

Bioactivité de l'huile essentielle des feuilles de l'*Ageratum houstonianum* Mill sur les tiques (*Rhipicephalus appendiculatus*) de la chèvre naine de Guinée dans l'ouest Cameroun

E. Tedonkeng Pamo¹, L. Tapondjou², G. Tenekeu² & F. Tendonkeng²

Keywords: *Rhipicephalus appendiculatus*– *Ageratum houstonianum*– Essential oil– leaves– LD₅₀

Résumé

L'effet de l'huile essentielle des feuilles de l'*Ageratum houstonianum* sur *Rhipicephalus appendiculatus* a été testé au Laboratoire de Chimie Appliquée et Environnementale de l'Université de Dschang dans l'Ouest-Cameroun. Cinq doses d'huile essentielle (0,00; 0,016; 0,031; 0,062 et 0,125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) en quatre répétitions ont été utilisées. Chaque répétition était constituée de dix tiques dans une boîte de Pétri tapissée de papier filtre et uniformément imprégné du produit. Des résultats de cet essai, il apparaît que l'huile essentielle des feuilles de *A. houstonianum* est toxique pour les tiques *R. appendiculatus*. La mortalité maximale observée dans le lot témoin était de 10% au moment où la plus faible dose (0,016 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) d'huile essentielle des feuilles de *A. houstonianum* avait exterminé sa population après huit jours d'exposition. La DL₅₀ de l'huile essentielle des feuilles était de 0,02949 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ le deuxième jour, d'exposition ce qui laisse entrevoir l'efficacité de ce produit sur ce parasite.

Summary

Bioactivity of the Essential Oil of the Leaves of *Ageratum houstonianum* Mill on Guinean Dwarf Goat's Ticks (*Rhipicephalus appendiculatus*) in Western Cameroon

The test of the essential oil of the leaves of *Ageratum houstonianum* on *Rhipicephalus appendiculatus* was carried out in the Laboratory of Applied and Environmental Chemistry of the University of Dschang in West Cameroon. Five doses of the essential oil (0.00; 0.016; 0.031; 0.062 and 0.125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) in four replicates were used. Each replicate was made up of ten ticks in the Petri dish with filter paper on the bottom and uniformly impregnated with the product. The results of this study indicate that essential oil of the leaves are toxic to *R. appendiculatus* ticks. The highest mortality in the control group was 10% when the lowest dose (0.016 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) of essential oil of the leaves of *A. houstonianum* had exterminated the ticks after eight days of exposure. The LD₅₀ of the essential oil of the leaves was 0.02949 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ at the end of the second day indicating a potentially high efficiency of this product on this parasite.

Introduction

L'élevage des ruminants constitue l'une des principales activités de production dans de nombreuses régions d'Afrique en général et du Cameroun en particulier. Malheureusement, sur les parcours naturels d'où ils tirent l'essentiel de leur alimentation, ces animaux sont soumis à de nombreuses contraintes, parmi lesquelles les problèmes d'ordre sanitaires qui affectent la croissance et nécessitent des mesures de prévention (9) ou de traitement. Parmi ces maladies, les infestations par des parasites, qui trouvent sous les tropiques des conditions favorables à leur développement (12) ne sont pas des moindres. Les parasites externes dont les arthropodes et notamment les acariens renferment les tiques qui outre leur rôle anémiant par prélèvement de sang, transmettent de nombreuses maladies dont le diagnostic est difficile (7).

La méthode la plus utilisée pour le contrôle des tiques dans les systèmes de production intensifs est l'application des acaricides. Par contre, chez les petits éleveurs, le détiquage manuel ou l'utilisation des plantes médicinales locales semble plus généralisée. Certaines tiques ont développé des résistances à tous les acaricides utilisés (2, 6, 12, 13).

De nombreuses plantes contiennent dans leurs écorces, dans leurs fruits, leurs racines et leurs feuilles, des substances à propriétés thérapeutiques: tannins, alcaloïdes, etc. (9). Les huiles essentielles sont douées de toute une gamme d'activités biologiques. Elles sont cicatrisantes, antiseptiques, anti-inflammatoires, antipyrétiques, antispasmodiques, insecticides, bactéricides, fongicides, etc... (8). La phytothérapie ou le soin par les plantes est une forme

¹- Université de Dschang, F.A.S.A, Département des Productions Animales, B.P. 222 Dschang, Cameroun.

²- Université de Dschang, Faculté des Sciences, Département de Biologie Animale, B.P. 67 Dschang, Cameroun.

Reçu le 11.07.00. et accepté pour publication le 29.05.02.

de thérapie très peu coûteuse et de nombreuses préparations ont fait preuve d'une remarquable efficacité (9). C'est au vu de tout cela qu'un programme de recherche sur les plantes locales ayant des effets acaricides a été entrepris à l'Université de Dschang.

L'objectif essentiel de ce travail est de tester l'effet de l'huile essentielle des feuilles de l'*Ageratum houstonianum* dont l'efficacité pour le contrôle des parasites des denrées alimentaires avait déjà été démontrée sur *Rhipicephalus appendiculatus*, ectoparasite des petits ruminants, à Dschang dans l'ouest-Cameroun.

Matériel et méthodes

Récolte des feuilles et extraction de l'huile essentielle.

- Matériel végétal

Les feuilles de *A. houstonianum* étaient récoltées en mars 1999 dans le campus de l'Université de Dschang et ses environs. Elles étaient ramenées au Laboratoire de Chimie Appliquée et Environnementale (LCAE), où l'extraction avait lieu.

- Extraction et caractérisation chimique de l'huile essentielle

L'extraction de huile essentielle a débutée par l'introduction des feuilles hachées de *A. houstonianum* dans un ballon de 2 litres dans lequel a été ajouté de l'eau distillée. L'hydrodistillation s'est faite pendant 10 heures environ avec un appareil de type Clevenger modifié. L'huile essentielle collectée a été déshydratée par du sulfate de sodium anhydre et le produit obtenu de couleur jaune-pâle, d'odeur forte et persistante était conservé à température ambiante à l'abri de la lumière.

L'analyse chimique en vue d'identifier les principaux constituants de cette huile s'est faite par GC-MS à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse HP 5890 II couplé à un spectrophotomètre de masse sélectif HP 5972 utilisant une colonne capillaire de type DBwax (60 m x 0,25 mm). Le four était programmé à une température variant entre 60 et 220 °C, à une vitesse de 5 °C/mn et utilisant l'hélium comme gaz vecteur. La vitesse d'écoulement était de 0,9 ml/mn; la température d'injection de 230 °C et celle de l'interphase de 240 °C.

Les différents constituants volatils ont été identifiés à partir de leur spectre de masse et/ou de leur indice de rétention en comparaison avec les données standard de référence de la banque des données de l'Institut für Getreide Verarbeitung GmbH de Berlin en Allemagne où la caractérisation a été effectuée. La quantification de chaque composé a été effectuée par intégration de son pic sur le spectre du chromatographe en phase gazeuse.

Matériel animal

- Récolte des tiques et leur conditionnement

Les tiques du genre *R. appendiculatus* mâles et femelles, couramment rencontrées sur les ruminants

dans les Hautes Terres de l'ouest-Cameroun, ont été récoltées sans briser leur rostre sur les chèvres de la Ferme d'Application et de Recherche (FAR) et dans les différents quartiers de la ville et les villages environnants. Les tiques utilisées avaient une taille moyenne de 4,09 mm dans un état de réplétion faible à nul.

- Identification de la tique

Pour l'identification des tiques, les spécimens récoltés sur les chèvres ont été fixés à l'acétate d'éthyle et identifiés à la loupe. Les clés de détermination de genres d'ixodides proposés par Cable (4) et Fain (5) pour identifier les tiques du genre *Rhipicephalus* et de l'espèce *appendiculatus* ont été utilisées.

Tests biologiques

- Préparation des doses d'huile essentielle

Après plusieurs tests préliminaires, quatre doses d'huile essentielle ont été utilisées et préparées en diluant chaque fois dans 1ml de solvant (acétone) les volumes successifs de 1, 2, 4, et 8 µl de produit. Chaque dose était uniformément répandue à l'aide d'une micropipette sur une rondelle de papier filtre de type Whatman N° 1 de 9 cm de diamètre (63,62 cm²). Après évaporation complète du solvant (temps nécessaire: 20 mn) on obtenait les doses respectives de 0,016; 0,031; 0,062 et 0,125 µl/cm² sur chaque papier filtre. Un cinquième lot était imprégné de solvant, et servait de témoin.

- Tests

Les tests ont consisté en l'évaluation de la toxicité par contact de l'huile essentielle par les tiques, en laboratoire à une température moyenne de 24 °C et une humidité relative de 70%. Chaque traitement (dose) comportait 4 répétitions et chaque répétition était constituée de 10 tiques non sexées choisies au hasard et introduites dans une boîte de pétri. Les comptages des tiques mortes se faisaient toutes les 24 heures pendant 8 jours. Le pourcentage de mortalité dans chaque boîte était calculé en utilisant la formule d'Abbott (1):

$$M_c = \frac{M_0 - M_t}{100 - M_t} \times 100$$

où: M_c = taux de mortalité corrigé;

M_0 = taux de mortalité dans les boîtes traitées;

M_t = taux de mortalité dans les boîtes témoins (mortalité naturelle).

Analyse des données

Les données obtenues ont été soumises à l'analyse de variance (10) après correction des mortalités observées par rapport à celles des témoins et, les différences entre les traitements quand elles existaient, étaient séparées par le test de la plus petite différence significative. La régression du logarithme de la dose en fonction des probits a permis de déterminer la DL₅₀.

Résultats et discussion

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *A. houstonianum* était de 0,2%. Le tableau 1 présente les principaux constituants chimiques de cette huile. De ce tableau, il ressort que cette huile est

Tableau 1
Principaux constituants chimiques de l'huile essentielle des feuilles de *Ageratum houstonianum*

Nom du composé	Teneur (%)
Isocaryophyllen	0,76
β -caryophyllen	19,41
α -caryophyllen (Humulén)	1,01
Germacren D	0,91
β -sesquiphellandren	1,32
Demethoxy ageratochromen (précocène I)	73,38
Ageratochromen (précocène II)	1,20

particulièrement riche en précocène I (73,38%) suivi par le β -caryophyllen (19,41%). Le précocène II ne représente que 1,20%. Le tableau 2 présente les pourcentages des mortalités cumulées corrigées par rapport au témoin chez *R. appendiculatus* avec leurs écart-types aux différentes doses (en $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) de l'huile essentielle des feuilles de *A. houstonianum* au cours du temps.

Du tableau 2, il ressort que le pourcentage de mortalités cumulées croît avec la dose de l'huile essentielle des feuilles dans le temps pour atteindre la mortalité maximale (100%) des tiques dans les lots traités le sixième jour pour ce qui est de la plus forte dose

mortalité observée avec la dose la plus faible. La mortalité dans les deux autres doses (0,031 et 0,062 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) n'était pas significativement différente de la mortalité causée par la plus forte dose. Le deuxième jour, la même tendance a été observée.

Le troisième jour, les deux doses les plus élevées (0,062 et 0,125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) ont causé significativement ($p > 0,05$) plus de mortalités, suivies des deux autres doses les plus faibles (0,016 et 0,031 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$).

La mortalité due à la dose témoin était toujours la plus faible ($2,5 \pm 5,0$) et significativement différente de celle des lots traités à l'huile essentielle des feuilles de *A. houstonianum* le quatrième jour. Le même résultat a été observé le cinquième jour.

Le sixième jour, les résultats observés du lot témoin étaient significativement différents de ceux du lot traité avec la dose 0,016 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ et les mortalités de cette dernière étaient significativement ($p > 0,05$) différentes de celles des autres doses, qui n'étaient pas significativement différentes entre elles. Il en était de même le septième jour, et enfin le huitième jour seuls les résultats du témoin ($10,0 \pm 8,2$) étaient significativement ($p > 0,05$) différents de ceux des lots traités à l'huile essentielle des feuilles de *A. houstonianum*, qui avaient exterminé le reste de leurs populations de *R. appendiculatus*.

L'ajustement des pourcentages de mortalités cumulées moyennes en fonction des doses de l'huile essentielle des feuilles au cours du temps (Tableau 3) a permis d'obtenir l'équation de régression suivante:

$$Y = 170,27X + 65,009 \quad (R^2 = 0,73)$$

Tableau 2
Effet de l'huile essentielle des feuilles de *Ageratum houstonianum* sur *Rhipicephalus appendiculatus*

Durée d'exposition (en jours)	Doses ($\mu\text{l}/\text{cm}^2$)				
	Témoin	0,016	0,031	0,062	0,125
1	0,0 \pm 0,0 ^c	20,0 \pm 8,2 ^b	27,5 \pm 9,6 ^{ab}	30,0 \pm 8,2 ^{ab}	35,0 \pm 5,77 ^a
2	0,0 \pm 0,0 ^c	40,0 \pm 8,2 ^b	55,0 \pm 5,8 ^a	57,5 \pm 9,6 ^a	67,5 \pm 12,58 ^a
3	0,0 \pm 0,0 ^c	55,0 \pm 5,8 ^b	62,5 \pm 5,0 ^b	72,5 \pm 5,0 ^a	80,0 \pm 8,16 ^a
4	2,5 \pm 5,0 ^d	56,4 \pm 5,1 ^c	66,6 \pm 5,1 ^b	82,0 \pm 5,1 ^a	89,7 \pm 8,37 ^a
5	7,5 \pm 5,0 ^d	62,2 \pm 6,2 ^c	86,5 \pm 5,4 ^b	94,6 \pm 6,2 ^a	97,3 \pm 5,55 ^a
6	10,0 \pm 8,2 ^c	69,5 \pm 10,6 ^b	97,2 \pm 5,5 ^a	100,0 \pm 0,0 ^a	100,0 \pm 0,00 ^a
7	10,0 \pm 8,2 ^c	91,7 \pm 5,6 ^b	100,0 \pm 0,0 ^a	100,0 \pm 0,0 ^a	100,0 \pm 0,00 ^a
8	10,0 \pm 8,2 ^b	100,0 \pm 0,0 ^a	100,0 \pm 0,0 ^a	100,0 \pm 0,0 ^a	100,0 \pm 0,00 ^a

abc: les pourcentages de mortalité (Mc \pm e.t) dans chaque ligne suivis d'une même lettre ne sont pas significativement ($p > 0,05$) différents. Mc= Mortalité corrigée.

(0,125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), et le huitième jour avec la plus faible dose (0,016 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). La mortalité maximale dans le lot témoin n'était que de 10% au moment où on observait 100% de mortalité avec la plus faible dose. L'huile essentielle des feuilles de *A. houstonianum* est donc toxique pour *R. appendiculatus*.

Les résultats de l'analyse de variance des données de mortalité journalière cumulées en fonction de la dose (Tableau 2) ont permis d'observer des différences significatives ($p > 0,05$) entre les traitements. A la fin du premier jour, la mortalité observée dans le lot témoin était significativement ($p > 0,05$) différente de la

Tableau 3
Pourcentages de mortalités cumulées moyennes de *Rhipicephalus appendiculatus* en fonction des doses d'huile essentielle des feuilles de *Ageratum houstonianum*

Doses ($\mu\text{l}/\text{cm}^2$)	Mortalités cumulées moyennes	Ecart-type
0,016	61,85	\pm 25,38
0,031	74,42	\pm 25,23
0,062	79,58	\pm 24,53
0,125	84,03	\pm 22,70

Cet ajustement a permis d'obtenir des résultats relativement intéressants comme le montre le coefficient de détermination R^2 associé à la droite qui indique que 73% de la variation de l'effet du traitement peut être expliqué par la droite de régression. Il apparaît ainsi que la grande partie des mortalités cumulées n'est due qu'aux effets des différentes doses.

La transformation des pourcentages de mortalités après le deuxième jour d'exposition en probit nous permettait de rester dans l'intervalle des doses appliquées et a permis d'obtenir les données du tableau 4. La régression de ces données en fonction du logarithme de la dose a permis d'obtenir l'équation suivante:

$$Y = 0,7312X + 6,1189 \quad (R^2 = 0,93)$$

Tableau 4

Logarithme des doses d'huile essentielle des feuilles de *Ageratum houstonianum* et les probits de pourcentages de mortalité de *Rhipicephalus appendiculatus* après deux jours d'exposition

Doses	Log (dose)	Mortalité (%)	Probit (Y)
0,016	-1,796	40,0	4,7467
0,031	-1,509	55,0	5,1257
0,062	-1,208	57,5	5,1891
0,125	-0,903	67,5	5,4538

Cette régression a également permis d'obtenir des résultats très intéressants comme le montre son coefficient de détermination. La DL_{50} déterminée à partir de cette équation était de 0,02949 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$.

D'après l'analyse chimique (Tableau 1) le précocène I est le constituant le plus important de cette huile essentielle. La toxicité de cette huile essentielle à

l'égard de *R. appendiculatus* pourrait être attribuée à ce composé donc l'activité antijuvenile a été démontrée contre les insectes (3, 11). En effet, d'après Bowers *et al.* (3), lorsque les insectes sont en contact avec les précocènes, ils induisent chez les adultes la stérilité et chez les insectes immatures une métamorphose précoce conduisant aux adultes prématurés qui meurent immédiatement. Il est probable qu'il agit de la même manière sur les tiques. Ceci s'opérerait par une activation de ce précocène grâce au métabolisme de l'insecte et aboutirait à la production d'époxyde qui réagirait avec les protéines du «corpora allata» et le détruirait. Les précocènes sont des substances chimiques hautement sélectives qui s'attaquent aux aspects spécifiques du système endocrinien de l'insecte provoquant non seulement un effet toxique mais aussi des désordres dans le processus de développement et de reproduction.

Conclusion

De ce travail, il apparaît que l'huile essentielle des feuilles de *A. houstonianum* a un effet toxique sur les tiques du genre *Rhipicephalus*. Le pourcentage des mortalités cumulées observé avec l'huile essentielle des feuilles de cette plante croît avec la dose. La DL_{50} observée était de 0,02949 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ au 2^{ème} jour de l'esai.

Les essais en milieu réel restent à effectuer pour évaluer l'efficacité pratique du produit. Car, les composés de l'huile étant volatils, il est possible qu'appliqués sur la chèvre, ils puissent disparaître avant d'agir sur les tiques. L'adaptation des techniques d'extraction et du mode de conditionnement au contexte villageois est fondamentale pour rendre le produit accessible aux plus démunis que sont les petits éleveurs. Il en est de même des tests de l'activité de l'huile sur les autres tiques si l'on veut généraliser l'utilisation de ce produit car on observe en fonction des espèces une grande variation de sensibilité aux acaricides.

Références bibliographiques

- Abbott W.S., 1925, A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* Vol. 18, pp. 265-267.
- Barnett S.F., 1961, The Control of ticks on livestock. *FAO Agricultural studies*, n° 54, pp. 1-106.
- Bowers W.S., Ohta T., Cleere J.S. & Marsella P.A., 1976, Discovery of insect anti-juvenile hormone in plant. *Science*, 193, 542-547.
- Cable R.M., 1977, An illustrated Laboratory Manual of parasitology, 5th ed., Burgess Publishing compagny. pp. 211-214.
- Fain D.A., 1975, Entomologie médicale avec compléments vétérinaires. Institut de médecine tropicale, Prince Leopold. 115p.
- Hall H.T.B., 1983, Diseases and parasites of livestock in the tropics, 2nd ed. Longman Scientific & technical Intermediate Tropical agriculture series, 328p.
- IEMVT., 1989, Elevage des moutons en zone tropicale humide. Laballery-Clamecy. 207p.
- Kuiate J.R., 1993, Détermination des teneurs, des propriétés chimiques et des activités antimicrobiens des huiles essentielles de quelques Astéracées utilisées en médecine traditionnelle au Cameroun. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle, Université de Yaoundé I, 217p.
- Lhoste P., Dolle V., Rousseau J. & Soltner D., 1993, Manuel de zootechnie des régions chaudes. Les systèmes d'élevage; Collection précis d'élevage, Ministère de la coopération, pp. 18-218.
- Mc Clave J.T., Dietrich II, F.H. 1979, Statistics. Dellen Publishing Compagny, San Francisco, California, 681p.
- Hta T., Kuhr R.J. & Bowers W.S., 1977, Radiosynthesis and metabolism of the insect anti-juvenile hormone, Précocène II. *J. Agric. Food. Chem.* 25, 478-481.
- Ukoli F.M.A., 1984, Introduction to parasitology in tropical Africa. John Wiley and sons LTD, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 464p.
- Wharton R.H., 1976, Les maladies du bétail transmises par les tiques et leurs vecteurs. Résistance aux acaricides. *Revue Mondiale de Zootechnie, FAO*, 20, pp. 8-15.

E. Tedonkeng Pamo, Camerounais, Université de Dschang, F.A.S.A, Département des Productions Animales, B.P.222 Dschang, Cameroun.

L. Tapondjou, Camerounais, Université de Dschang, Faculté des Sciences, Département de Biologie Animale, B.P. 67 Dschang, Cameroun.

G. Tenekeu, Camerounais, Université de Dschang, Faculté des Sciences, Département de Biologie Animale, B.P. 67 Dschang, Cameroun.

F. Tendonkeng, Camerounais, Université de Dschang, Faculté des Sciences, Département de Biologie Animale, B.P. 67 Dschang, Cameroun.