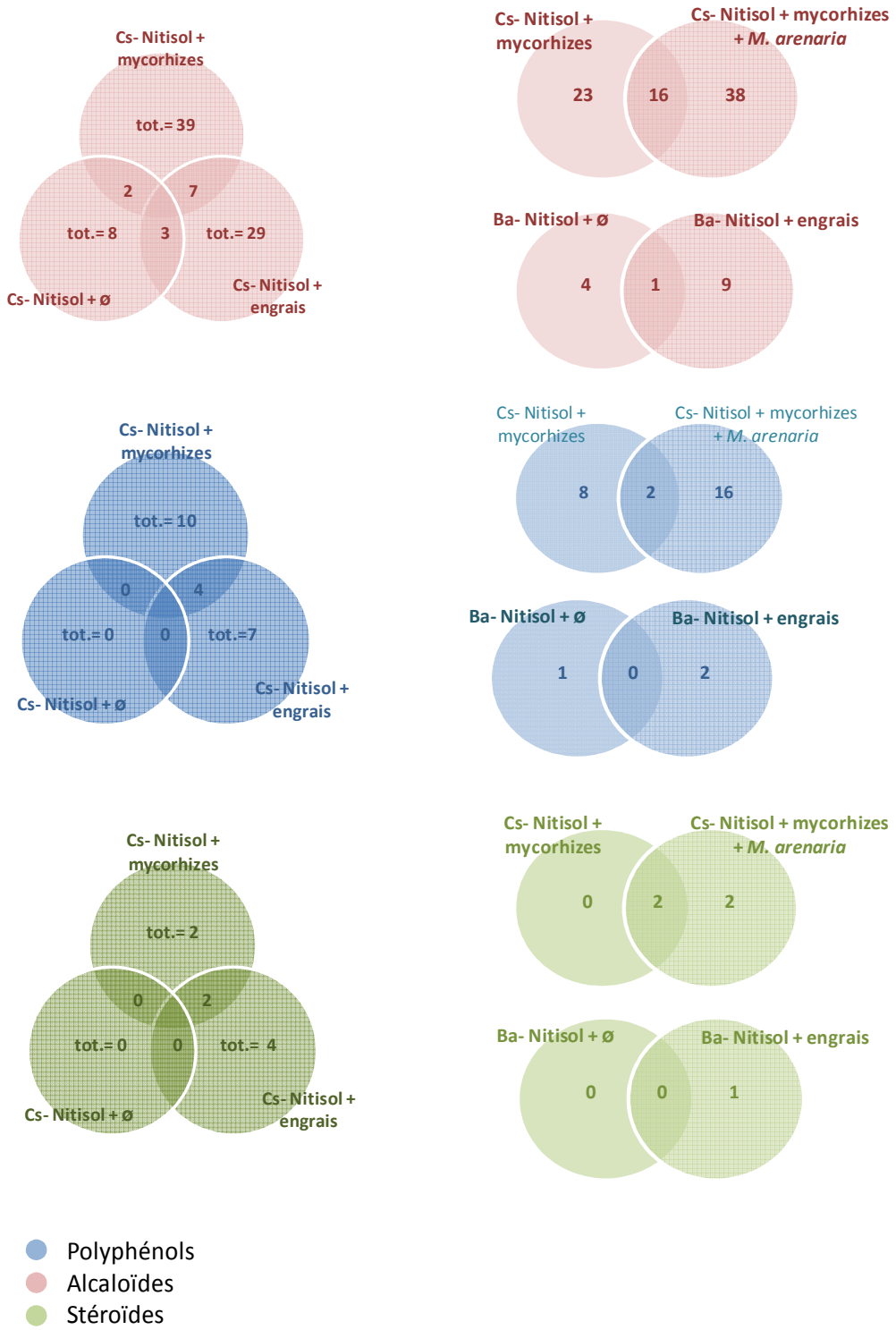


Figure 45. Analyse de la quantité de molécules répertoriées dans les trois familles de composé recherchées par comparaison entre traitements.

IV.3.2. Analyse qualitative

Un tableau en annexe 2 décline l'ensemble des molécules retrouvées lors de l'analyse en GC-MS, selon les traitements considérés.

Nous pouvons ainsi constater qu'il n'y a une seule molécule appartenant à la famille des alcaloïdes qui est présente uniquement chez les crotalaires : la « 4- Deoxypyridoxine ».

On peut également noter que la majorité des alcaloïdes identifiés sont présents dans les traitements avec *C. spectabilis* (Annexe 2).

En comparant les molécules retrouvées lors de l'analyse en GC-MS et celles répertoriées dans la base de donnée élaborée lors de la **revue analytique des molécules biochimiques** présentes chez les crotalaires (paragraphe II.2.), nous constatons que 5 molécules de la base de données ont été retrouvées lors de cette analyse GC-MS. Il s'agit de :

- la monocrotaline (pyrrolizidine alcaloïdes)
- l'apigenin-*8*-*C*-glucoside (flavonoïde glycosilée)
- la cadaverine (amine)
- le glucose (sucre)
- le xylulose (sucre)

PARTIE V : DISCUSSION GENERALE

PARTIE V : DISCUSSION GENERALE

Dans ce chapitre, nous développerons la discussion selon trois angles : i) l'interprétation de l'ensemble des analyses couvertes par la spectrophotométrie visible, ii) l'interprétation de l'ensemble des analyses couvertes par la GC-MS, iii) l'analyse croisée des résultats entre les biotests, la spectrophotométrie visible, et la GC-MS.

V.1. Analyse des résultats en spectrophotométrie visible

V.1.1. Effet du type de substrat et de la fertilisation chimique sur la composition biochimique des exsudats racinaires

Le type de substrat, et l'équilibre chimique (engrais) ont un effet marqué sur l'expression des propriétés biochimiques de trois espèces de plantes. L'ajout de l'engrais, qui fournit des nutriments à disponibilité immédiate, produit un changement important dans les profils biochimiques étudiés pour les trois familles de molécules. Ces résultats sont confirmés par plusieurs études. Lamarre (1983), montre que, dans le tabac, l'application d'engrais azoté augmente la concentration en alcaloïdes totaux, alors que les applications de phosphore et de potassium provoquent l'effet inverse. Hol et al. (2003), montrent qu'une augmentation des nutriments conduit à une réduction significative de la concentration en alcaloïdes pyrrolizidines dans les racines et les pousses de *Senecio jacobaea*.

En effet, les plantes libèrent leurs exsudats racinaires dans le sol qui peut interférer avec les propriétés allélopathiques des molécules émises par les exsudats racinaires. En raison de ses

propriétés mécaniques, chimiques, physiques et biologiques, le sol ne se comporte pas comme un milieu neutre, mais influe fortement sur l'immobilisation et le devenir de ces composés (Fisher, 1987). Il contient en effet, des colloïdes et des acides humiques qui interagissent avec les composés synthétisés par les plantes en formant des complexes, ou encore par adsorption, les rendant momentanément ou irréversiblement indisponibles (Huang et Garrett, 1977). La présence de micro-organismes peut aussi contribuer à la dégradation partielle ou totale de ces composés allélopathiques (Turner et Rice, 1975). Les deux substrats expérimentés ont des propriétés physico-chimiques opposées. En effet, le Nitisol est composé de 16 % de sable, de 16 % de limon et de 68 % d'argile et possède une teneur en matière organique comprise entre 2,7 et 3,3 %. Le substrat artificiel (SAP) est composé uniquement de sable (silice pure) et d'un polymère absorbant (grain d'eau). En termes d'interactions, un substrat de sol peut générer plus d'interactions avec les composés de la rhizosphère que le substrat inerte. Cette expérience met en évidence des stratégies d'adaptation possibles des plantes aux traitements imposés. Enfin, cette expérience confirme que les intrants chimiques peuvent considérablement modifier les profils biochimiques de la plante. Les métabolites secondaires sont, en effet, majoritairement produits lorsque la plante est en situation de stress. L'apport de minéraux, en créant des conditions plus favorables à la croissance et au développement des plantes (les besoins métaboliques étant, de ce fait réduits), expliquerait la diminution de la production de métabolites secondaires.

V.1.2. Effet de la présence ou de l'absence de nématodes et de champignons mycorhiziens sur la composition biochimique des exsudats racinaires

En présence du nématode *M. arenaria*, il est observé une diminution globale de la production en stéroïdes, en alcaloïdes et en polyphénols totaux chez les deux crotalaires. Chez le bananier, très sensible à *M. arenaria* (Cofcewicz et al., 2005), aucun changement significatif n'est observé dans le profil biochimique. Cette observation reste la même concernant le dosage des sous familles (flavonols, tanins condensés, et pyrrolizidine alcaloïdes totaux) pour les deux crotalaires (diminution des taux), et le bananier (pas de variation significative, les pyrrolizidines alcaloïdes étant absentes). Or, on se serait plutôt attendu à une augmentation du taux de ces molécules chez les deux crotalaires, qui sont des espèces végétales qui résistent à l'attaque de ce nématode. En effet, les résultats obtenus ne concordent pas avec des observations antérieures, selon lesquelles une plante résistante aux nématodes change son métabolisme biochimique pendant le processus d'infestation en augmentant la synthèse de molécules toxiques, tel que rapporté par Shaheen et al. (1984), pour le pin-bois infesté par *Bursaphelenchus xylophilus*, par Rich et al. (1977), pour les variétés de haricots infestés par *Pratylenchus scribneri* et par Veech et McClure (1977), pour les variétés de coton infestés par *M. incognita* au cours de leur croissance. Ainsi, les familles de composés dosées ne sont probablement pas celles qui sont requises lors de la défense des deux crotalaires face à *M. arenaria*. Toutefois, ces observations sont en accord avec les dosages réalisés chez le bananier où il n'y a pas de changement des profils biochimiques des sous familles de composés dosées en présence de *M. arenaria*. Une deuxième explication réside dans le fait que des mécanismes de défense autre que biochimiques peuvent être mis en place. En effet, de récentes études histologiques (Bellafiore et al., 2008, 2010) ont montré que les infections par *Meloidogyne*

n'induisent pas nécessairement une défense chimique des plantes résistantes, mais peuvent aussi provoquer des changements profonds dans le développement des cellules (hyperplasie et une hypertrophie ou une hyperactivité du noyau).

En présence de *R. similis*, où seuls les exsudats racinaires de *C. retusa* ont été récupérés, seuls les alcaloïdes et les stéroïdes totaux montrent une diminution significative, les polyphénols totaux ne variant pas de manière significative. Cette observation est en accord avec celle de Singh et Reddy (1985), qui n'ont observé aucun changement dans les concentrations de phénols chez le niébé (plante reconnue pour avoir une influence délétère sur le développement de nématodes du genre *Meloidogyne*) parasité par *M. incognita* et ceci, quelque soit le niveau d'infestation du nématode ou le niveau de résistance de la plante. On observe en revanche une augmentation des concentrations des flavonols et des pyrrolizidines alcaloïdes dans les exsudats de *C. retusa,* ce qui indique que dans ce cas de figure, il y a activation d'un mécanisme de défense produit via la synthèse de ces composés. Cette observation est donc en accord avec les résultats de Shaheen et al. (1984), Rich et al. (1977), et de Veech et McClure (1977), cités précédemment.

V.2. Analyse des résultats en GC-MS

Nous constatons qu'il y a synthèse de molécules spécifiques selon le traitement considéré. En effet, en présence d'engrais ou en présence de champignon mycorhizien, ou encore en présence ou en absence de nématodes, la composition qualitative des exsudats racinaires est différente. La plante synthétise donc des molécules qui sont différentes selon le traitement considéré, même si une faible fraction de molécules reste commune à certains de ces traitements.

V.3. Analyse croisée des données biochimiques et des résultats des biotests

V.3.1. Analyse croisée des biotests et de la spectrophométrie visible

En présence de *M. arenaria*, la production des métabolites secondaires contenus dans les exsudats racinaires des deux crotalaires diminue, comparativement aux quantités recueillies sur les exsudats en absence de ce nématode (Figure 46 A). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse, qu'en absence de *M. arenaria*, *C. spectabilis* et *C. retusa* synthétisent de grandes quantités de composés peu toxiques qui, accumulés, deviennent toxiques vis-à-vis de *M. arenaria*. En effet, de grandes quantités de composés sont dosées en spectrophotométrie visible en absence de ce nématode chez ces deux crotalaires.

A

	C. spectabilis			*C. retusa*			Bananier		
	PT	AT	S	PT	AT	S	PT	AT	S
Nitisol + mycorhizes	Ma Rs			Ma Rs			Ma Rs		
Nitisol + mycorhizes +*M. arenaria*	-35%	-49%	-66%	-80 %	-86%	-83%	+17%	+75%	+5%
	Ma			Ma			Ma		
Nitisol + mycorhizes +*R.similis*				+6%	-90%	-90%			
				Rs					

Les couleurs les plus intenses signifient un effet nématostatique très marqué qui diminue avec l'intensité. Le blanc signifie qu'il n'y a pas d'effet nématostatique

B

	C. spectabilis			*C. retusa*			Bananier		
	Fla	TC	PA	Fla	TC	PA	Fla	TC	PA
Nitisol + mycorhizes (témoin)	Ma Rs			Ma Rs			Ma Rs		
Nitisol + mycorhizes +*M. arenaria*	-86%	-97%	+23%	-63 %	-84%	-31%	+14%	-3%	
	Ma			Ma			Ma		
Nitisol + mycorhizes +*R. similis*				+345%	-78%	+1648%			
				Rs					

Figure 46. Analyse croisée des résultats obtenus lors des biotests avec les variations quantitatives des composés dosés en spectrophotométrie visible.

On note par ailleurs, que seul *C. spectabilis* conserve l'effet nématostatique déjà observé avec les exsudats racinaires non conditionnés en présence de ce nématode. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en présence de *M. arenaria*, *C. spectabilis* (qui diminue sa production en métabolites), produit de faibles quantités de composés qui sont à fort effet nématostatique (Figure 46 A) envers *M. arenaria* ou encore, active d'autres voies métaboliques pour se défendre (hyperplasie ou hypertrophie, noyau très actif, etc ..) (Bellafiore et al., 2008, 2010). Concernant *C. retusa,* qui perd son pouvoir nématostatique en présence de *M. arenaria*, nous pouvons supposer que la fraction de son métabolisme qui est monopolisée pour la création des cellules géantes (galles) devient trop importante, détournant ainsi la synthèse de composés efficaces pour sa défense.

Nous en concluons que *C. retusa* est sensible (hôte) à *M. arenaria*, tandis que *C. spectabilis* est une variété résistante (non hôte) voire tolérante à *M. arenaria*.

Nous constatons par ailleurs, que les exsudats racinaires de *C. retusa* récoltés en présence de *R. similis* (Nitisol + mycorhizes + *R. similis*), bien que concentrant plus de flavonols et de pyrrolizidines alcaloïdes (Figure 46 B), n'ont pas un effet nématostatique supérieur à celui obtenu avec les exsudats racinaires de *C. retusa* conditionnées en l'absence de *R. similis* (Cr-Nitisol + mycorhizes). Nous en concluons que cette variété de crotalaire est tolérante à *R. similis*.

Nous n'avons pas pu reproduire ces tests avec *C. spectabilis*, par manque d'inoculum et de graines. Mais il est néanmoins prouvé que *C. spectabilis* sécrète au niveau de ses racines un composé toxique appelé monocrotaline (Fassuliotis et Skucas, 1969), qui affecte la mobilité des juvéniles de *M. incognita* (Fassuliotis et Skucas, 1969 ; Chitwood, 2002). La présence de composés phénoliques a été associée au phénomène de lignification conférant une capacité de résistance à de nombreuses variétés de plantes vis-à-vis de divers pathogènes ; cette observation a par la suite permis de corréler le niveau élevé de composés phénoliques observés chez certaines plantes au phénomène de résistance face aux nématodes (Chitwood, 2002). Ces effets nématostatiques ont également été mis en évidence par Osei et al. (2010), avec les exsudats racinaires de *C. spectabilis* sur *Meloidogyne*, tandis que Jourand (2004 a et b), a observé ce même effet avec les extraits de jeunes pousses et les racines de cette même plante.

Wuyts et al. (2006), démontrent que des extraits de composés phénoliques simples sont des répulsifs et des inhibiteurs de la mobilité de *R. similis* et *M. incognita* et que les flavonols agissent en tant que composés répulsifs envers ces deux espèces de nématodes, alors que, dans leur forme dégradée, ils sont des inhibiteurs de la mobilité de *M. incognita*. Les effets observés lors des biotests sont donc en accord avec de nombreux résultats démontrés par de nombreux auteurs.

A ce stade, et à la lumière de nos analyses, on ne peut donc conclure au pouvoir nématostatique d'une plante sur la seule base de l'analyse globale d'un ensemble de molécules (grandes familles et sous-familles) avec les méthodes de spectrophotométrie visible. La GC-MS semble donc plus appropriée à la détermination spécifique des molécules mises en jeu, et donc, plus à même d'identifier celles responsables de l'effet nématorégulateur induit par ces changements biochimiques.

V.3.2. Analyse croisée des biotests et de la GC-MS

Parmi l'ensemble des traitements analysés en GC- MS il n'y a que deux traitements réalisés sur *C. spectabilis* (Nitisol + Mycorhizes et Nitisol + Mycorhizes + *M. arenaria*), pour lesquels nous disposions d'analyses communes en GC-MS et les biotests correspondants.

Afin de mettre en relation les effets nématostatiques observés lors des biotests avec les modifications biochimiques observées, la réalisation d'une analyse plus précise sera requise, au regard des m/z ou des temps de rétention des molécules en GC-MS, ce qui permettrait de déterminer précisément les molécules présentes. Par exemple, si l'on constate que les alcaloïdes synthétisés sont en majorité des pyrrolizidines alcaloïdes, il sera possible de conclure, à l'instar d'autres auteurs, que c'est de la présence de ce type d'alcaloïdes que découlent les propriétés nématostatiques des crotalaires étudiées. Nous constatons néanmoins, que cette analyse génère de nombreuses molécules, qui n'ont à ce jour, fais l'objet d'aucune recherches chez les crotalaires. Elle nous permettrait donc d'enrichir la base de données que nous avons créé initialement par le biais de la revue analytique entreprise.

En analysant les alcaloïdes présents dans ces deux traitements (Nitisol + Mycorhizes et Nitisol + Mycorhizes + *M. arenaria*), nous en trouvons deux qui possèdent un effet anthelmintique déjà prouvés : la piperazine dans le traitement Nitisol + Mycorhizes, et la

monocrotaline dans les deux traitements), et quatre qui sont des drogues possédant un pouvoir de sédation : la phenmethylamine et la pyrazoline, dans le traitement Nitisol + Mycorhizes, et la theophylline et la pirazine, dans le traitement Nitisol + Mycorhizes + *M. arenaria*. La présence de ces alcaloïdes pourrait expliquer, en partie, l'effet nématostatique observé lors des biostests.

PARTIE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

PARTIE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse se pose comme une étape indispensable à la compréhension fine du fonctionnement **allélopathique de plantes de service** pour une utilisation raisonnée en agriculture. La difficulté principale a reposé sur la **palette de disciplines ou techniques à mobiliser et à maîtriser** pour conduire à terme les objectifs de recherche définis : i) maîtrise de la production d'inoculum de nématodes, et de leur reconnaissance anatomique ; ii) maîtrise de la production de substrats naturels ou artificiels ; iii) maîtrise de la production d'exsudats racinaires sous différentes conditions environnementales; iv) adaptation de la technique des plantes à traire pour l'extraction d'exsudats et leur récupération/conditionnement pour analyse ; iv) maîtrise de techniques d'analyses biochimiques pour le « profiling ». La mise au point de cette chaîne analytique a constitué une étape lourde et n'a pas été sans contraintes diverses. Elle a, en tout cas, requis de nombreux partenariats qui constituent aujourd'hui une condition importante pour la poursuite de ce type de travaux sur d'autres plantes.

Ce travail met en exergue la conjugaison d'une double approche reposant, d'une part, sur la méta-analyse des interactions entre crotalaires et nématodes ayant permis la vérification de la variabilité des réponses obtenues, et, d'autre part, sur la démonstration de la sensibilité de la réponse biochimique des exsudats racinaires de plantes soumises à des contraintes liés aux conditions expérimentales. La conception du système CROSYNERS, comme paradigme analytique est également à souligner, au regard de la plupart des travaux menés sur ce sujet qui s'inscrivent dans un cadre beaucoup plus simpliste et univoque. Il en ressort une piste originale porteuse quant à la manière d'aborder le fonctionnement de plantes de services sous l'angle de **traits fonctionnels** beaucoup plus élaborés pour établir leur statut et leur efficience potentielle vis-à-vis du contrôle de nématodes. L'un des résultats les plus significatifs, réside dans le progrès réalisé dans la caractérisation du statut d'hôte des plantes testées. Ce résultat

apporte un éclairage sur les progrès à réaliser pour qualifier correctement le statut d'hôte des plantes et explique en partie la grande variabilité des réponses obtenues dans la littérature avec des espèces de crotalaires dites nématorégulatrices. Cette méthodologie devrait pouvoir profiter aux protocoles plus rigoureux à mettre en place pour déterminer le statut d'hôte.

Comparativement aux approches agronomiques classiques menées jusqu'alors en milieu contrôlé ou au champ, les recherches relatives au métabolisme des plantes, ouvrent par ailleurs une voie de portée générique pour l'analyse et la compréhension mécaniste de l'adaptation de plantes de service sous différentes contraintes environnementales. Les nouvelles possibilités offertes par la **métabolomique** revêtent, dans ce cadre, un intérêt tout particulier. Dans un cadre d'exploitation plus restreint, relatif à l'analyse GC-MS, et à l'exploitation de bases de données sur les composés métaboliques, la collaboration avec un laboratoire japonais en pointe sur ces techniques (National Agricultural Research Center for Hokkaido Region), et avec l'Université des West Indies (Département de Crop Sciences) a été requise. Nous avons dû, ainsi, nous limiter dans une première étape, à un choix restreint d'échantillons pour réaliser les premières analyses, et en éprouver la validité et l'intérêt. Le reste des échantillons est actuellement en cours d'analyse dans ce laboratoire, et un stage est prévu pour le traitement très lourd que requiert la détection des molécules et des familles biochimiques.

Ces travaux ont, pour l'instant, débouché sur la soumission d'un article dans la revue *Plant and Soil* intitulé : « Effect of phytoparasitic nematodes on the biochemical composition of root exudates of Crotalaria spp. and their allelopathic efficiency (Annexe 3). Un autre article est en préparation sur la valorisation de la méta-analyse et de la synthèse des propriétés biochimiques des crotalaires. Il sera soumis début 2013 dans la revue *Agronomy for*

Sustainable Development. Un troisième article est programmé pour le mois d'avril 2013 sur la valorisation de l'ensemble du « profiling » biochimique avec les méthodes de GC-MS.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons par ailleurs, dû nous restreindre à un nombre limité de traitements contrastés, et à des biotests en microcosme. Il est évident que l'établissement plus formel des traits fonctionnels des crotalaires étudiées devra être confronté à une gamme de traitements plus large, et, également être couplé à une **évaluation en conditions de champ**. La prise en compte de l'effet de techniques culturales reste une voie incontournable à considérer. Cette perspective pourrait s'inscrire dans la programmation d'un projet de thèse à venir.

Il est de plus important de rappeler que ces travaux constituent, globalement, un préalable important aux dispositions à prendre dans le cadre des réflexions visant à la promotion de **l'intensification écologique**. Si l'on veut prétendre à la maîtrise de fonctionnalités écologiques de plantes ou d'organismes biologiques en vue de la **fourniture services écosystémiques**, en substitution d'intrants chimiques, il faudra s'attacher à une compréhension plus fine du fonctionnement de ces organismes en relation avec les propriétés du milieu, et les techniques culturales. La maîtrise, à terme, de processus aussi complexes passe par le développement d'une démarche d'**ingénierie agroécologique**.

Enfin, il est intéressant de noter que l'effet nématostatique observé (et non nématicide), présente un intérêt biologique à valoriser dans le cadre d'une agriculture à Haute Qualité Environnementale, avec l'utilisation raisonnée de crotalaires. En effet, les molécules n'ayant pas de caractéristiques toxiques avérées contre les nématodes, il est légitime de penser que leurs effets nocifs sur la faune et la flore auxiliaire sont susceptibles d'être minimisés. La possibilité de production industrielle de biopesticides sous la maîtrise des conditions de milieu permettant la sélection en continu de molécules cibles, constitue, par ailleurs, une option très stimulante de poursuite sur les acquis de ce travail.

PARTTIE VII : BIBLIOGRAPHIE

PARTIE VII : BIBLIOGRAPHIE

Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V.C., 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. Nat. Biotechnol. 26, 909-915.

Argentieri, M.P., D'Addabbo, T., Tava, A., Agostinelli, A., Jurzysta, M., Avato, P., 2008. Evaluation of nematicidal properties of saponins from Medicago spp. Eur. J. Plant Pathol. 120, 189-197.

Aulakh, M., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J., Rennenberg, H., 2001. Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Plant biol (Stuttg) 3, 139-148.

Aulakh, M.S., Wassmann, R., Bueno, C., Rennenberg, H., 2001. Impact of root exudates of different cultivars and plant development stages of rice (*Oryza sativa* L.) on methane production in a paddy soil. Plant Soil 230, 77-86.

Ayers, S., Zink, D.L., Mohn, K., Powell, J.S., Brown, C.M., Murphy, T., Brand, R., Pretorius, S., Stevenson, D., Thompson, D., 2008. Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity in vitro. Phytochemistry 69, 541-545.

Bai, C.Q., Liu, Z.L., Liu, Q.Z., 2011. Nematicidal constituents from the essential oil of Chenopodium ambrosioides aerial parts. Journal of Chemistry 8, S143-S148.

Bais, H., Loyola-Vargas, V., Flores, H., Vivanco, J., 2001. Root-specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37, 730-741.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual review of plant biology 57, 233-266.

Barbosa, P., Gross, P., Kemper, J., 1991. Influence of plant allelochemicals on the tobacco hornworm and its parasitoid, *Cotesia congregata*. Ecology , 1567-1575.

Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., 2005. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. Parasitology- cambridge 131, 1-25.

Baskin, J., Ludlow, C., Harris, T.M., Wolf, F., 1967. Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subacaulis* (Leguminosae). Phytochemistry 6, 1209-1213.

Beier, R., 1990. Natural pesticides and bioactive components in foods. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 113, 47.

Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R., Rome, S., 1998. Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. Plant Soil 203, 27-36.

Bellafiore, S., Briggs, S.P., 2010. Nematode effectors and plant responses to infection. Curr. Opin. Plant Biol. 13, 442-448.

Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M.N., Abad, P., Shih, P., Briggs, S.P., 2008. Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. PLoS pathogens 4, e1000192.

Benkeblia, N., Shinano, T., Osaki, M., 2007. Metabolite profiling and assessment of metabolome compartmentation of soybean leaves using non-aqueous fractionation and GC-MS analysis. Metabolomics 3, 297-305.

Bertin, C., Yang, X., Weston, L.A., 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant Soil 256, 67-83.

Birchfield, W., Bistline, F., 1956. Cover crops in relation to the burrowing nematode, *Radopholus similis*. Plant Disease Reporter 40, 398-399.

Bocquene, G., Franco, A., 2005. Pesticide contamination of the coastline of Martinique. Mar. Pollut. Bull. 51, 612-619.

Bonan, H., Prime, J.L., 2001. Rapport sur la présence de pesticides dans les eaux de consommation humaine en Guadeloupe. Ministère de l'Aménagement du territoire et de l'environnement, Ministère de l'Emploi et de la solidarité Paris, France Rapport no. 2001-070, 77 pp.

Bouchelta, A., Boughdad, A., Blenzar, A., 2005. Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L.(Solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Homoptera: *Aleyrodidae*). Biotechnologie agronomie société et environnement 9, 259.

Brasseur, T., Angenot, L., 1986. Flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. Phytochemistry 25, 563-564.

Brodie, B.B., Good, J.M., Jaworski, C.A., 1970. Population Dynamics of Plant Nematodes in Cultivated Soil: Effect of Summer Cover Crops in Old Agricultural Land t. Journal of Nematology 2, 147-151.

Broeckling, C.D., Huhman, D.V., Farag, M.A., Smith, J.T., May, G.D., Mendes, P., Dixon, R.A., Sumner, L.W., 2005. Metabolic profiling of Medicago truncatula cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. J. Exp. Bot. 56, 323-336.

Broeckling, C.D., Reddy, I.R., Duran, A.L., Zhao, X., Sumner, L.W., 2006. MET-IDEA: data extraction tool for mass spectrometry-based metabolomics. Anal. Chem. 78, 4334-4341.

Brooks, F.E. 2008. Burrowing Nematode. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-1020-01.

Cabidoche, Y.M., Achard, R., Cattan, P., Clermont-Dauphin, C., Massat, F., Sansoulet, J., 2009. Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West

Indies: A simple leaching model accounts for current residue. Environmental pollution 157, 1697-1705.

Caswell, E.P., Sarah, J.L., Apt, W.J., 1990. Nematode parasites of pineapple. Plant parasitic nematodes of subtropical and tropical agriculture. , 519-537.

Cayrol, J.C., Djian-Caporalino, C., Panchaud-Mattei, E., 1992. La lutte biologique contre les nématodes phytoparasites. Courrier de la cellule environnement de l'INRA 17, 31-44.

Charles, J.S.C., 1995. Effect of intercropping antagonistic crops against nematodes in banana. Annals of Plant Protection Sciences 3, 185-187.

Chitwood, D.J., 2002. Phytochemical based strategies for nematode control 1. Annu. Rev. Phytopathol. 40, 221-249.

Clermont-Dauphin, C., Cabidoche, Y.M., Meynard, J.M., 2004. Effects of intensive monocropping of bananas on properties of volcanic soils in the uplands of the French West Indies. Soil Use Manage. 20, 105-113.

Cofcewicz, E., Carneiro, R., Randig, O., Chabrier, C., Quénéhervé, P., 2005. Diversity of Meloidogyne spp. on Musa in Martinique, Guadeloupe, and French Guiana. J. Nematol. 37, 313.

D'Addabbo, T., Avato, P., Tava, A., 2009. Nematicidal potential of materials from *Medicago spp.* Eur. J. Plant Pathol. 125, 39-49.

D'Addabbo, T., Carbonara, T., Leonetti, P., Radicci, V., Tava, A., Avato, P., 2010. Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. Phytochemistry Reviews , 1-17.

Dakora, F., Phillips, D., 1996. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 49, 1-20.

Davide, R.G., Frison, E.A., Horry, J.P., De Waele, D., 1995.Overview of nematodes as a limiting factor in Musa production. New Frontiers in Resistance Breeding for Nematode,

Fusarium and Sigatoka. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France, 27–31.

De Waele, D., Davide, R.G., 1998. Nématodes à galle des bananiers et plantains. Parasites et ravageurs des Musa.Fiche technique .

Delalonde, M., Barret, Y., Coumans, M., 1996. Development of phenolic compounds in maize anthers (*Zea mays*) during cold pretreatment prior to androgenesis. J. Plant Physiol. 149, 612-616.

De-la-Pena, C., Lei, Z., Watson, B.S., Sumner, L.W., Vivanco, J.M., 2008. Root-microbe communication through protein secretion. J. Biol. Chem. 283, 25247-25255.

Den Ouden, H., 1956. The Influence of Hosts and Non-Susceptible Hatching Plants On Populations of *Heterodera Schachtii*. 1, 138-144.

Djian-Caporalino, C., 2012. Root-knot nematodes (Meloidogyne spp.), a growing problem in French vegetable crops. EPPO Bulletin 42, 127-137.

Du, S.S., Zhang, H.M., Bai, C.Q., Wang, C.F., Liu, Q.Z., Liu, Z.L., Wang, Y.Y., Deng, Z.W., 2011. Nematocidal Flavone-C-Glycosides against the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) from *Arisaema erubescens* Tubers. Molecules 16, 5079-5086.

Einhellig, F.A., 1995. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. 582, 96-116.

El Allagui, N., Bourijate, M., Tahrouch, S., Hatimi, A., 2006. Effet de cinq extraits végétaux sur Meloidogyne spp. de la tomate. Biochimie, Substances Naturelles et Environnement . 357-360.

Ellenby, C., 1945. The influence of crucifers and mustard oil on the emergence of larvae of the potato-root eelworm, Heterodera rostochtensis Wollenweber. Ann. Appl. Biol. 32, 67-70.

Endo, B., 1959. Responses of root-lesion nematodes, *Pratylenchus brachyurus* and *P. zeae*, to various plants and soil types. Phytopathology 49, 417-421.

Evans, K., Rowe, J., 1998. Distribution and economic importance. The cyst nematodes , 1-30.

Fassuliotis, G., Skucas, G., 1969. The effect of pyrrolizidine alkaloid ester and plants containing pyrrolizidine on *Meloidogyne incognita acrita*. J. Nematol. 1, 287-288.

Fisher, R.F., 1987. Allelopathy: a potential cause of forest regeneration failure. Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry , 176-184.

Fletcher, J.S., Hegde, R.S., 1995. Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation. Chemosphere 31, 3009-3016.

Gakuru, S., Foua, B., 1996. Effects of plant extracts on the cowpea weevil *(Callosobruchus maculatus Fab.*) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). Cah.Agric 5, 39-42.

Gallaher, R.N., McSorley, R., Dickson, D.W., 1991. Nematode densities associated with corn and sorghum cropping systems in Florida. J. Nematol. 23, 668.

García, J.A.L., Barbas, C., Probanza, A., Barrientos, M., Mañero, F.J.G., 2001. Low molecular weight organic acids and fatty acids in root exudates of two *Lupinus* cultivars at flowering and fruiting stages. Phytochem. Anal. 12, 305-311.

Gommers, F., Bakker, J., 1988. Physiological diseases induced by plant responses or products. 1, 3-22.

Gontier E., Clément A., Bourgaud F., Guckert A., Procédé de production de métabolites à partir de plantes. Brevets (1999). FR99 14204, EP 00976113.1, PCTFR0003095.

Gontier, E., Clément, A., Tran, T., Gravot, A., Lièvre, K., Guckert, A., Bourgaud, F., 2002. Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production. Plant Science 163, 723-732.

Gonzaga, V., Ferraz, S., 1994. Efeito da incorporação da parte aérea de algumas espécies vegetais no controle de *Meloidogyne incognita Raça* 3. Nematologia Brasileira 18, 42-49.

Good, J., Minton, N., Jaworski, C., 1965. Relative susceptibility of selected cover crops and coastal bermudagrass to plant nematodes. Phytopathology 55, 1026-1030.

Goswami, B., Vijayalakshmi, K., 1986. Nematicidal properties of some indigenous plant materials against root-knot nematodes, Meloidogyne incognita on tomato. Indian Journal of Nematology 16, 65-68.

Gronquist, M., Bezzerides, A., Attygalle, A., Meinwald, J., Eisner, M., Eisner, T., 2001. Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). Proceedings of the National Academy of Sciences 98, 13745.

Guérout, R., 1969. Action des plantes ameliorantes en culture ananas. III. Bilan Nématologique Fruits outre mer 24, 436-443.

Halbrendt, J.M., 1996. Allelopathy in the management of plant-parasitic nematodes. J. Nematol. 28, 8.

Haroon, S., Smart Jr, G., 1983b. Root extracts of pangola digitgrass affect egg hatch and larval survival of *Meloidogyne incognita*. J. Nematol. 15, 646-650.

Haroon, S., Smart Jr, G.C., 1983a. Effects of Pangola, Digitgrass on *Meloidogyne arenaria*, *M. javanica*, and *M. hapla*. J. Nematol. 15, 649.

Hauggaard-Nielsen, H., Jensen, E.S., 2005. Facilitative Root Interactions in Intercrops. Plant Soil 274, 237-250.

Heilerova, L., Buckova, M., Tarapci, P., Silhar, S., Labuda, J., 2003. Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), oregano (*Origanum vulgare L.*), thyme (*Thymus* vulgaris L.), and agrimony (*Agrimonia eupatoria L.*) obtained by conventionalmethods and the DNA-based biosensor. Czech journal of food sciences 21, 78-84.

Hijink, M., Suatmadij, R.W., 1967. Influence of different compositae on population density ofPratylenchus penetrans and some other root-infesting nematodes. Eur. J. Plant Pathol. 73, 71-82.

Hol, W., Vrieling, K., Van Veen, J., 2003. Nutrients decrease pyrrolizidine alkaloid concentrations in *Senecio jacobaea*. New Phytol. 158, 175-181.

Hooks, C.R.R., Wang, K.H., Ploeg, A., McSorley, R., 2010. Using marigold (Tagetes spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. Applied Soil Ecology . 46, 307-320.

Houdart, M., Bonin, M., Temple, L., 2009. Dynamique d'acteurs (agriculteurs et institutions) et innovation agro-écologique pour la gestion des risques environnementaux en Guadeloupe. VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement 9.

Huang, C.S., Tenente, R.C.V., Da Silva, F.C.C., Lara, J.A.R., 1981. Effect *of Crotalaria Spectabilis* and Two Nematicides, On Numbers of *Meloidogyne Incognita* and *Helicotylenchus Dihystera*. Nematologica 27, 1-5.

Huang, J.C., Garrett, J.T., 1977. Effects of Polyelectrolytes and Clay Colloids on Carbon Adsorption. Water and Sewage Works 124, 64-67.

Hughes, M., Donnelly, C., Crozier, A., Wheeler, C., 1999. Effects of the exposure of roots of *Alnus glutinosa* to light on flavonoids and nodulation. Botany 77, 1311-1315.

Inderjit, D.S.O., Duke, S., 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. Planta-Berlin 217, 529-539.

Inomoto, M.M., 1994. Reaçoes de algumas plantas ao nematoide cavernicola. Nematologia Brasileira 18, 21-27.

Jasy, T., Koshy, P., 1992. Effect of certain leaf extracts *(Crotalaria juncea, Ricinus communis*) and leaves of *Glyciridia maculata* (HB & K.) Steud, *Ricinus communis*, as green manure on *Radopholus similis*. Indian Journal of Nematology 22, 117-121.

Jasy, T., Koshy, P., 1994. Effect of certain leaf extracts and leaves of *Glyricidia maculata*,(HB and K.) Steud. as green manure on *Radopholus similis*. Indian Journal of Nematology 22, 117-121.

Johnson, L., Shamiyeh, N., 1975. Effect of soil amendments on hatching of *Meloidogyne incognita* eggs. Phytopathology 65, 178-171.

Johnson, L.F., Shamiyeh, N., 1975. Effect of soil amendments on hatching of Meloidogyne incognita eggs. Phytopathology 65, 178-171.

Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere–a critical review. Plant Soil 205, 25-44.

Jourand, P., Rapior, S., Fargette, M., Mateille, T., 2004a. Nematostatic activity of aqueous extracts of West African *Crotalaria* species. Nematology 6, 765-771.

Jourand, P., Rapior, S., Fargette, M., Mateille, T., 2004b. Nematostatic effects of a leaf extract from *Crotalaria virgulata subsp. grantiana* on *Meloidogyne incognita* and its use to protect tomato roots. Nematology 6, 79-84.

Kashaija, I.N., McIntyre, B.D., Ssali, H., Kizito, F., 2004. Spatial distribution of roots, nematode populations and root necrosis in highland banana in Uganda. Nematology 6, 7-12.

Kloepper, J.W., Rodríguez-Kábana, R., McInroy, J.A., Collins, D.J., 1991. Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. Plant Soil 136, 95-102.

Koenning, S.R., 1985. Gnotobiotic techniques for plant-parasitic nematodes.

Koenning, S., Overstreet, C., Noling, J., Donald, P., Becker, J., Fortnum, B., 1999. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. J. Nematol. 31, 587.

Lamarre, M., 1983. Influence de la fertilisation N, P ET K sur la composition biochimique du tabac à cigarette. Canadian Journal of Plant Science 63, 523-529.

Lambers, H., Colmer, T., 2005. Root Physiology from Gene to Function. Plant Soil 274, vii-xv.

Lambert, K. and Bekal, S., 2002. Introduction to Plant-Parasitic Nematodes. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1218-01.

La Mondia, J.A., 1996. Trap crops and population management of *Globodera tabacum*. J. Nematol. 28, 238.

Lear, B., 1959. Application of castor pomace and cropping of castor beans to soil to reduce nematode populations. Plant Dis.Rep 43, 459-460.

Leather, G.R., Einhellig, F.A., 1986. Bioassays in the study of allelopathy.

Lee, H.S., 2002. Inhibitory activity of Cinnamomum cassia bark-derived component against rat lens aldose reductase. J. Pharm. Pharm. Sci. 5, 226-230.

Liao, H., Wan, H., Shaff, J., Wang, X., Yan, X., Kochian, L.V., 2006. Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. Plant Physiol. 141, 674.

Ma, J.F., 2000. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. Plant and Cell Physiology 41, 383.

Marcar, N.E., Dart, P., Sweeney, C., 2006. Effect of root-zone salinity on growth and chemical composition of Acacia ampliceps BR Maslin, A. auriculiformis A. Cunn. ex Benth. and A. mangium Willd at two nitrogen levels. New Phytol. 119, 567-573.

Marie-Magdeleine, C., Hoste, H., Mahieu, M., Varo, H., Archimede, H., 2009. In vitro effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 161, 99-105.

Marie-Magdeleine, C., Hoste, H., Mahieu, M., Varo, H., Archimede, H., 2010. In vitro effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 161, 99-105.

Marla, S., Huettel, R., Mosjidis, J., 2008. Evaluation of *Crotalaria juncea* populations as hosts and antagonistic crops to manage *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis.* Nematropica 38, 155-161.

Marston, A., Zagorski, M.G., Hostettmann, K., 1988. Antifungal Polyphenols from Cordia goetzeiGürke. Helv. Chim. Acta 71, 1210-1219.

Mazid, M., Khan, T.A., Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biol.Med 3, 232-249.

McSorley, R., Dickson, D., De Brito, J., Hewlett, T., Frederick, J., 1994. Effects of tropical rotation crops on *Meloidogyne arenaria* population densities and vegetable yields in microplots. J. Nematol. 26, 175.

Merwin, I., Stiles, W., 1989. Root-lesion nematodes, potassium deficiency, and prior cover crops as factors in apple replant disease. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 114, 724-728.

Miller, P., Turner, N., Tomlinson, H., 1973. Toxicity of leaf and stem extracts to Tylenchorhynchus dubius. J. Nematol. 5, 173.

Minh, T.T.L., Mignard, B., Vinter, E., Ayala, O., Hồng, P.V.C., Tuyến, B.C., Dechaux, C., Lanoue, A., Boitel-Conti, M., Bourgaud, F., 2004. Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia mill.* cultivé en hydroponie; Evaluation d'un procédé générique de production de métabolites végétaux à usage thérapeutique et/ou cosmétique.

Minton, N., Parker, M., 1987. Root-knot nematode management and yield of soybean as affected by winter cover crops, tillage systems, and nematicides. J. Nematol. 19, 38-43.

Mojtahedi, H., Santo, G.S., Hang, A.N., Wilson, J.H., 1991. Suppression of root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure. J. Nematol. 23, 170-174.

Moura, R.M., 1991. Two years of crop rotation on sugarcane fields to control root-knot part I; Effect of the treatments on the nematode population. Nematologia Brasileira 15, 1-7.

Ndakidemi, P.A., Dakora, F.D., 2003. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. Functional Plant Biology 30, 729-745.

Noling, J.W., Becker, J., 1994. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. J. Nematol. 26, 573.

Ogiga, I., Estey, R., 1974. The use of meldola blue and nile blue A, for distinguishing dead from living nematodes. Nematologica 20, 271-276.

Oostendorp, M., Dickson, D., Mitchell, D., 1991. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. J. Nematol. 23, 58.

Osei, K., Fening, J.O., Gowen, S.R., Jama, A., 2010. The potential of four non traditional legumes in suppressing the population of nematodes in two Ghanaian soils. Journal of Science and Environmental Management 1, 63-68.

Patterson, D., 1981. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*). Weed Sci. , 53-59.

Peacock, F.C., 1957. Studies on root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* in the Gold Coast. Nematologica 2, 76-84.

Polhill, R., 1982. Crotalaria in Africa and Madagascar: 389 p. Rotterdam, Balkema .

Potter, J., Olthof, T.H.A., Evans, K., Trudgill, D., Webster, J., 1993. Nematode pests of vegetable crops. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. , 171-207.

Prakash, A.S., Pereira, T.N., Reilly, P.E.B., Seawright, A.A., 1999. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 443, 53-67.

Price, M.L., Van Scoyoc, S., Butler, L.G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agric. Food Chem. 26, 1214-1218.

Quénéhervé, P., Serge, M., Frédéric, S., Virginie, B., 2010. Research note- nota investigativa xenic culturing of plant parasitic nematodes: artificial substrates better than soil- based culture systems? Nematropica 40, 269-274.

Reddy, K.C., Soffes, A.R., Prine, G.M., Dunn, R.A., 1986. Tropical legumes for green manure. II. Nematode populations and their effects on succeeding crop yields. Agronomy journal (USA) .

Rice, E.L., 1984. Allelopathy. Physiological ecology. .

Rich, J.R., Keen, N.T., Thomason, I.J., 1977. Association of coumestans with the hypersensitivity of Lima bean roots to *Pratylenchus scribneri*. Physiological Plant Pathology 10, 105-116.

Rich, J., Rahi, G., Opperman, C., Davis, E., 1989. Influence of the castor bean (Ricinus communis) lectin (ricin) on motility of Meloidogyne incognita. Nematropica 19, 99-103.

Rich, J.R., Rahi, G.S., 1995. Suppression of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* on Tomato with Ground Seed of Castor, Crotalaria, Hairy Indigo and Wheat. Nematropica 25.

Rivoal, J., Hanson, A., 1994. Metabolic Control of Anaerobic Glycolysis (Overexpression of Lactate Dehydrogenase in Transgenic Tomato Roots Supports the Davies-Roberts Hypothesis and Points to a Critical Role for Lactate Secretion. Plant Physiol. 106, 1179-1185.

Rodriguez-Kabana, R., 1986. Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. J. Nematol. 18, 129.

Rodriguez-Kabana, R., Weaver, D.B., Robertson, D.G., King, P.S., Carden, E.L., 1990. Sorghum in rotation with soybean for the management of cyst and root-knot nematodes. Nematropica 20, 111-119.

Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R.N., Willmitzer, L., 2001. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. The Plant Journal 23, 131-142.

Sano, Z., Nakasono, K., 1986. Histological responses of three leguminous enemy plants to the penetration and development of *Meloidogyne incognita*. Japanese Journal of Nematology (Japan) 16, 48-55.

Sano, Z., Nakasono, K., Araki, M., 1983. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* in some enemy and host plants. Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu (Japan) 29, 132-136.

Santos, M.A., Ruano, O., 1987. Reação de plantas usadas como adubos verdes a *Meloidogyne incognita raça 3* e *M. javanica*. Nematologia brasileira 11, 184-197.

Sasser, J., Freckman, D., 1987. A world perspective on nematology: the role of the society.

Sayre, R., Patrick, Z., Thorpe, H., 1965. Identification of a selective nematicidal component in extracts of plant residues decomposing in soil. Nematologica 11, 263-268.

Sellami, S., Mouffarrah, A., 1994. Effet des extraits aqueux de quelques plantes sur la mortalite et l'eclosion des larves de *Meloidogyne incognita*. Medelingen- faculteit landbouwkundige en toegepaste biologische wetenschappen 59, 813-813.

Shaheen, F., Winter, R., Bolla, R., 1984. Phytotoxin production in *Bursaphelenchus xylophilus*-infected *Pinus sylvestris*. J. Nematol. 16, 57.

Shai, L., Bizimenyera, E., Bagla, V., McGaw, L., Eloff, J., 2010. *Curtisia dentata (Cornaceae)* leaf extracts and isolated compounds inhibit motility of parasitic and free-living nematodes. Onderstepoort J. Vet. Res. 76, 249-256.

Sharma, R.D., Scolari, D.D.G., 1984. Efficiency of green manure and crop rotation in the control of nematodes under savannah conditions.. Nematologia Brasileira 8, 193-218.

Siddiqui, M., Alam, M., 1987. Control of plant-parasitic nematodes by intercropping with *Tagetes minuta*. Nematologia Mediterranea 15, 205-211.

Silva, G.S., Ferraz, S., Santos, J.M., 1989. Atração, penetração e desenvolvimento de larvas de *Meloidogyne javanica* em raízes de crotalária spp. Nematologia Brasileira 13, 151-163.

Singh, D., Sharma, S.K., Rani, R., Mishra, S., Sharma, R.A., 2011. Kaempferol-7-O-Glucoside and their Antimicrobial Screening isolate from *Cassia renigera* Wall. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 3, 30-34.

Singh, D.B., Reddy, P.P., 1985. Nature of resistance to *Meloidogyne incognita* in cowpea, *Vigna ungviculata*. Nematologia mediterranea 13, 127-132.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Meth. Enzymol. 299, 152-178.

Soriano, I.R., Asenstorfer, R.E., Schmidt, O., Riley, I.T., 2004. Inducible flavone in oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. Phytopathology 94, 1207-1214.

Speijer, P.R., Kajumba, C., 2000. Yield loss from plant parasitic nematodes in East African highland banana (Musa spp. AAA). Acta Horticulturae , 453-460.

Stoeckli-Evans, H., 1979. Monocrotaline: a pyrrolizidine alkaloid. Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry 35, 231-234.

Suatmadji, W.R., 1969. Studies on the effect of *Tagetes* species on plant parasitic nematodes. Mededeling/Laboratorium voor Phytopathologie, serie nematologie (62) .

Subramaniyan, S., Vadivelu, S., 1990. Effects of *Crotalaria spectabilis* extracts on *Meloidogyne incognita*. International Nematology Network Newsletter 7, 8-9.

Swain, T., 1977. Secondary compounds as protective agents. Annual Review of Plant Physiology 28, 479-501.

Swain, T., Hillis, W., 1959. The phenolic constituents of Prunus domestica. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10, 63-68.

Szabó, B., Lakatos, Á., Kőszegi, T., Botz, L., 2003. HPTLC and HPLC determination of alkaloids in poppies subjected to stress. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC 16, 293-297.

Tang, C.S., Young, C.C., 1982. Collection and Identification of Allelopathic Compounds from the Undisturbed Root System of Bigalta Limpograss (*Hemarthria altissima*). Plant Physiol. 69, 155-160.

Tiyagi, S., Bano, M., Alam, M.M., 1988. Evaluation of nematicidal potential in some plant species belonging to family Compositae. Indian Journal of Nematology 18, 223-228.

Townshend, J., Davidson, T., 1960. Some weed hosts of Pratylenchus penetrans in Premier strawberry plantations. Canadian Journal of Botany 38, 267-273.

Turner, J.A., Rice, E.L., 1975. Microbial decomposition of ferulic acid in soil. J. Chem. Ecol. 1, 41-58.

Uren, N.C., 2007. 1 Types, Amounts, and Possible Functions of Compounds Released into the Rhizosphere by Soil-Grown Plants. The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface , 1.

Van den boogert, P. H. J. F., Velvis, H., Ettema, C.H., Bouwman, L.A., 1994. The role of organic matter in the population dynamics of the endoparasitic nematophagous fungus, *Drechmaria coniospora* in microcrosms. Nematropica 40, 249-257.

Veech, J., McClure, M., 1977. Terpenoid aldehydes in cotton roots susceptible and resistant to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. J. Nematol. 9, 225.

Vidhyasekaran, P., 1988. Physiology of disease resistance in plants. Volume 2, 128 pp.

Vincente, N., Acosta, N., 1987. Effects of Mucuna deeringiana on Meloidogyne incognita. Nematropica 17, 99-102.

Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M., 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. Plant Physiol. 132, 44-51.

Wang G.X., Han J., Zhao L.W., Jiang D.X., Liu Y.T., Liu X.L., 2010. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla*. Phytomedicine 17, 1102-1105.

Wang, K.H., 2000. Management of *Rotylenchulus reniformis* in Hawaiian pineapple with tropical cover crops.

Wang, K.H., Sipes, B., Schmitt, D., 2002. Crotalaria as a cover crop for nematode management: a review. Nematropica 32, 35-57.

Wang, K.H., Sipes, B.S., Schmitt, D.P., 2001. Suppression of Rotylenchulus reniformis by *Crotalaria juncea, Brassica napus*, and *Tagetes erecta*. Nematropica 31, 235-249.

Wang, P., Bi, S., Wang, S., Ding, Q., 2006. Variation of wheat root exudates under aluminum stress. J. Agric. Food Chem. 54, 10040-10046.

Wang, X.B., Li, G.H., Zheng, L.J., Ji, K.Y., Lü, H., Liu, F.F., Dang, L.Z., Mo, M.H., Zhang, K.Q., 2009. Nematicidal Cardenolides from Nerium indicumMill. Chemistry & biodiversity 6, 431-436.

Waterman, P.G., Mole, S., 1989. Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. Insect-plant interactions 1, 107-134.

Watt, M., Evans, J.R., 1999. Linking development and determinacy with organic acid efflux from proteoid roots of white lupin grown with low phosphorus and ambient or elevated atmospheric CO2 concentration. Plant Physiol. 120, 705.

Westerdahl, B.B., Caswell-Chen, E.P., Bugg, R.L., 1998. Nematodes. In: Engels, C. (Ed.),

Whitehead, D., 1964. Identification of p-hydroxybenzoic, vanillic, p-coumaric and ferulic acids in soils. Nature 202, 417 – 418.

Winslow, R., 1955. The hatching responses of some root eelworms of the genus Heterodera. Ann. Appl. Biol. 43, 19-36.

Wuyts, N., Swennen, R., De Waele, D., 2006. Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis, Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. Nematology 8, 89-101.

Xia, J., Roberts, J., 1996. Regulation of H extrusion and cytoplasmic pH in maize root tips acclimated to a low-oxygen environment. Plant Physiol. 111, 227-233.

Zak, B., 1957. Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. Tech. Bull. Regist. 27, 6-71.

ANNEXE 1 : Quelques exemples de plantes de services utilisées pour leurs diverses propriétés contre les nématodes

Espèces végétales testées	Partie de la plante utilisée	Nématodes visé	Résultats	Références bibliographiques
Acacia gummifera *Ceratonia siliqua* *Ononis natrix* *Tagetes patula* *Peganum harmala*	Extrait aqueux à partir de feuilles	*Meloidogyne spp* de la tomate	Effet nématicide (Flavonoïdes, tanins, aglycones, terpènes) variant de 60 à 95 % de mortalité *in vitro*.	El Allagui et al., 2006
Tagetes patula	Couverture végétale, engrais vert, rotation	Contre les nématodes en général	Contrôle des populations	Winoto Suatmadji, 1969 ; Hooks et al., 2010
Tagetes minuta		*Meloidogyne incognita, M. javanica*	Contrôle des populations	Good et al., 1965
Tagetes lucida, T. minuta, T. tenuifolia	Residus de feuilles, fleurs, tige	*Meloidogyne incignita*	Contrôle des populations	Siddiqui et Alam, 1987
Rudbeckia serotina, R. bicolor		*Tylenchorhynchus dubius*	Contrôle des populations	Hijink et Winoto Suatmadji, 1967
Zinnia	Culture intercallée de tomate	*M.incognita et nématodes réniformes*	Réduction des populations	Tiyagi et al., 1988

Crotalaria spectabilis		*Meloidogyne spp.*	Réduction des populations	Brodie et al., 1970
Cajanus cajan, Aeschynomene americana, indigotier, Mucuna deeringiana	Engrais vert	*M. incognita*	Réduction des populations	Reddy et al., 1986
Desmodium spp.		Nématodes noueuses des racines sauf *M. halpha*	Résistante	Good et al., 1965
Luzerne ou soja	Feuille et tige (1 à 8 % / masse de sol)	*M.incognita*	Inhibe l'éclosion des oeufs	Johnson et Shamiyeh, 1975
Phaseolus vulgaris	Extrait de feuille et tige (pas les racines)	*Tylenchorhynvhus dubius*	Toxique = inactivation de 95 % en 24 h	Miller et al., 1973
Légumineuse		*Meloidogyne*	Azote sous forme d'ammonium (380 µg/g) ⇨ réduction population	Johnson et Shamiyeh, 1975
Avoine	Substance près des racines	*Pratylenchus zea, P. brachyrus*	Très résistante. Pas de reproduction près des racines	Endo, 1959
Avoine	Engrais vert (replantation avant pommier)	*Pratylenchus penetrans*	Contrôle des populations	Merwin et Stiles, 1989
Seigle	Décomposition (production	*M.incognita, P. penetrans*	Immobilisation des larves	Sayre et al., 1965

	d'acides butyrique)			
Seigle	Engrais vert travaillé au chisel	*M.incognita*	Réduction des populations	Minton et Parker, 1987
Seigle	Pré- culture à de l'arachide	*M.arenaria*	Population plus faible // jachère, vesce	Oostendorp et al., 1991
Blé d'hiver	Après culture de soja	*P.brachyurus*	Réduction des populations	Koenning et al., 1985
Moutarde noire, blanche, cresson	Interculture avec pomme de terre	*H. rostoschiensis*	Contrôle des populations	Ellenby, 1945
Hesperis matronalis		*Heterodera schachtii*	Réduction de 66 % des populations	Den Ouden, 1956
Colza	Engrais vert d'automne	*M.halpha, M. chitwoodi*	Réduction des populations	Mojtahedi et al., 1991
Solanum nigrum	jachère	*H. rostoschiensis*	Hôtes défavorables	Winslow, 1995
Tomate, tabac	Ajout de 1 % / poids de terre de feuilles	*Tylenchorhynchus dubius*	Réduction des populations en 3 jours	Miller et al., 1973
Convolvulus arvensis, Arctium minus, Matricaria matricarioides		*P.penetrans*	Hôtes peu favorables	Townshend et Davidson, 1960
Eichhornia crossipes	Amendement au sol	Nématodes des racines noueuses, et nématodes réniformes	Contrôle des populations	Siddiqui et Alam, 1987
Chenopodium	Partie aériennes	*Meloidogyne*	Activité nématicide	Bai et al., 2011

ambrisiodes		*incognita*		
Calendula officinalis, Enhydra fluctuans	En culture sur sol	*M.incognita*	Réduction des larves, de l'éclosion des œufs, de la formation de galles	Goswami et Vijayalakshmi, 1986
Mucuna deeringiana	En culture sur sol	*M.incognita*	Réduction des galles et de l'infection	Vincente et Acosta, 1987
Ricinus communis	En culture sur sol	*M.arenaria* juvéniles	Réduction de la population Production de toxine (ricin) contre les nématodes	Lear, 1959 Rich et al., 1989
Canavalia ensiformis, Mucuna deeringiana, Crotalaria spectabilis	En culture sur sol	*M.arenaria, H. glycines*	Inhibe le développement	Rodriguez-Kabana et al., 1990

ANNEXE 2 : Liste des molécules détectées en GC-MS en fonction des traitements (en surligné, les molécules qui ont servi lors de l'analyse pour notre étude)

	Cs – Nitisol + ø	Ba – Nitisol + ø	Cs – Nitisol + engrais	Ba – Nitisol + engrais	Cs – Nitisol + mycorhizes	mycorhizes + M. arenaria	Familles de molécules
1-fluoro-2-iodo			X				
pentafluoroiodo			X				
1,3-Benzenedicarboxylic acid						X	
1,3-Diaza-5,6-dedihydrocyclohexan-4-one-2-thione-5-methamine			X				
1,3-Dioxolane						X	
1,3-Dithiane			X				
1,3-propandione					X		Alcaloïdes
1,4-benzodiazepin-2-one			X				Alcaloïdes
1,5-naphthyridine					X		Alcaloïdes
1,4-Butanediamine						X	Amines
1,4-Dimethyl-6-phenyl-naphthalene						X	
1-Formyl-2-phenyl-5-methyl-pyrrole)	X						Alcaloïdes
1-Adamantyl					X	X	
2,3-Dicyano-5-methyl-6-phenylpyrazine						X	Alcaloïdes
1-Hydroxycyclohexane-1-carboxylic acid						X	
2,2-Dimethylbutanoic acid						X	
2,6-Dimethyl-4-phenylpyridine						X	Alcaloïdes
2,4,4',6-Tetraacetoxybenzophenone						X	
2-Carbethoxy-N-methylpyrrolidine						X	Alcaloïdes
2,4-Pentanedione						X	
2,5-Methanothiopyrano						X	
2H-Imidazole						X	Alcaloïdes
2-Piperidinecarboxylic acid			X		X	X	Alcaloïdes
2-Azetidinone					X		
2-Bromo dodecane			X				
2-Buten-1-one					X		

2-Butenedioic acid					X		diacide
2-Butynedinitrile			X				
2-thiazolamine					X		Alcaloïdes
4-Benzylimidazole					X	X	Alcaloïdes
2-Keto-l-gluconic acid	X		X		X	X	Acides organiques
2-Methylacetoacetic acid			X				
2-Oxazolidinethione					X		
2-Penten-2,4-diol					X	X	
4-Deoxypyridoxine	X		X		X	X	Alcaloïdes
2-Propenoic acid					X	X	
4-oxobutyric acid						X	Alcaloïdes
3,4-Dihydroxybutanoic acid						X	
3,4-Oxazolidinecarboxylic acid					X		
5,6-Dimethyl-2-diethylaminopyridine-3,4-dicarboxyimide						X	Alcaloïdes
3-Indolylglyoxyldi-n-propylamide					X		
5-Cyano-1,2,3-thiadiazole					X		Alcaloïdes
8-Quinolinamine			X			X	Alcaloïdes
3-Phenyl lactic						X	Acides aromatiques
9-Phenanthrenemethyl cinnamate						X	Alcaloïdes
4-Biphenylol					X		
acridan						X	Alcaloïdes
4'-dicarboxylic acid						X	
4-Iodo-2,6-dimethylaniline					X	X	
Acridin-9-yl					X		Alcaloïdes
Benzimidazole					X		Alcaloïdes
Bipyridine					X		Alcaloïdes
5-Propoxy-2,2'-bipyridyl					X		
6-Dioxa-2,7-disilaoctane			X				
6-Hydroxy-heptanoic acid						X	
7-Tridecanol						X	
Carazolol						X	Alcaloïdes
Carbanilide						X	Alcaloïdes
carboline				X	X	X	Alcaloïdes

acetamide			X		X	X	
Acetic acid	X					X	
acetone						X	
acetophenone			X		X	X	cétone aromatique
chloropyrazinecarbonic acid		X					Alcaloïdes
Di-acridin					X		Alcaloïdes
Adamantyl				X			
Alanine			X		X	X	Acides aminés
Alloxanoic acid						X	
Allyltriphenylsilane					X	X	
Aluminum trifluoroacetylacetonate			X			X	
Amine			X				
Aminoadipic acid						X	
DIDEHYDRO-3-OXOTABERSONINE						X	Alcaloïdes
Dimethyl-4-phenylpyridine	X						Alcaloïdes
Anthiaergostan			X			X	
anthracene			X				
Dimethyl-4-quinolone			X				Alcaloïdes
Diphenyl-2-azafluorene			X		X	X	Alcaloïdes
Arabinofuranose			X				Sucres
azabicyclo						X	
Diphenyl-3-carboethoxy-4-pyridone					X		Alcaloïdes
Benz[a]anthracene			X				
benzanilide			X				amides aromatiqes
Benzenamine			X	X	X	X	amines aromatiques
Benzeneacetic acid	X		X	X	X	X	acides aromatiques
Benzeneacetonitrile			X		X		
Benzenebutanal						X	
Benzeneethanol			X				
Benzenepropanoic acid						X	acides aromatiques
diphenylpyrimidine				X			Alcaloïdes
benzodioxane						X	
Benzofuran				X			
Benzoic acid	X		X	X	X	X	acides aromatiques

Benzonitrile					X		amides aromatiqes
Ephedrine					X		Alcaloïdes
Benzopyran-2-one			X				
Etoxeridine= carbelidine				X	X	X	Alcaloïdes
benzothiadiazine					X		
benzoxazin-2-yl			X	X	X		
Benzylidenehydantoin				X			
Benzylimino						X	
Beryllium			X			X	minéral
Bicyclopentyl					X		
biphenyldiamine						X	
Biphenylol					X		
Biphenylylenephosphoric acid			X				
Histamine				X			Alcaloïdes
bisbenzofuran				X		X	
Bismuthine				X			
Bitriazolyl				X			
Buckminsterfullerene			X				
Butanediamine			X				
Butanedioic acid	X	X	X	X	X	X	
Butanoic acid	X	X	X	X	X	X	
Butenedioic acid			X		X		
Butenoic acid			X				
Cadaverine					X	X	Amides
Caprolactone oxime						X	
Hydroxygelsedine						X	Alcaloïdes
Hygrine					X		Alcaloïdes
idazolidine			X				Alcaloïdes
carbonitrile					X		
Carbostyril			X				
carboxylic acid			X				
Chloro-3-methylthio-but-2-ene			X				
Imidazol-2-amine	X		X		X		Alcaloïdes
Indole						X	Alcaloïdes

Indole-2,3-dione						X	Alcaloïdes
Indole-3-acetamide			X				Alcaloïdes
Indole-3-butanoic acid						X	Alcaloïdes
indolepropionate			X		X		Alcaloïdes
Isopropyl-4-ethyl-5-methylthiazole				X			Alcaloïdes
Cobalt			X	X	X	X	minéral
Cobaltocene			X		X		composés organominéral
Cyclohexanedione		X					
Cyclohexanol						X	
Cyclohexasiloxane					X		
Cyclohexene			X		X	X	
Cyclopentadienylrhodiumbis				X			
Cyclotetracosene			X				
cysteine			X				Acides aminés
D-Arabino-Hexonic acid					X		
d-arabino-hexosulose					X		Sucres
isoquinoline			X	X	X	X	Alcaloïdes
Decanoic acid				X			Acides organiques
Deltacyclene					X		
demethylvincadifformine					X		
D-Fructose			X	X	X	X	Sucres
D-Galactopyranose						X	Sucres
D-Galactose		X	X			X	Sucres
D-Glucitol		X			X		Sucres
D-glucofuranose		X				X	Sucres
D-glucofuranurono-6,3-lactone						X	Sucres
D-Gluconic acid			X		X	X	Acides organiques
D-Glucopyranoside			X	X	X	X	Sucres
D-Glucopyranuronic acid		X	X		X	X	Sucres
d-Glucose		X	X			X	Sucres
D-Glucuronic acid	X					X	Acides organiques
Monocrotaline	X				X	X	Alcaloïdes
diamine						X	Amines
dianiline					X		amines aromatiques
Diazacyclopentadecan				X			

diazapentane			X			X	
Dibenzo[fg,ij]pentaphene)						X	
Dibenzo-p-dioxin			X				
nicotinohydrazide						X	alcaloïdes
Norcrotalanan	X					X	alcaloïdes
diindeno			X				
Dimethoxymethyl-hydroxy-triphenyl phosphide			X				
oxadiazole		X	X		X	X	Alcaloïdes
oxazaphosphinine 2-oxide						X	Alcaloïdes
dimethyl-amine			X				
Dimethylhexaethyloctasilsesquioxane				X			
dioctadecyl-ethane-1,2-diamine					X		
Dioxa-2,7-disilaoctane			X				
Dioxa-2,9-disiladecane	X						
dioxaoctane					X		
Dioxolane	X						
Dioxolane, 2-phenyl			X				
Dioxolane-4,5-dione			X				
Dipentyl-heptabarbital			X		X	X	
oxazole	X	X			X		Alcaloïdes
phenaine					X		Alcaloïdes
diphenylphosphino			X				
Phenmethylamine						X	Alcaloïdes
dipyran-6-ol						X	
disiladecane					X		
Disiloxane	X	X	X	X			
DL-Proline					X		Acides aminés
D-Mannitol	X		X			X	Sucres
d-mannofuranuronic acid			X				a compléter
Docosane	X	X	X	X	X	X	alcanes linéaires
Dodecane	X	X		X	X		alcanes linéaires
Dotriacontane				X		X	alcanes linéaires
d-Ribose			X				Sucres
D-xylohexaose			X				Sucres

Eicosane						X	alcanes linéaires
Phentermine					X	X	Alcaloïdes
ethanamine						X	amines
Ethanedioic acid		X	X	X	X	X	Acides organiques
Ethanediylidene						X	
Ethyl-3-trifluoromethyl benzoate					X		
Ethylenebis			X				
Ethylhexanoic acid				X			
phenylaminocyclopentane				X			Alcaloïdes
Ferrocene			X			X	composés organominéral
fluoranthene				X			
fluorene			X		X		composés aromatiques
Friedooleanan-1-one						X	
Furan						X	
Furanone						X	
Galactaric acid		X					
Galactitol	X	X	X		X	X	Sucres
Galactonic acid			X				acides organiques
Galactose			X		X		Sucres
Glucopyranose					X	X	Sucres
Glucosamine				X			amine glycosilée
Glucose	X		X				Sucres
Glutamine	X					X	Acides aminés
Glycine				X	X	X	Acides aminés
Heneicosane					X	X	alcanes linéaires
Hentriacontane			X				alcanes linéaires
hept-5-ene					X		
Hexacosane	X						alcanes linéaires
Hexadecanoic acid			X	X	X		Acides organiques
Hexanoic acid			X	X	X	X	Acides organiques
Phthalazinone					X		Alcaloïdes
Hydrazine			X				
hydrazone						X	
Phthalocyanine manganese						X	Alcaloïdes
Hydroxycyclohexane-1-carboxylic acid	X				X		

piperazine						X	Alcaloïdes
hydroxyglutaric acid	X						
hydroxylamine			X				
hydroxyproline						X	acides aminés non protéiques
piperidin			X	X	X	X	Alcaloïdes
Piperidinecarboxylic acid		X		X			Alcaloïdes
Idonic acid			X				
Imidazol-1-yl			X				
Pseudoephedrine						X	Alcaloïdes
Indane			X				composés aromatiques
Indene				X	X		composés aromatiques
pyrazine					X		Alcaloïdes
pyrazol			X				Alcaloïdes
Pyrazole-4-carbonitrile			X			X	Alcaloïdes
Pyrazolidinedione			X				Alcaloïdes
pyrazoline						X	Alcaloïdes
Inositol	X	X	X		X	X	Cyclitols
Iridium						X	Minéral
Iridium					X		Minéral
Iron			X	X			
pyridin			X		X	X	Alcaloïdes
Pyridine-3-carbonitrile			X				Alcaloïdes
Pyrimidine		X	X		X	X	Alcaloïdes
L-Alanine						X	Acides aminés
L-Asparagine						X	Acides aminés
L-Glutamic acid	X						Acides aminés
L-Proline					X	X	Acides aminés
L-Valine						X	Acides aminés
Malic acid			X			X	Acides organiques
malonate			X	X	X		Acides organiques
malononitrile					X		amides
Maltose			X			X	Sucres
Manganese					X		Minéral
Mannonic acid			X				Acides organiques
Mercury					X	X	Minéral

Mesitylene		X	X				composés aromatiques
Methanamine					X		amines
Methanesulfinamide			X		X		amines
Methanone			X		X	X	
Methoxyphenylpyruvic acid	X		X	X			composés aromatiques
methyl-amine			X				
Methylcitric acid	X		X		X	X	Acides organiques
methylcrotonate						X	Acides organiques
Pyrimidinone			X		X	X	Alcaloïdes
Pyrrole-2,5-dione					X		Alcaloïdes
Myo-Inositol	X		X		X	X	Cyclitols
Pyrrole-2-carboxylic acid					X		Alcaloïdes
Naphth					X	X	
Naphthacenedione					X		
naphthalen			X				composés aromatiques
pyrrolidine						X	Alcaloïdes
naphtho			X	X	X	X	
n-Butylamine			X	X			amines
pyrrolidinyl			X			X	Alcaloïdes
nitrosohept-2-en-4-one			X				
N-Naphtho						X	
Nonadecane	X	X	X	X	X	X	alcanes linéaires
nonadecasphingadienine						X	cérébrosides = sucres
Nonanol			X				
norbornylacetylene						X	
Norcaren-2-one					X	X	
pyrroline						X	Alcaloïdes
Octacosane	X	X		X	X	X	alcanes linéaires
Octadecane	X	X					alcanes linéaires
Octadecanedioic acid			X				Acides organiques
octafluoro					X		
Quinazolin			X		X		Alcaloïdes
Octodrine			X				amines
O-Glycerol			X		X		Sucres
quinazolinone					X	X	Alcaloïdes
quinolin					X		Alcaloïdes

oxathiolane-2-acetic acid					X		
quinolin-4-one						X	Alcaloïdes
quinoline			X			X	Alcaloïdes
Penicillamine					X	X	
pentacene			X				composés aromatiques
Pentacosane			X				alcanes linéaires
Pentadecane	X	X	X	X	X	X	alcanes linéaires
Pentane					X		alcanes linéaires
Pentanedioic acid	X		X		X		Acides organiques
Pentanoic acid					X	X	Acides organiques
Pentasiloxane	X		X	X	X	X	Siloxane
quinolinone						X	Alcaloïdes
phenanthrene methanol			X				composés aromatiques
quinoxaline			X			X	Alcaloïdes
Phenoxaphosphine						X	composés aromatiques
Rhodanine			X				Alcaloïdes
Roehybrine					X		Alcaloïdes
phenylpropane						X	composés aromatiques
Phosphenodiimidic amide			X				
Phosphinous amide					X		
Phosphorimidic trichloride						X	
Phosphorodifluoridothioic hydrazide						X	
Secostrychnidine						X	Alcaloïdes
t-Butyl-4-quinoline carboxylic acid			X				Alcaloïdes
tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid						X	Alcaloïdes
tetrazole						X	Alcaloïdes
theophylline					X		Alcaloïdes
Piperonylonitrile						X	composés aromatiques
platinum			X				Minéral
Thiodipyridine				X			Alcaloïdes
Praseodymium			X				Minéral
Probenecid						X	acides aromatiques
Propanamide			X		X	X	Amines
Propanediamide				X			Amines

Propanedioic acid	X	X			X	X	Acides organiques
Propanetricarboxylic acid	X	X	X	X	X	X	Acides organiques
Propanetriol				X	X	X	alcools organiques
Propanoic acid	X	X	X		X	X	Acides organiques
Propanol			X	X	X		alcools organiques
Propenoic acid			X				Acides organiques
Propionamide						X	amines
triazin-2-yl			X				Alcaloïdes
Pteridinone				X			
p-tosylamino						X	
Pyran-2,6-dicarboxylic acid			X				acides aromatiques
pyran-6-one			X		X		
Triazine					X	X	Alcaloïdes
triazine-2,4-diamine			X				Alcaloïdes
Triazol-4-amine						X	Alcaloïdes
triazole	X		X			X	Alcaloïdes
triazoline						X	Alcaloïdes
Pyrene					X	X	composés aromatiques
2,4-Dimethoxyphenylpyruvic acid						X	composés phénoliques
2,6-Diiodohydroquinone						X	composés phénoliques
3,5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavone						X	Composés phénoliques
3-Methoxyphenylpyruvic acid						X	Composés phénoliques
Pyrido			X				
3-methoxytyrosine						X	Composés phénoliques
Anthraquinone			X				Composés phénoliques
APIGENIN-8-C-GLUCOSIDE		X	X		X	X	Composés phénoliques
Bambuterol						X	Composés phénoliques
benzopyran					X		Composés phénoliques
Benzopyran-4-one						X	Composés phénoliques
Chromone						X	Composés phénoliques
cinnamate					X		Composés phénoliques
Cinnamic acid			X	X	X		Composés phénoliques
decahydroquinol					X		Composés phénoliques
Dihydroxy-4',7-dimethoxyflavone			X				Composés phénoliques

Hydrocinnamic acid						X	composés phénoliques
Kaempferol-3-O-robinobioside-7-O-rhamnoside					X		Composés phénoliques
Methyltyrosine			X		X	X	Composés phénoliques
N-Acetyltyrosine						X	Composés phénoliques
Ribitol	X		X		X	X	Sucres
Ribo-5-Hexulosonic acid			X				
Ribonic acid	X		X		X	X	Acides organiques
Naphthalene-2,6-dicarboxylic acid					X		Composés phénoliques
Octahydroxanthen-1,9-dione			X		X	X	Composés phénoliques
Sorbic acid	X						Acides organiques
succinate						X	Acides organiques
Sulfuryl chloride fluoride					X		
Sydnone				X			
Tartaric acid						X	acides organiques
o-Hydroxynaphthylidene						X	Composés phénoliques
Tetraazaphenalene					X		
Tetraazatricyclo					X		
Tetrabutylphosphonium bromide					X		
tetracarboxylic acid			X				Acides organiques
Tetradecanoic acid						X	Acides organiques
Tetrahydrofuran					X		
Podocarpa						X	Composés phénoliques
Tetrahydropurin		X					
tetramethylbenzene				X			composés aromatiques
Tetramethyltetrathiafulvalene						X	
Tetratetracontane		X					alcanes linéaires
pyridazin-3-one					X		Composés phénoliques
Pyridazine						X	Composés phénoliques
thiadiazole						X	
thiazolidine			X				
Thiazolidine-4-carboxylic acid			X				
Thietane					X		
Tocopherol			X	X		X	composés phénoliques
Thionaphthene					X		

Thiophene-2-carboxylic acid			X				
Threitol						X	
threonine						X	Acides aminés
Trihydroxy-6-methylanthraquinone						X	composés phénoliques
9,19-Cyclocholest-24-en-3-ol						X	Stéroïdes
Androstan-17-one						X	Stéroïdes
Aniline			X				Stéroïdes
Cholest-2-ene			X		X	X	Stéroïdes
Cholestan-3-one			X				Stéroïdes
Cholestan-6-one			X	X	X	X	Stéroïdes
tributylsilyloxyethane			X				
Triethylamine					X	X	amines
trifluoroacetamide						X	composés organominéral
Trifluorobenzonitrile			X				
Trihydroxybutyric acid	X		X				acides organiques
Trimethyl-3-hydroxyglutaric acid					X		
Trimethyl-3-hydroxyglutaric acid			X				
Trimethylsiloxyphenyl-2'-trimethylsiloxyphenylsulfone			X				
trinitrofluorene			X				
Triphenyl propargyltin						X	composés aromatiques
Trisiloxane				X			
undecane			X			X	alcanes linéaires
urea	X				X		Carbamide
Xylitol				X			Sucres
Xylulose	X		X		X	X	Sucres
ylamine			X				

ANNEXE 3

Effect of phytoparasitic nematodes on the biochemical composition of root exudates of *Crotalaria spp*. and their allelopathic efficiency

L'Etang Mylène[1], Lucienne Desfontaines[1], Patrick Quénéhervé[2], Amadou Bâ[3], Chantal Fléreau[1], Harry Ozier-Lafontaine[1*]

[1]Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherche 1321, ASTRO Agrosystèmes tropicaux, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe

[2]Institut de Recherche pour le Développement, Unité Mixte de Recherche 186 Résistance des plantes aux bioagresseurs, Pôle de Recherche Agroenvironnementale de la Martinique, BP 214, 97232 Le Lamentin Cedex, Martinique

[3]UFR Sciences exactes et naturelles Université Antilles-Guyane Campus Fouillole, BP. 592- 97159, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

mylene.letang@gmail.com
lucienne@antilles.inra.fr
patrick.queneherve@ird.fr
amadou.ba@ird.fr
cflereau@antilles.inra.fr
*corresponding author : harry.ozier-lafontaine@antilles.inra.fr
INRA, UR1321, ASTRO, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe
Tel : 0590590255916

Abstract

- *Aims* The aim of this study was i) to evaluate the effect of nematodes on the biochemical profiles of root exudates from *Crotalaria spectabilis, Crotalaria retusa* and banana plant (*Musa* spp.), ii) to test the ability of the conditioned root exudates to control plant-feeding nematodes.
- *Methods* i) Root exudates extraction by an appropriate hydroponic device; ii) measurement, by visible spectrophotometry, of total three major families compounds (alkaloids, polyphenols, and steroids) and total three sub-families compound (flavonols, condensed tannins, alkaloids pyrrolizidine); iii) achieving biostests with the root exudates of the three species.
- *Results* In the presence of *Meloidogyne arenaria*, the amount of compounds of the threemajoor families and sub-families was modified for the two crotalarias. For the banana, only the total alkaloids varied significantly, the concentrations of the other compounds measured being unaffected by the presence of this nematode. In the presence of *Radopholus similis* the biochemical profiles of the root exudates of *C. retusa* were also significantly altered, particularly for the sub-families of the compounds measured. The biotests done on the root exudates collected in the presence and absence of the two nematodes showed a nematostatic effect towards them.

- *Conclusions* This study is a step to set strict conditions for the establishment of the host status of plants species vis-a-vis nematodes. It is also a step in the understanding of processes involved in the control of biochemical profiles of root exudates of antagonistic plants and should help to better define the best environmental conditions for successful Integrated Pest Management.

Keywords- Allelopathy, biotests, crotalaria, nematodes, root exudates, visible spectrophotometry.