

RESUME

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) est une légumineuse qui occupe une place importante dans l'alimentation au Bénin et dans plusieurs régions du monde. Il est cultivé dans toutes les zones tropicales, dans le bassin méditerranéen et aux Etats-Unis. Malheureusement sa culture au Sud du Bénin est perturbée par une plante allélopathique : le *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders (Acanthaceae).

L'allélopathie est le phénomène par lequel certaines adventices émettent dans leur entourage des substances chimiques qui ralentissent la croissance d'autres espèces ou inhibent le développement de celles-ci et la maîtrise des substances allélochimiques de *Justicia anselliana* peut conditionner le choix des moyens de protection du niébé.

Le but de notre travail est de confirmer le pouvoir allélopathique du *Justicia anselliana* sur le niébé, de tenter d'identifier et d'isoler les allélochimiques responsables de ce phénomène et de vérifier si les composés allélopathiques du *Justicia anselliana* sont aussi actifs sur des cellules de l'homme et de la souris.

Nous avons tout d'abord recherché les allélochimiques volatils du *Justicia anselliana* par étude GC/FID et GC/MS de ses huiles essentielles. Ce qui nous a permis pour la première fois, d'identifier et de localiser dans la partie aérienne ou les racines de la plante 8 composés : le butyrate de propyle, la 6-méthyl hept-5-ène-2-one, le δ -2-carène, le δ -3-carène, l' α -phellandène, le β -phellandène, le phényl acétaldéhyde, le dihydrotagetone. En dehors de l'eau florale, ces composés sont tous actifs et manifestent une spécificité d'action sur le niébé comparativement au maïs et à l'arachide.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'étude des composés moins volatils de *Justicia anselliana*. Nous avons montré que l'extrait éthanolique de sa partie aérienne est le plus concentré en allélochimiques. De cet extrait, nous avons identifié, après différents fractionnements (Liquide – liquide, au soxhlet, par CLV et par MPLC) et par différentes méthodes (CCM, GC/FID, GC/MS et RMN) 12 molécules : l'acétate de β -sitostérol, le β -sitostérol, le campestérol, le stigmastérol, le phytol, le 9, 19-cyclolanostan-3-ol-24-méthylène, le 19-cyclolanost-24-ène-3-ol, le lupéol, l' α -amyrine, l'heneicosane, le palmitate d'éthyle et la rutine dont aucune n'est précédemment identifiée dans le *Justicia anselliana*.

En dehors de la rutine qui n'influe pas sur le taux de germination du niébé, tous les autres composés identifiés ont un effet allélopathique (de stimulation ou d'inhibition) sur le taux de germination, l'élongation et le poids frais du niébé. Les effets d'inhibition des trois paramètres de germination se retrouvent avec les stérols et triterpènes du *Justicia anselliana* qui ne sont pas cytotoxiques sur les cellules de mammifères.

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons développé et validé une méthode exacte et sensible en combinant l'extraction au soxhlet, la purification par l'extraction en phase solide et la chromatographie gazeuse, pour la détermination quantitative des triterpènes et des stérols présents dans la partie aérienne de *Justicia anselliana*. Par cette méthode, nous avons montré que la partie aérienne de la plante contient : 2.924 ± 0.017 $\mu\text{g/g}$ de lupéol, 0.478 ± 0.004 $\mu\text{g/g}$ de α -amyrine, 2.061 ± 0.013 $\mu\text{g/g}$ de stigmastérol, 2.664 ± 0.020 $\mu\text{g/g}$ de campestérol et 1.843 ± 0.087 $\mu\text{g/g}$ de β -sitostérol. C'est la première méthode qui décrit la quantification de stérols et triterpènes dans la partie aérienne de cette plante.

Avons-nous enfin quantifié et localisé les tanins du *Justicia anselliana* avec la méthode de la poudre de peau. Ainsi nous avons montré que sa partie aérienne contient $26.15\% \pm 0.64\%$ de tanins, $28.65\% \pm 0.56\%$ de polyphénols totaux et $2.46\% \pm 0.26\%$ de polyphénols non retenus par la poudre de peau et que ses racines en contiennent seulement $1.40\% \pm 0.24\%$, $4.92\% \pm 0.32\%$ et $3.51\% \pm 0.31\%$ respectivement. Les fractions aqueuses avec ou sans polyphénols sont toutes actives sur le niébé mais leurs activités restent globalement plus faibles que celles de la fraction la plus active de l'extrait éthanolique.



UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI (UAC)



FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES (FAST)

FORMATION DOCTORALE CHIMIE ET APPLICATIONS

FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE (FSS)

LABORATOIRE DE PHARMACOGNOSIE ET DES HUILES ESSENTIELLES

N° d'ordre 005-07/FDCA/FAST/UAC

Thème

**IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION
D'ALLELOCHIMIQUES DE *Justicia anselliana*
(Nees) T. Anderson (Acanthaceae) ET
EVALUATION DE LEURS EFFETS
ALLELOPATHIQUES SUR LE NIEBE *Vigna
unquiculata* (L.)Walp.**

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Chimie Organique et Substances Naturelles

Par

Dossou Sika Salomé KPOVIESSI

Soutenue publiquement le 16 mars 2007, devant la commission d'examen

Président : 1-Prof. Joëlle QUETIN-LECLERCQ, Université Catholique de Louvain (Belgique), rapporteur.

Membre : 2-Prof. Mansourou MOUDACHIROU, Université d'Abomey-Calavi (Bénin) co-directeur de thèse.

3- Prof. Georges C. ACCROMBESSI, Université d'Abomey-Calavi (Bénin) co-directeur de thèse.

4- Prof. Joseph D. HOUNHOUIGAN, Université d'Abomey-Calavi (Bénin).

5- Prof. Dansou K. KOSSOU, Université d'Abomey-Calavi (Bénin), rapporteur.

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A Dieu tout puissant qui a été l'Alpha, l'Emmanuel et l'Oméga de ce travail.

A ma chère épouse Bénédicte KPADONOU et nos enfants bien-aimés David et Esdras pour leur soutien et patience.

A mon feu père Daton KPOVIESSI et mon feu frère Dénagni Justin dont les départs prématurés n'ont pas entravé l'aboutissement de ce travail.

A ma très chère mère Toyicha GBENOU pour son courage, mes sœurs Gbémavo, Ricicatou, Josephine, mes frères Valentin, Guy, Joseph et à toute la grande famille KPOVIESSI qui m'a vu évoluer.

A Philibert KPOVIESSI pour ses soutiens, au Pasteur Raphaël KOUTON pour son encouragement, à Rotimy, Joachim et tous mes frères dans le Seigneur pour leur soutien spirituel et à tous mes amis.

Remerciements

Avant d'exposer les résultats des recherches qui ont fait l'objet de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes physiques et morales qui ont contribué à sa réalisation.

Je me dois de témoigner ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Georges C. Accrombessi, Professeur de Chimie Organique, mon directeur, qui a suivi avec attention ce travail. Il m'a choisi depuis la maîtrise, vu mon attachement et mon zèle pour sa matière. Je n'ai pas oublié sa rigueur scientifique et son sens du travail bien fait qui lui ont permis d'ériger en moi depuis le DEA, un autre être. Il m'a initié à l'enseignement supérieur et m'a donné le goût de la recherche. Qu'il veuille bien croire à l'expression de mes sincères remerciements pour les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer et la confiance qu'il m'a toujours témoignée.

Je tiens à remercier le Professeurs Mansourou Moudachirou, mon co-directeur, pour avoir accepté de co-diriger ce travail ; que soient loués votre minutie et l'esprit critique dont vous avez fait preuve tout le long de ce travail. C'est un grand honneur pour moi, de trouver ici l'occasion, de vous exprimer toute ma reconnaissance pour vos rigueurs et conseils scientifiques, votre appui pédagogique et votre soutien moral.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Professeur Joëlle. Quetin-Leclercq de l'Université Catholique de Louvain (UCL) en Belgique, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens à lui témoigner toute ma gratitude pour son encadrement, ses conseils judicieux, sa disponibilité malgré les nombreuses tâches qui lui incombent et tous les sacrifices consentis dans la réussite de mes stages en Belgique.

Je remercie très sincèrement le Professeur Bernard Tilquin pour ses conseils et son soutien moral.

C'est pour moi un agréable devoir de remercier le Docteur Joachim Gbénou et le Docteur Fernand Gbaguidi qui ont usé de tout leur dévouement pour la réalisation de ce travail, qu'il trouvent ici l'expression de mes remerciement et de ma reconnaissance.

Merci à vous, membre de mon jury, d'avoir accepté de discuter et de juger ce travail.

Cette thèse en pharmacognosie, science pluridisciplinaire par excellence, n'aurait pu voir le jour sans que de nombreuses collaborations soient établies. C'est avec un plaisir particulier que je remercie :

- ◆ Le Professeur Akpovi Akoègninou pour m'avoir aidé dans l'identification de ma plante.
- ◆ Le Professeur Jacques Poupaert et Monsieur Coco. Kapanda pour avoir réalisé les spectres RMN à 1-D, 2-D et pour leur aide dans l'interprétation de ces spectres.
- ◆ Le Professeur Philippe Hubert, Professeur de Chimie Analytique du Laboratoire de Chimie Analytique, du Département de Pharmacie de l'Université de Liège en Belgium qui m'a supervisé pour la partie validation de la méthode de dosage.
- ◆ Les Professeurs Adam Ahanchédé et Dansou Kossou pour m'avoir accepté dans le Laboratoire de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences Agronomiques (FSA) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) pour la réalisation des tests allélopathiques.

Je remercie également :

- le Laboratoire de Pharmacognosie de l'Unité d'Analyse Chimique et Physico-Chimique des Médicaments (CHAM) de l'Université Catholique de Louvain (UCL) pour l'accueil qui m'a toujours été réservé au cours de mes stages en Belgique.
- l'Université d'Abomey Calavi (UAC), la Faculté des Sciences de la Santé (FSS), la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) et particulièrement le Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles du Bénin.
- la Coopération Universitaire Institutionnelle Université Francophone de Belgique (CIUF), le Commissariat Général aux Relations Internationales (CGRI) et l'Association

à But non Lucratif (ASBL) du Centre Pharmaceutique de Louvain-La-Neuve pour avoir financé mes stages ; et les Fonds nationaux belges pour la Recherche Scientifique (FNRS) pour une subvention à JQL (nr 9. 4553. 04).

- tous les membre de l'unité CHAM de l'Université Catholique de Louvain : Hélène, Mohamed, Sara, Chiara pour leur collaboration, Marie-Christine pour son aide technique, Françoise, Marie-Yvonne, Ramazan, Jean-Paul, Véronique, Guy, et Marie-France pour tous les services rendus.
- toute l'équipe du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles de l'Université d'Abomey Calavi : Dr Joachim Gbénou, Dr Eléonore Yayi, Dr Léon Ahoussi, Dr Nouratou Ali Dr Fernand Gbaguidi et Marthe Zinsou pour leur collaboration.
- Mr Pierre GBEHOU, Technicien au Laboratoire de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences Agronomiques (FSA) et Mr Essègrèmon AKPO pour leur assistance le long des essais allélopathiques.
- tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué d'une manière ou d'une autre à la bonne réalisation de cette oeuvre par leurs conseils, leur encouragement et leur affection.

AVANT-PROPOS

Une partie du travail exposé ci-dessous a fait l'objet de trois publications dans des journaux internationaux :

1 - Allelopathic effects on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) plant and cytotoxic activities of sterols and triterpene isolated from *Justicia anselliana* (NEES) T. Anders.

Dossou Sika Salomé KPOVIESSI^{a,b}, Fernand A. GDAGUIDI^{a*}, Joachim D. GBENOU^a, Georges C. ACCROMBESSI^a, Mohamed HADDAD^b, Mansourou MOUDACHIROU^a and Joëlle QUETIN-LECLERCQ^b
Electronic Journal of Natural substance, 1, (2006), 12-19.

2- *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders ESSENTIAL OILS COMPOUNDS AND ALLELOPATHIC EFFECTS ON COWPEA *Vigna unguiculata* (L.)Walp PLANT.

Dossou S. Salomé KPOVIESSI, Joachim D. GBENOU, Fernand A. Gbaguidi, Léon AHOUSSE,
Georges C. ACCROMBESSI, Mansourou MOUDACHIROU^{*}, J. Quetin-Leclercq.
Journal of Essential Oil Research. RN° 2228 of 2nd Jan. 2006. "Acceptée et Sous presse"

3- Development and validation of a quantification method for sterols and triterpenes in the aerial part of *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders by capillary gas chromatography.

Dossou Sika Salomé Kpoviéssi^{a,b}, Fernand Gbaguidi^a, Joachim Gbénou^a, Georges Accrombessi^a, Mansourou Moudachirou^a, Eric Rozet^c, Philippe Hubert^c, Joëlle Quetin-Leclercq^{b*}.

Journal of Chromatographie B (Soumise pour publication)

I. BUT ET PLAN DU TRAVAIL.....	5
II. INTRODUCTION.....	7
II.1. ALLÉLOPATHIE	7
II.1.1. Définition	7
II.1.2. – Terminologie en allélopathie	7
II.1.3. – Etablissement de l'allélopathie : postulat de Putnam	8
II.1.4. Substances allélopathiques	9
II.1.5. Localisation des substances allélopathiques.....	13
II.1.6. Mode d'action des substances allélopathiques.....	13
II.1.7. Méthodes d'extraction et de mise en évidence des substances allélopathiques.....	15
II.1.8. Méthodes de tests allélopathiques.....	16
II.1.9. Rôle de l'allélopathie dans les systèmes de production en agriculture.....	17
II.2. VIGNA UNGUICULATA (L) WALP (NIÉBÉ)	19
II.2.1. Aspect botanique et description des cultivars du <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp (niébé).....	19
II.2.2. Importance nutritionnelle et économique du <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp (niébé)	21
II.3. JUSTICIA ANSELLIANA (NEES) T. ANDERS	25
II.3.1. Taxonomie et description botanique.....	25
II.3.2. Distribution géographique et écologie.....	27
II.3.3. Usage du <i>Justicia anselliana</i> (Nees) T. anders.....	27
II.3.4. Effets de cohabitation de <i>Justicia anselliana</i> (Nees) T. anders et du NIEBE.	28
II.3.5. Composition chimique de <i>Justicia anselliana</i> (Nees) T. anders (travaux antérieurs)	29
II.4. LES TERPÈNES ET STÉROLS	38
II.4.1. Généralités.....	38
II.4.2. Biogenèse	39
II.4.2.1. Biosynthèse des unités isoprènes	39
II.4.3. Biosynthèse des triterpènes et stérols à partir des unités isoprènes	43
III. ETUDE DES COMPOSÉS VOLATILS DE JUSTICIA ANSELLIANA	48
III.1. INTRODUCTION	48
III.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	49
III.2.1. Matériel végétal	49
III.2.2. Extraction des huiles essentielles et obtention de l'eau florale.	51
III.2.3. Analyse chimique des huiles essentielles.....	53
III.2.4. Tests allélopathiques.	54
III.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	58
III.3.1. Rendement de l'extraction.....	58
III.3.2. Composition chimique des huiles essentielles de <i>J. anselliana</i>	58
III.3.3. Pouvoir allélopathique des différents extraits sur le niébé.....	59
III.4. CONCLUSION	69
IV. ETUDE DES COMPOSÉS MOINS VOLATILS DE JUSTICIA ANSELLIANA.....	71
IV.1. INTRODUCTION	71

IV.2. IDENTIFICATION DE L'EXTRAIT BRUT LE PLUS ACTIF DE LA PLANTE	72
IV.2.1. Introduction	72
IV.2.2. Matériels et méthodes	72
IV.2.2.1. Matériel végétal	72
IV.2.2.2. Criblage phytochimique.....	72
IV.2.2.3. Préparation d'extraits bruts.....	73
IV.2.2.4. Tests allélopathiques.....	75
IV.2.3. Résultats et discussions	75
IV.2.3.1. Analyses Phytochimiques de <i>Justicia anselliana</i>	75
IV.2.3.2. Rendement des extractions et pouvoir allélopathique des différents extraits sur le niébé.....	77
IV.2.4. Conclusion	80
IV.3. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE.	81
IV.3.1. Introduction	81
IV.3.2. Matériel et méthodes	81
IV.3.2.1. Fractionnements.....	81
IV.3.2.1.1. Fractionnement liquide-liquide à température ambiante.....	81
IV.3.2.1.2. Fractionnement liquide- liquide au Soxhlet.....	82
IV.3.2.2. Analyse des fractions de l'extrait éthanolique.....	83
IV.3.2.2.1. Analyse par CCM	83
IV.3.2.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS.....	87
IV.3.2.3. Tests biologiques	91
IV.3.2.3.1. Tests allélopathiques des fractions	91
IV.3.2.3.2. Test de cytotoxicité.....	92
IV.3.3. Résultats et discussions	94
IV.3.3.1 Rendement des fractionnements Liquide – liquide de l'extrait éthanolique.....	94
IV.3.3.2. Activité allélopathique des fractions.....	95
IV.3.3.3. Activité cytotoxique des fractions.....	97
IV.3.3.4. Analyse des fractions.....	98
IV.3.4. Conclusion	109
IV.4. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES ALLELOCHIMIQUES DE LA FRACTION LA PLUS ACTIVE DE JUSTICIA ANSELLIANA.	110
IV.4.1. Introduction	110
IV.4.2. Matériels et méthodes	110
IV.4.2.1. Fractionnement et purification de la fraction la plus active.....	110
IV.4.2.2. Purification de la rutine.....	114
IV.4.2.3. Détermination de structure	116
IV.4.2.3.1. Spectre de Masse (SM)	116
IV.4.2.3.2. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	116
IV.4.3. Résultats et discussions	118
IV.4.3.1. Purification des composés de la plante.....	118
IV.4.3.2. Identification des composés.....	119
IV.4.4. Conclusion	123
IV.5. ACTIVITES ALLELOPATHIQUES DES COMPOSES ISOLES ET IDENTIFIES DE JUSTICIA ANSELLIANA.	124
IV.5.1. Introduction	124

IV.5.2. Matériels et méthodes	124
IV.5.3. Résultats et discussion	124
IV.5.4. Conclusion	126
V. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES DE QUANTIFICATION	
.....	128
V.1. INTRODUCTION	128
V.2. GÉNÉRALITÉS	128
V.2.1. Objectif de la validation	128
V.2.2. Phase de validation	128
V.2.2.1. Phase de prévalidation	129
V.2.2.2. Phase de validation formelle	129
V.2.3. Définition des critères de validation	129
V.3. DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE DE QUANTIFICATION DES STÉROLS	
ET TRITERPÈNES DANS LA PARTIE AÉRIENNE DE JUSTICIA ANSELLIANA (NEES) T. ANDERS	
PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	133
V.3.1. Introduction	133
V.3.2. Matériel et méthodes	133
V.3.3. Résultats et discussion	140
V.3.4. Quantification des stérols et triterpènes	157
V.3.5. Conclusion	159
V.4. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN TANINS ET EN POLYPHÉNOLS TOTAUX.	161
V.4.1. Introduction	161
V.4.2. Matériel et Méthode	161
V.4.3. Résultats et discussion	164
V.4.3.1. Quantification des tanins et polyphénols.	164
V.4.3.2. Séparation et tests allélopathiques des tanins et polyphénols.	165
V.4.4. Conclusion	167
VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	169
VII. BIBLIOGRAPHIE	174

I.

BUT ET PLAN DU TRAVAIL

I.BUT ET PLAN DU TRAVAIL

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.)Walp) est une plante légumineuse qui occupe une place importante dans l'alimentation au Bénin et dans plusieurs régions du monde. Il est cultivé sur plus de neuf millions d'hectares, dans toutes les zones tropicales, dans le bassin méditerranéen et aux Etats-Unis. Malheureusement sa culture au Sud du Bénin est perturbée par une plante allélopathique : le *Justicia anselliana*.

L'objectif de ce travail est de rechercher la composition chimique du *Justicia anselliana* dont la présence est nuisible au niébé. Notre but est non seulement de contribuer à l'évaluation du pouvoir allélopathique de cette plante mais également d'identifier de nouvelles molécules qui pourraient enrichir notre arsenal allélochimique.

Après une étude du pouvoir allélopathique de différents extraits du *Justicia anselliana*, nous isolerons les allélochimiques de l'extrait le plus actif. Afin d'évaluer leurs propriétés allélopathiques sur le niébé, nous essaierons de dégager la corrélation de ces composés isolés avec l'inhibition ou la stimulation de la germination et de la croissance du niébé. Par une étude de l'activité cytotoxique de ces allélochimiques, nous vérifierons si les composés allélopathiques du *Justicia anselliana* sont aussi actifs sur des cellules de l'homme et de la souris.

Nous nous attacherons également à développer et à valider une méthode de dosage de ces composés dans *Justicia anselliana*. Cette étape servira à vérifier la quantité de ces allélochimiques dans la plante. Ce qui aidera à établir si le *Justicia anselliana* émet ces allélochimiques à une concentration capable de produire l'activité observée.

Ces études nous permettront de mieux comprendre le rôle joué par les différentes molécules à la fois dans les propriétés allélopathiques de la plante et dans l'interaction avec son environnement.

Les différentes étapes de ce travail sont les suivantes:

- 1. Etude des composés volatils de la plante**
- 2. Etude phytochimique (fractionnement et identification des principes actifs moins volatils)**
 - 2.1. Sélection de l'extrait le plus actif**
 - 2.2. Isolement, purification et détermination de structure des principes actifs**
 - 2.3. Evaluation des propriétés allélopathiques des composés identifiés**
- 3. Développement d'une méthode de dosage des principes actifs dans la plante.**

II. INTRODUCTION

II. INTRODUCTION

II.1. Allélopathie

II.1.1. Définition

Le terme allélopathie dérive de deux mots grecs : « Allelon » (réciproque), « Pathos » (nuisible ou nocif) et désigne littéralement les effets nuisibles d'une plante sur une autre (Narwal, 1994 ; Rizvi et al., 1992). Ce terme a évolué et est encore utilisé aujourd'hui avec quelques nuances (Einhellig, 1994). Il a été pour la première fois utilisé par Molish (Molisch, 1937 ; Rizvi et al. , 1992 ; Narwal, 1996 ; Einnhellig, 1994) pour indiquer l'ensemble des effets qui sont directement ou indirectement liés au transfert des substances chimiques d'une plante à une autre et vice - versa. Défini de cette manière, le terme recouvre en même temps les effets de stimulation et d'inhibition induits par ces substances. Le traité le plus compréhensif de l'allélopathie apparu en 1974, limite exclusivement ce terme aux effets inhibiteurs (Rice, 1974). Mais ce même auteur, dans la deuxième édition de son ouvrage, revoit sa perception du concept. Il remonte à la définition originelle de Molish et embrasse par là, aussi bien les effets de stimulation que d'inhibition d'une plante sur une autre (Rice, 1984).

En réalité, le terme allélopathie ne fait pas seulement référence aux interactions chimiques ou biochimiques plante – plante, mais aussi prend en compte l'ensemble des effets semblables susceptibles de se produire entre les plantes supérieures et les micro – organismes, et entre les micro – organismes eux-mêmes (Numata, 1982 ; Rice, 1992).

II.1.2. – Terminologie en allélopathie

Pour des raisons d'harmonie, des concepts ont été proposés pour désigner au cas par cas les implications en allélopathie. Voici quelques termes dont certains sont utilisés dans le présent document :

- Allélochimique : terme largement utilisé pour désigner toute substance chimique impliqué dans les interactions entre plantes.
- Sémiochimique : appellation synonymique du terme allélopathie mais qui est moins utilisé.
- Koline : allélochimique produit par une plante pérenne et qui n'est nuisible qu'à des plantes pérennes.
- Phytocide : allélochimique produit par une plante pérenne nuisible aux seuls microorganismes.
- Marasmine : allélochimique produit par un microorganisme et qui n'est nuisible qu'aux microorganismes.
- Antibiotique : allélochimique produit par un microorganisme et qui est nuisible aux microorganismes seulement.
- Phytoinhibiteur : terme actualisé, utilisé pour désigner tout allélochimique produit par une plante pérenne quel que soit son champ d'action.
- Saproinhibiteur : terme actualisé désignant tout allélochimique d'origine microbienne quel que soit son champ d'action.

II.1.3. – Etablissement de l'allélopathie : postulat de Putnam

Afin de parvenir à une preuve assez convaincante de l'existence de l'allélopathie au niveau d'une plante, il importe de passer par les étapes suivantes (Putnam, 1985) :

- [1] Montrer l'existence effective d'interaction, décrire les symptômes et quantifier le degré d'interférence ;
- [2] Isoler et identifier les allélochimiques responsables. Cette étape est une phase clé pour la mise en évidence de l'allélopathie ;
- [3] Reproduire les mêmes symptômes à partir des allélochimiques précédemment isolés. Ceci se fera par le biais d'un système de contrôle constitué de matériel sain ;
- [4] Etablir que la plante allélopathique émet les allélochimiques à une concentration capable de produire le phénomène observé.

C'est un protocole analogue au postulat de Koch en pathologie (Kolhi et al., 1998). Il est souhaitable mais non essentiel de prendre en compte la sélectivité des allélochimiques par examen de la gamme d'hôtes susceptibles. Par le phénomène de synergisme, plusieurs

composés naturels peuvent conjointement exercer le même effet. Ceci laisse entrevoir les obstacles à franchir pour établir ce postulat.

II.1.4. Substances allélopathiques

Les substances allélopathiques sont des métabolites secondaires produits par les plantes et issus des processus métaboliques primaires (Rizvi et al. , 1992). Il existe une gamme très variée de substances allélochimiques. Rizvi pour simplifier adopte une catégorisation, regroupant les substances dans des ensembles beaucoup plus grands :

- les acides organiques solubles dans l'eau, les alcools à chaînes linéaires, les aldéhydes et les cétones aliphatiques ;
- les lactones simples insaturées ;
- les acides gras à chaînes longues et les polyacétylènes ;
- les naphtoquinones, les anthraquinones et les quinones complexes ;
- les phénols simples, l'acide benzoïque et ses dérivés ;
- l'acide cinnamique et ses dérivés ;
- les flavonoïdes ;
- les tanins ;
- les terpénoïdes et stéroïdes ;
- les aminoacides et polypeptides ;
- les alcaloïdes et cyanhydrines ;
- les sulfides et glycosides cyanogénétiques ;
- les purines et nucléotides

Ces composés influencent la vie des communautés végétales, la succession végétale, la préservation des semences, la préservation des spores fongiques, le cycle de l'azote, les associations mutuelles, la production des plantes cultivées et le mécanisme de défense des végétaux. Ces différents processus qui restent la cible des composés allélopathiques présage à la complexité du phénomène d'allélopathie. Le tableau 1 résume quelques allélochimiques avec les plantes cibles.

Tableau 1: Résumé de quelques molécules allélopathiques, choisis compte tenu de leur présence probable dans le genre *Justicia* et des plantes cibles

N°	Famille	Molécule	Plante dont elle est isolée	Plante cible	Mode d'action	Auteur
01	Stérols	phytol, chondrillasterol	<i>Amaranthus palmeri</i>	carotte - tomate	Inhibition de la germination	Fischer et al. 1985
		β -sitostérol, stigmastérol	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	idem	idem	idem
		(20S)-4 α -Methyl-24-methylenecholest-7-en-3 β -ol	<i>Typha latifolia</i>	Plantes aquatiques (algal)	Inhibition de la germination	Della G. M. and al. 1990.
		β -sitostérol, ergostérol peroxide, 7 α -hydroxysitostérol, 7 β -hydroxysitostérol,	<i>Melilotus messanensis</i>	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Allium cepa</i> , <i>Lactuca sativa</i> (var. <i>nigra</i> and var. <i>romana</i>) <i>Lycopersicon esculentum</i> .	Inhibition de la germination et de la croissance	Macias et al. 1997.

02	triterpenes	Acide platanique, 3 β ,28,30-lup-20(29)-ènetriol, soyasapogenol B, soyasapogenol G, messagenolide, gammacer-16-en-3-one, acide (27-cis-4-hydroxycinnamoyloxy)-betulinique, acide 27-(trans-4-hydroxycinnamoyloxy)betulinique, acide 20(S)-3 β -hydroxy-29-oxolupan-28-oïque, acide 3 β ,30-dihydroxylup-20(29)-en-28-oïque, et acide 3 β ,20-dihydroxylup-18(19)-en-28-oïque resp.),	<i>Melilotus messanensis</i>	Les monocotylédones: Hordeum vulgare et Allium cepa; les dicotylédones Lactuca sativa (var. nigra et var. romana) et Lycopersicon esculentum	germination et croissance	Macias et al., 1997.
03	Diterpenoides	Calliterpenone et dérivés	<i>Callicarpa macrophylla</i>	Mono et dicotylédone	Antagonise l'effet allélopathique	Singh and al., 2004.
04	Monoterpenes	Citronellol, citronellal, cineole, Linalol.		Cassia occidentalis	Inhibition de la Germination	Singh and al., 2002.
05	Acides phénoliques	Acide salicylique, Acide P. hydroxy benzoïque	<i>Ophiopogon japonicus</i>	laitue	Inhibe la croissance de l'hypocotyl	Ikba et al., 2004.

Identification et quantification d'allélochimiques de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders (Acanthaceae) et évaluation de leurs effets allélopathiques sur le niébé *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

		Acide phloretinique, Acide chlorogénique, Acide m. coumarique, Acide o. coumarique, Acide 2,4- dihydroxybenzoïque, Acide gallique, Acide ellargique, Acide pyrogallique,	<i>Tagetes erecta Tagetes signata</i>	Maïs Lupine blanc	Inhibe la croissance	Mashkovska et al. 2004.
		Acide ferrulique, Acide protocatéchique	<i>Agropyron repeus L.</i>	Lepidium sativum, Amaranthus retroflexus, Brassica napus, Lolium perenne, Poa annua, Hordeum vulgare, Secale cereale, Triticum aestivum	Inhibe plus la culture des dicotylédones que des monocotylédones	Schulz et al., 1994.
06	Furanocou marines	Ammirin, Chalepin, 2'- isopropyl psoralene	<i>Stauranthus perforatus</i>	Amaranthus hypocondriacus	Inhibition de la croissance des radicelles	Anaya et al., 2005.
07	Lignanes	Asarinine, fargesine,	<i>Stauranthus perforatus</i>	Amaranthus hypocondriacus Echnocloa crus-galli	Inhibition de la croissance des radicelles	Anaya et al., 2005.
08	Alkyl amides	Pellitorine	<i>Stauranthus perforatus</i>	Amaranthus hypocondriacus Echnocloa crus-galli	Inhibition de la croissance des radicelles	Anaya et al., 2005.
09	Amino- acides	L-3,4- dihydroxyphenylalani ne	<i>Haricot velours (Mucuna pruruens)</i>	Mauvaises herbes à larges feuilles	Suppression de la croissance	Anaya et al., 2005.

II.1.5. Localisation des substances allélopathiques.

Les allélochimiques sont présentes dans les racines, les rhizomes, les tiges, les feuilles, les inflorescences, les grains de pollen, les graines des plantes (Lovett al. , 1981 ;Weston,1996) ; mais les feuilles en sont les meilleures sources (Rice, 1984 ; Kalita et Dey, 1998). Les résultats de Oudhia et al. (1999) révèlent l'existence d'un gradient croissant de concentration, de ces substances, des racines aux feuilles. D'autres auteurs comme Caussanel et Kunesh (1979) ont montré que la nature, la qualité et la concentration des substances varient avec la température, la saison, le type d'organe et l'âge de la plante. Narwal (1994) signale que chez plusieurs espèces de mauvaises herbes, la toxicité des exsudats est élevée au stade juvénile et s'atténue avec l'âge ; pendant que chez d'autres, c'est la situation inverse. Ces substances allélochimiques sont aussi présentes chez certaines plantes cultivées, lesquelles possèdent des capacités naturelles de suppression ou de ralentissement de la croissance des mauvaises herbes existant dans leur voisinage (Wu et al. ,1999).

II.1.6. Mode d'action des substances allélopathiques

Les propriétés chimiques des substances allélopathiques varient suivant le groupe auquel elles appartiennent. Certaines peuvent être libérées dans l'environnement à travers la décomposition des résidus (Chavez et Frans, 1996), les exsudats racinaires, le lessivage sur les parties aériennes et la volatilisation (Lance, 1996), bien que cette dernière voie soit la principale voie pour la libération des dites substances (Kong-chuihua et al., 1998). En dehors des allélochimiques volatiles qui sont absorbées directement dans l'air, le sol joue un rôle intermédiaire important sur toutes les réactions allélopathiques. Les substances allélopathiques potentielles doivent rester actives dans le sol pour exercer leurs effets. L'activité biologique, la persistance, le mouvement et le devenir des produits naturels dans le sol dépendent de leurs interactions avec le complexe absorbant, la population microbienne du sol et l'environnement chimique (Green, 1974).

II.1.6.1. Effets indirects des allélochimiques

Ce sont les effets relatifs au changement des propriétés du sol et du statut nutritionnel, aux modifications des populations ou de l'activité des organismes nuisibles ou bénéfiques comme les micro-organismes, les insectes, les nématodes, etc (Rizvi, 1992). Il apparaît clairement que les substances allélopathiques potentielles peuvent agir non pas directement sur les fonctions de la plante, mais en inhibant dans le sol certains sites à partir desquels se produit l'absorption ou le prélèvement des minéraux, en étouffant l'activité de la flore microbienne. Les phénomènes réels en rapport avec la nature des substances doivent être investigués avant la mise en place des bioéssais. Dans le cas contraire, les expérimentations peuvent aboutir à des résultats contradictoires, alors que dans la réalité, l'inhibition se produit par blocage des relations harmonieuses existant entre le sol et la plante. Par ailleurs, les substances allélochimiques peuvent n'avoir d'incidence négative qu'à long terme, par stockage ou accumulation progressive (échelonnée) sur les sites absorbants du complexe argilo-humique.

II.1.6.2. Effets directs des substances allélopathiques

Les effets directs sont ceux qui retiennent plus l'attention. Ils prennent en compte les effets sur les aspects variés de la croissance, du métabolisme des plantes, lesquels sont :

- la cytologie et l'ultrastructure ;
- les phytohormones et leur équilibre ;
- la membrane et sa perméabilité ;
- la germination des grains de pollen et des spores ;
- le prélèvement ou l'exportation des minéraux ;
- les mouvements stomatiques, la photosynthèse et la synthèse des pigments ;
- la respiration ;
- la synthèse protéique ;
- la synthèse de la leghémoglobine et la fixation de l'azote ;
- l'activité enzymatique spécifique ;

- le comportement ou la réaction tissulaire ;
- les rapports des plantes avec l'eau ;
- le matériel génétique ;

C'est donc l'influence des allélochimiques sur l'un quelconque ou plusieurs de ces sites ou fonctions qui aboutit à des manifestations visibles dont les plus connues sont la chlorose, la nécrose, le flétrissement ou les inhibitions de germination, et les manifestations de croissance (Wood et al., 1972 ; Einhellig, 1995).

II.1.7. Méthodes d'extraction et de mise en évidence des substances allélopathiques

La littérature fait essentiellement mention de trois méthodes présentées ici dans l'ordre d'importance décroissant :

***Obtention par broyage et filtrage**

Elle est la méthode la plus utilisée et aboutit à des extraits de toute ou partie de la plante. Lorsqu'ils proviennent des feuilles, tiges ou racines, on parle respectivement d'extraits des feuilles, tiges ou racines.

***Obtention par exsudation**

Cette méthode met exclusivement en exergue les substances allélopathiques présentes dans les racines.

***Obtention par la méthode de double coupe**

Elle est basée sur un dispositif extrait du manuel « Striga Research Methods » (Berner et al., 1997) qui s'établit suivant un certain nombre d'étapes, lesquelles sont décrites de la manière suivante :

- Deux pots de même dimension sont disposés l'un sur l'autre ;
- Le pot supérieur est perforé à sa base. Il est rempli de sable inerte et planté de la mauvaise herbe dont l'effet allélopathique est à étudier.

- La disposition est telle que l'eau pourra percoler du pot supérieur au pot inférieur.

Après la mise en place des plantes et arrosage pendant une à deux semaines, l'eau percolée dans le pot inférieur doit être jetée. L'arrosage des plants du pot supérieur continue, et l'eau percolée à nouveau dans le pot inférieur servira à l'arrosage des semences et plants d'essai.

Ce dispositif est décrit avec beaucoup plus d'amélioration et de perfectionnement par Lance (1996). Il présente en effet beaucoup de contraintes mais à l'avantage de placer la plante dans un milieu semblable à celui du terrain.

II.1.8. Méthodes de tests allélopathiques

Les tests allélopathiques des extraits organiques et fractions pures se font dans des boîtes de Petri stérilisées (Rawat, M.S.M. et al., 1998 ; Singh, H.P. et al., 2003 ; Kato-Noguchi, H., 2003 ; Jefferson, L.V. et al., 2003) et suivent généralement les étapes suivantes :

- Stérilisation des boîtes de Petri ;
- Stérilisation des papiers filtre ;
- Stérilisation de la surface des graines ;
- Dissolution des extraits et fractions pures dans les solvants d'extraction ;
- Ajout des solutions dans les boîtes de Petri contenant les papiers filtre ;
- Evaporation des solvants organiques ;
- Addition d'eau distillée aux boîtes de Petri ;
- Disposition des graines dans les boîtes de Petri ;
- Fermeture des boîtes ;
- Incubation des boîtes de Petri à $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Chaque traitement doit être accompagné d'un témoin sans extrait organique mais utilisant le même solvant organique que le traitement.

Chaque traitement (y compris chaque témoin) est généralement répété quatre (4) fois et la durée à l'incubation dépend des semences : deux (2) jours (*Lactuca sativa*) ; trois (3) jours

(*Triticum aestivum* ; *A. candatus*, *D. sanguinedas*), cinq (5) jours (*Vigna unguiculata*, *Zea mays*), sept (7) jours (*Raphanus sativus*, *Cicer arietinum*, *Arachis hypogaeae*).

II.1..9. Rôle de l'allélopathie dans les systèmes de production en agriculture

Le rôle de l'allélopathie dans les systèmes de production réside essentiellement dans les préjudices causés par ces substances à la culture. En réalité, les phénomènes dont les substances allélopathiques sont responsables sont nombreux. Ils correspondent à l'un et / ou l'autre des aspects suivants :

- la « fatigue » ou l'épuisement du sol ;
- l'allotoxicité ;
- la baisse de rendement ;
- la prédisposition des plantes aux maladies ;
- la réduction de la nitrification, de la fixation biologique de l'azote et du prélèvement des minéraux ;
- les interactions entre cultures et mauvaises herbes. (Rizvi, 1994 ; Narwal, 1996)

Le prélèvement des ions par les plantes est important pour leur croissance, leur développement et leur rendement. Plusieurs agents allélopathiques affectent cette absorption (Rice, 1994). Un exemple éloquent est celui des acides phénoliques qui inhibent le prélèvement du ^{32}P et K ; ceci est imputable à une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions inorganiques (Glass, 1975).

La présence des substances allélochimiques dans l'enveloppe tégumentaire prévient la pourriture et la germination des semences de mauvaises herbes, de sorte que ces dernières peuvent rester viables dans le sol pendant plusieurs années. Ces semences peuvent aussi contenir des composés antimicrobiens (lactones insaturés, phénols..) et des inhibiteurs de germination (les phénols, les flavonoïdes, les glycosides et les tanins) (Wang et al., 1967 ; Webster et al., 1967), lesquels sont à l'origine du phénomène de germination échelonnée observé chez la plupart des mauvaises herbes.

Enfin, les interactions allélopathiques entre culture et mauvaises herbes sont en partie responsables des pertes de rendement. Les mauvaises herbes influencent aussi les plantes cultivées à travers la libération des phytotoxines par les semences, les résidus en décomposition, les exsudats, les filtrats et les substances volatiles. Ces toxines sont responsables de la chute de nodulation des légumineuses et de la réduction de la leghémoglobine contenue dans les nodules (Rice, 1992) ; alors que la quantité d'azote fixée est directement proportionnelle à la contenance des nodules en leghémoglobine (Virtanen et al., 1947 ; Stewart, 1966).

La possibilité d'utiliser les allélochimiques comme régulateurs de croissance et pesticides naturels trouve également son application. A ce sujet, un certain nombre d'allélochimiques sont déjà disponibles dans le commerce (Rizvi et al., 1992).

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L) Walp) fait partie des légumineuses dont la germination et la croissance sont influencées négativement par les allélochimiques.

II.2. *Vigna unguiculata* (L) Walp (niébé)

II.2.1. Aspect botanique et description des cultivars du *Vigna unguiculata* (L) Walp (niébé)

Famille : Fabaceae

Nom botanique : *Vigna unguiculata* (L) Walp

Nom français : niébé

Nom anglais : cowpea

Nom fon (béninois) : aikoun

Le genre *Vigna* est d'origine asiatique. L'espèce *Vigna unguiculata*(L) Walp (Figure 1) regroupe les anciennes espèces *Vigna unguiculata*, *Vigna sinensis*, *Vigna sesquipedalis*. Ses graines présentent une grande variété de coloration (unie, à œil, bicolores, tachetées....) et de taille. C'est en Afrique qu'on retrouve la plus grande variabilité du niébé et l'Afrique de l'Ouest est le centre de la diversité domestique du niébé (Ng, N.Q. et al., 1988 ; Ehlers, J.D. et al.,1997). Au Nigeria, huit variétés ont été caractérisées à partir de leurs propriétés physiques et fonctionnelles (Olapade, 2002). Les critères de sélection du niébé sont multiples : acceptabilité des graines (couleur, dimension, texture tégumentaire), adaptation aux contraintes biotiques (maladies et ennemis) et adaptation aux contraintes abiotiques (sécheresse, chaleur, carences en azote et en phosphore, acidité et toxicité aluminique des sols). Le critère essentiel de différenciation des variétés est la sensibilité ou non à la photopériode. On distingue ainsi trois groupes :

- un groupe photo-indépendant tardif, cultivé essentiellement dans les zones les plus proches de l'équateur. La floraison est échelonnée au cours de la saison culturale et a lieu à partir de nœuds éloignés de la tige principale. Les plantes sont le plus souvent volubiles ;
- un groupe photo-indépendant précoce, à port érigé, cultivé dans les zones de latitude élevée. La floraison a lieu à partir des premiers nœuds de la tige principale et donne une production groupée, récoltable au bout de deux mois ;

- un groupe photosensible, à port généralement rampant, cultivé en Afrique soudano sahélienne en association avec le sorgho et le mil. Ces variétés fleurissent lorsque la longueur du jour décroît en dessous d'un certain seuil. (Guigaz M. 2002).



Figure 1: Champ de niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).

II.2.2. Importance nutritionnelle et économique du *Vigna unguiculata* (L) Walp (niébé)

Le niébé occupe une place de choix dans l'alimentation au Bénin et dans plusieurs régions du monde, à cause de sa qualité nutritive. En Afrique de l'Ouest, les graines sont parfois réduites en farine pour fabriquer des beignets très appréciés. Le niébé est parfois utilisé comme fourrage (en Inde) ou cultivé pour un usage textile (c'est le cas du cultigroupe textilis, caractérisé par ses longs pédoncules floraux « atteignant 1 m » dont on tire des fibres textiles utilisées pour la confection de cordelettes) (Pasquet R.S. et Fotso M. , 1994). Les feuilles et les jeunes pousses peuvent être consommées en épinards. Les gousses sont parfois mangées en vert (Guigaz M., 2002).

En termes de principes immédiats, les graines de niébé présentent les constituants résumés dans le tableau 2 (Rachie et Robert, 1974)

Tableau 2: Composition moyenne des graines de niébé *Vigna unguiculata*

CONSTITUANTS	POURCENTAGE
Eau	11
Protéines	23.4
Hydrate de carbone	56.8
Lipides	1.3
Fibres	3.9
Cendres	3.6

Les valeurs élevées de sa teneur en protéines (Dovlo et al., 1976) et en hydrates de carbonés (source d'énergie) sont la preuve de sa grande valeur nutritionnelle. Les teneurs élevées en

calcium (90 mg/100g), en fer (6 à 7 mg/100 g), en acide nicotinique (2mg / 100 mg), et en thiamine (0.9 mg /100g) contribuent pour une part substantielle à combler les besoins alimentaires dans les tropiques (Platt, B.S., 1962).

Les teneurs protéiques brutes varient considérablement, s'échelonnant entre 19% et 35% du poids sec suivant le génotype, le rendement des semences, les pratiques culturales et l'environnement. Les protéines isolées du niébé contiennent des quantités adéquates d'acides aminés les plus essentiels pour les enfants et les adultes (Tableau : 3). La digestion in vivo de ces protéines est meilleure comparativement à celle des autres légumineuses (Rangel A., 2004).

Tableau 3: Composition en acides aminés des protéines isolés du *Vigna unguiculata* (Rangel A., 2004)

Acide aminé	Quantité (mg/g protéine isolé)	FAO/WHO (1991) seuil minimum requis (mg/g protéine)
Acide aspartique	116	
Thréonine	50	34
Sérine	53	
Acide glutamique	162	
Glycine	38	
Alanine	39	
Valine	50	35
Cystine	18	25 ^a
Méthionine	14	
Isoleucine	47	28
Leucine	74	66
Tyrosine	39	
Phénylalanine	66	63 ^b
Lysine	68	58
Histidine	37	19
Arginine	75	
Proline	45	
Tryptophane	9	11

^a Cystine + Méthionine.

^b Phénylalanine + Tyrosine.

La gamme des acides aminés est excellente, si ce n'est la teneur en méthionine et cystine, qui tend à être inférieure au seuil minimum requis pour la nutrition des monogastriques. Ce problème est d'ailleurs retrouvé chez la majorité des autres variétés de légumineuses à graines.

Le taux des substances toxiques et des anti-métabolites comme inhibiteur à la trypsine, les hémagglutinines et les facteurs de flatulence sont minimes chez le niébé (Liner, I.E., 1969). Néanmoins, on a déjà rencontré dans le niébé des inhibiteurs à la trypsine et à la chymotrypsine (Ventura et Filho, 1967) et même un cyanogène dont la concentration peut aller jusqu'à 8 mg par 100 mg de produit (Montgomery, 1964). La présence de ces facteurs anti-nutritionnels n'est pas un problème à la santé humaine si l'on procède à un traitement par cuisson adéquate du niébé (ce qui permet de neutraliser l'action nocive de ces facteurs) avant son incorporation dans la nourriture (Rangel A., 2004. Egounlety, M., 2003).

Cette grande valeur nutritionnelle du niébé fait qu'il est cultivé sur plus de 9 millions d'hectares, dans toutes les zones tropicales, dans le bassin méditerranéen et également aux Etats-Unis. En Afrique où il est la légumineuse la plus consommée, il est cultivé pour ses graines. L'Afrique de l'ouest (Figure 2) et du centre produisent annuellement environ 2.6 millions de tonnes de niébé sur une superficie de 7.8 millions d'hectares ce qui correspond à 69% de la production mondiale et à 80% des surfaces sur lesquelles le niébé est cultivé à travers le monde (Pereira et al., 2001 ; Langyintuo A.S. et AL., 2003). Le Niger, le Burkina Faso, le Bénin, le Mali, le Cameroun, le Tchad, et le Sénégal sont les pays exportateurs du niébé alors que le Nigeria, le Ghana, le Togo, la Côte d'Ivoire, le Gabon et la Mauritanie sont les pays importateurs (Langyintuo A.S. et AL., 2003). Au Sud Bénin, dans la vallée de l'Ouémé la culture du niébé vient en première position sur le plan économique avec toute la garantie économique qu'elle offre aux paysans. Elle occupe les 90% de la population active et se fait en décrue sur des parcelles libérées par le retrait de l'eau (Akplogan, 1999).

Beaucoup de plantes constituent des mauvaises herbes qui perturbent la culture du niébé dans la vallée de l'Ouémé au Sud Bénin. Parmi elles, une espèce très redoutée pour ses caractéristiques allélopathiques : le *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders (Acanthacée), contribue à l'enherbement des parcelles de niébé pour une proportion de 12 à 18% (Togbé, 2000).

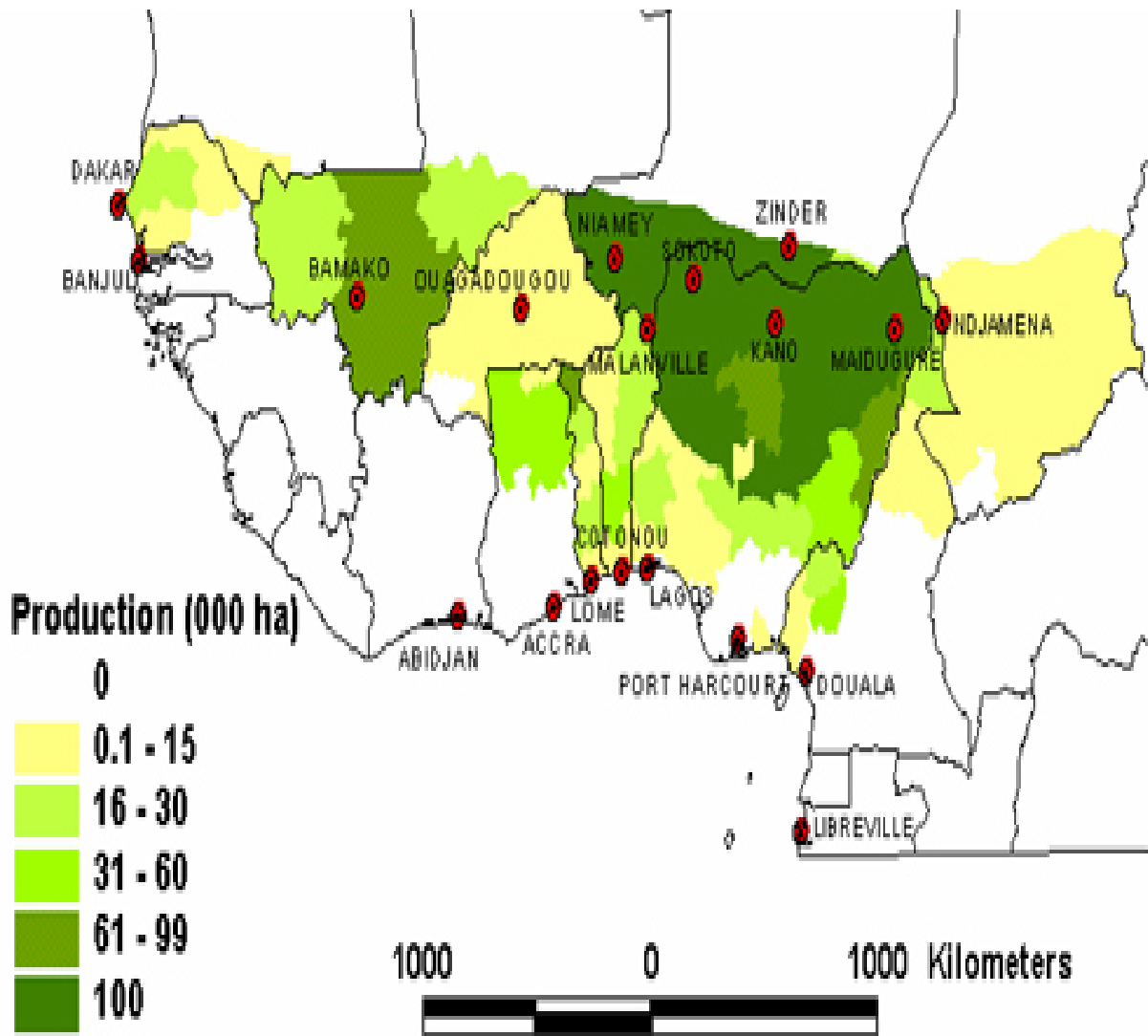


Figure 2 : Production du Niébé en Afrique de l'Ouest.

II.3. *Justicia anselliana* (Nees) T. anders

II.3.1. Taxonomie et description botanique

L'espèce *Justicia anselliana* (Figure 3) était connue sous le nom de *Adhatoda anselliana* (Nees) DC en 1847. Il faut attendre 1883 avant qu'elle ne prenne le nom de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders. Au Sud-Bénin, elle est appelée Damandodjè en l'ange nationale goun. *Justicia anselliana* est une plante adventice qui appartient à l'ordre des Personales, à la famille des Acanthacées, à la division des Lignosae et au genre *Justicia*. La famille des Acanthacées est constituée de 250 genres et le genre *Justicia* contient environ 300 espèces (Cronquist, 1981).

Adventice dicotylédone, *Justicia anselliana* est une espèce annuelle des cultures et plantations (Akplogan, 1999). C'est une plante à port généralement dressé dont la longueur varie entre 30 cm et 60 cm. Son axe principal comporte plusieurs nœuds d'où partent de nombreuses ramifications. Au contact d'un sol humide, ces nœuds émettent des racines favorisant ainsi la multiplication végétative par bouture de *Justicia anselliana*. Son système racinaire fasciculé comporte un pivot à développement vertical ce qui permet un bon enracinement dans le sol et une meilleure nutrition de la plante. Sa tige fragile et quadrangulaire est pleine d'un tissu spongieux. Elle est glabre et ligneuse à la base chez les individus âgés. Ses feuilles entières, simples, lancéolées sont acuminées et à bords faiblement anguleux. Elles sont opposées et portées par un pétiole étroit de 5 à 10 mm de large. Elles présentent deux faces pratiquement glabres et de couleur verte avec un limbe ovale, lancéolé, long de 25 à 30 mm et large de 10 à 15 mm. Les fleurs bisexuées, blanches et rayées de pourpre sont constituées en de longues cymes axillaires portées par un pédoncule de 3 à 5 cm de long. Chaque cyme comprend 5 à 10 petites fleurs de 2 à 3 mm dont le calice est formé de quatre pétales de différentes formes et diversement soudés entre eux. Chaque fleur présente deux étamines de 3 mm chacune, fixées dans la zone de jonction du calice et de la corolle avec un style de longueur pratiquement égale à celle des étamines et des anthères disposés autour du stigmate. *Justicia anselliana* donne des fruits qui sont des capsules fusiformes, déhiscentes, d'environ 5 mm de long sur un calice persistant. A maturité, les capsules

s'ouvrent et libèrent toujours quatre graines s'il n'y a pas eu avortement. Les graines sont glabres et entourées d'une pulpe spongieuse provenant du nucelle et l'ensemble forme de petits cylindres de 0.5 mm de haut et de 1.5 mm de diamètre (Hutchinson, 1964 ; Berhault, 1976 ; Brunel et al., 1984 ; Togbé 2000).



Figure 3 : *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders

II.3.2. Distribution géographique et écologie

L'espèce *Justicia anselliana* est une plante afrotropicale dont la présence est révélée au Mali (au niveau du Fleuve Blanc), en Guinée (dans la zone d'Agoué), au Libéria (au niveau du Cap Palmas), au Ghana (à Koug-Akuse), au Nigéria (au Sud et au Nord du pays), au Togo (dans la zone de Toblékolé) et au Dahomey aujourd'hui Bénin (dans la zone de Zangnanado dans le Zou)(Hutchinson et Dalzeiel, 1963). Au Sud Bénin, elle est répandue dans la vallée de l'Ouémé où elle a été identifiée (Togbé, 2000). La distribution géographique de la plante montre que *Justicia anselliana* est une plante qui est très répandue à travers l'Afrique tropicale. La richesse spécifique de l'Afrique Occidentale est plus importante que celle de l'Afrique de l'Est qui ne comporte qu'environ 15 espèces de *Justicia* (Blundell, 1987).

L'espèce *Justicia anselliana* est une plante aquatique très exigeante en eau qui pousse préférentiellement sur les sols hydromorphes (Projet NIEBE, 1998). Plante héliophile par excellence, *Justicia anselliana* ne pousse presque jamais sur les parcelles non sarclées après la décrue dans la vallée de l'Ouémé (Togbé, 2000). Ces parcelles sont en réalité réputées pour leur forte infestation par les poacées levant en touffes ; ce qui donne certainement lieu à une compétition très rigoureuse ne permettant pas la levée des plantules de *Justicia anselliana*. Le soleil jouerait un rôle fondamental dans la germination des semences et la levée des plantules de l'adventice.

II.3.3. Usage du *Justicia anselliana* (Nees) T. anders

Les espèces de *Justicia* sont souvent cultivées pour l'ornement (Cronquist, 1981). L'espèce *Justicia anselliana* aurait un effet conservateur sur la tomate et le gombo. Ainsi, de façon traditionnelle au Sud Bénin, les commerçantes de ces deux denrées alimentaires s'en procurent auprès des paysannes, chaque jour de marché, pour conserver leurs produits.

Sur le plan médicinal elle est utilisée contre plusieurs affections. La décoction des racines est indiquée contre l'inflammation des testicules. Les feuilles et les racines sont des remèdes contre les maladies cardiaques. (Watt and Breyer –Brandwijk, 1962). La tisane issue de la décoction des

feuilles sèches et pilées avec celles du *Justicia insularis* et du *Kigelia africana*, additionnée de sel, est utilisée pour les délivrances natales difficiles. Il est aussi conseillé à la femme enceinte d'ajouter chaque jour la partie aérienne de ces plantes à l'eau de bain, au début de la grossesse. Pour traiter les maux de tête, la sève de la feuille est frottée contre la partie affectée. Les feuilles pilées avec celles de *Phragmenthera rufescens*, séchées, puis finement pulvérisées et additionnées à la sauce au poulet, sont indiquées contre le Kwashiorkor. Toute la plante pilée avec les feuilles de *Leucas martinicensis*, est consommée, contre la Syphilis. (Adjanohoun et al., 1993). La macération des feuilles est utilisée pour traiter les vers intestinaux. (Neuwing, 2000).

II.3.4. Effets de cohabitation de *Justicia anselliana* (Nees) T. anders et du NIEBE.



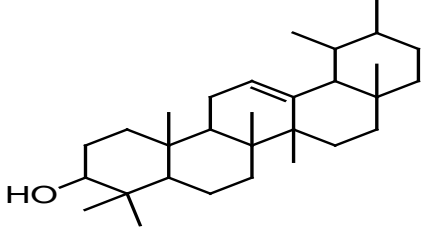
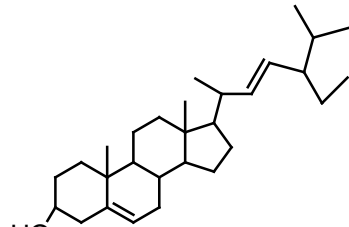
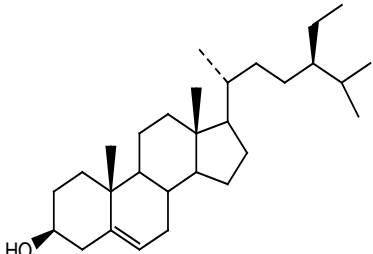
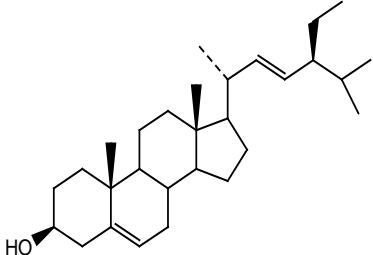
Figure 4 : Le niébé planté avec le *Justicia anselliana* à gauche et sans le *Justicia anselliana* à droite.

Le *Justicia anselliana* (Nees) T. anders fait partie des mauvaises herbes qui disputent aux cultures l'eau, les éléments nutritifs, le gaz carbonique et la lumière. Selon les observations empiriques décrites par les paysans, cette mauvaise herbe réalise une association très intime avec le niébé et, à un stade avancé de son développement, elle entraîne la décoloration de ses feuilles. Elle limite ainsi le développement normal du niébé et perturbe sa culture au Sud Bénin. La nuisibilité de *Justicia anselliana* sur le niébé se manifeste plus par une activité d'allélopathie que par une compétition entre l'adventice et la culture du niébé (Akplogan, 1999). Les exsudats racinaires de *Justicia anselliana* inhibent la croissance en hauteur et la ramification du niébé puis induisent une dépression sur sa biomasse sèche. Ce qui milite en faveur de l'activité allélopathie du *Justicia anselliana* (Togbé, 2000). Une contribution à l'étude de la caractérisation du pouvoir allélopathique de cette plante, mauvaise herbe de la culture de niébé a permis de montrer que l'allélopathie chez l'adventice s'exprime à la fois par des phénomènes d'inhibition et de stimulation (Akpo, 2003).

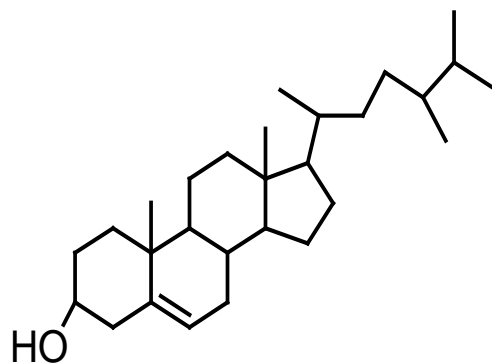
II.3.5. Composition chimique de *Justicia anselliana* (Nees) T. anders (travaux antérieurs)

Aucun travail scientifique n'a été antérieurement publié sur le *Justicia anselliana* en ce qui concerne sa composition chimique. Il ressort des travaux publiés sur les autres espèces du même genre que le genre *Justicia* est très riche en lignanes, en terpènes, en stérols et particulièrement en lignanes arylnaphthalides (Rao C.B.S. and al., 1978), tableau 4.

Tableau 4: Structure de quelques composés isolés du genre *Justicia*

N°	Famille	Structure et nom	Plante source (Auteur)
1	triterpene	 <p data-bbox="451 594 591 625">α-amyrine</p>	<i>Justicia gendarussa.</i> (Oliveria A. F, 2000)
2	stérol	 <p data-bbox="451 957 634 987">Stigmastérol</p>	<i>Justicia pectoralis et</i> <i>Justicia tranquebariensis</i> <i>Linn. f.</i> (Oliveria A. F, 2000; Gottumukkala V. R. S, 1989)
3	Stérol	 <p data-bbox="451 1356 602 1388">β-sitostérol</p>	<i>Justicia tranquebariensis</i> <i>Linn. f. et</i> <i>Adhatoda vasica</i> (Gottumukkala V. R. S, 1989)
4	Stérol	 <p data-bbox="451 1755 626 1776">brassicastérol</p>	<i>Justicia tranquebariensis</i> <i>Linn. F.</i> (Gottumukkala V. R. S, 1989)

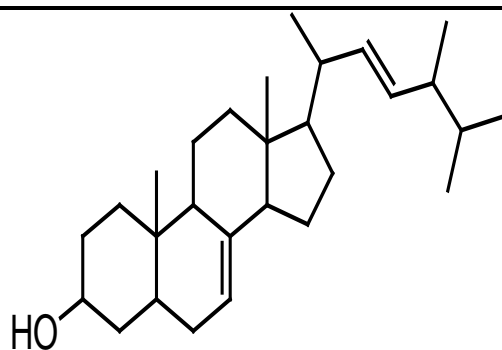
5 Stérol



campestérol

*Justicia tranquebariensis**Linn. f.*(Gottumukkala V. R. S,
1989)

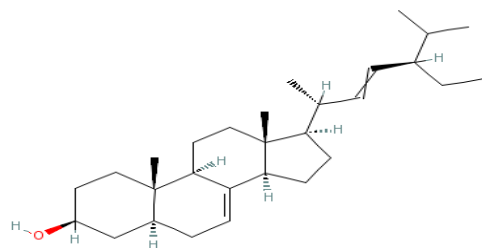
6 Stérol



7,22-ergostadienol

*Justicia tranquebariensis**Linn. f.*(Gottumukkala V. R. S,
1989)

7 stérol

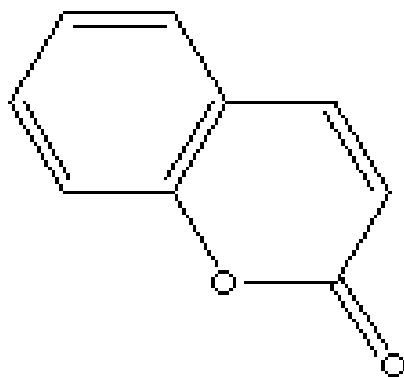


spinastérol

*Justicia tranquebariensis**Linn. f.*(Gottumukkala V. R. S,
1989)

8

coumarie



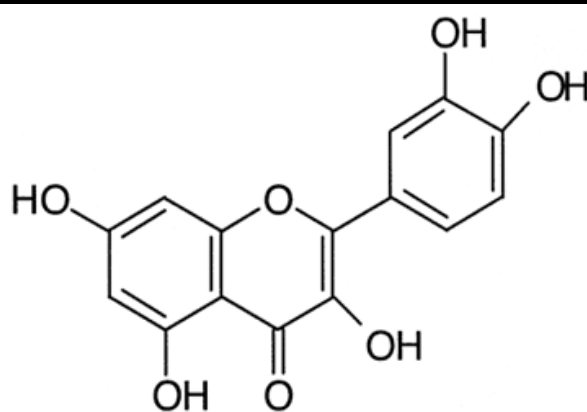
coumarine

Justicia pectoralis

(Oliveria A. F, 2000)

9

flavonoïde



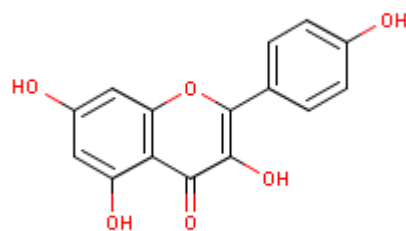
quercetine

Justicia pectoralis

(Oliveria A. F, 2000)

10

flavonoïde

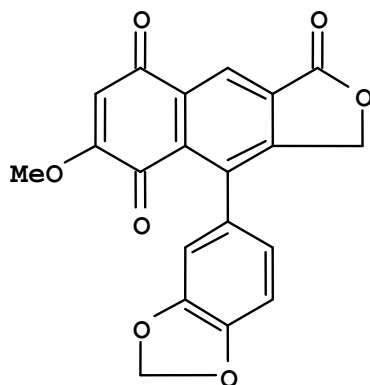


kaempférol

Justicia pectoralis

(Oliveria A. F, 2000)

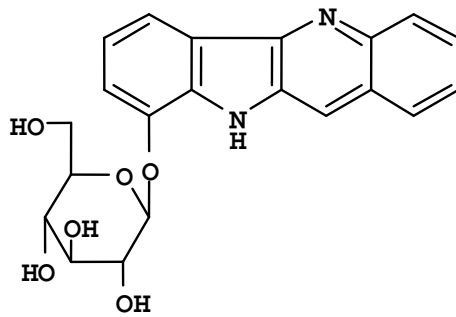
11 Lignane



Justicia hyssopifolia
(Andres P.J 2004)

justicidone

12 alcaloïde

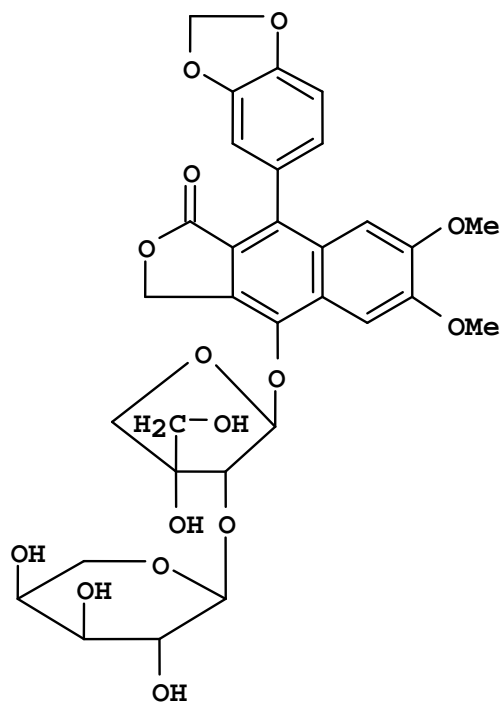


Justicia betonica
(Subbaraju, G. V et al.,
2004)

jusbetonine

13 lignane

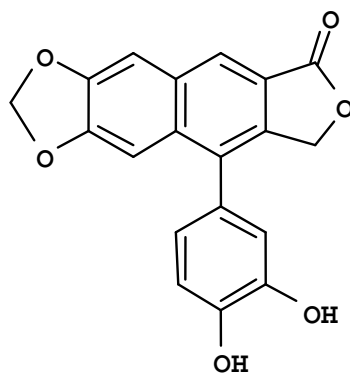
Justicia procumbens
(Shiow-Hwa D., 2002)



procumbenoside A

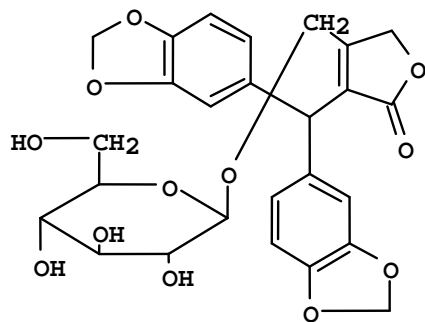
14 Lignane

Justicia diffusa var.
prostrate
(Clarke C.B. and al., 2000)



prostralidine D

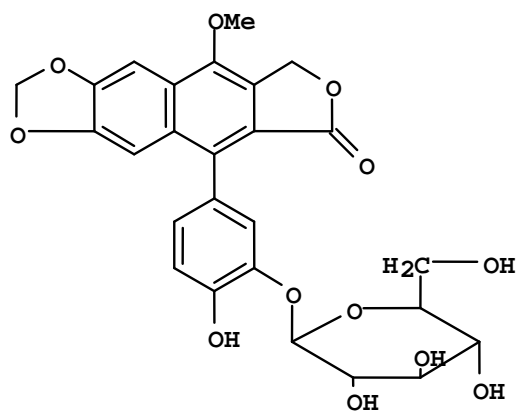
15 Lignane



juspurpurine

Justicia purpurea
(Jakka K. et al., 2003)

Lignane

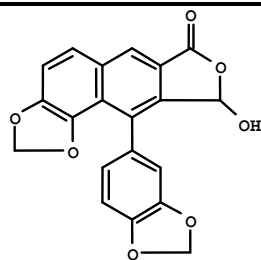


justalakonine

Justicia purpurea
(Jakka K. et al., 2003)

16

17 Lignane



Jusmicranthine

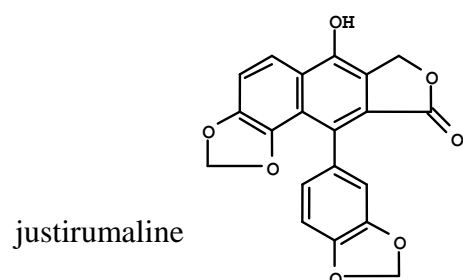
Justicia neesii
Ramamoorthy
(Rajasekhar D., 1999)

18 Lignane

Justicia neesii

Ramamoorthy

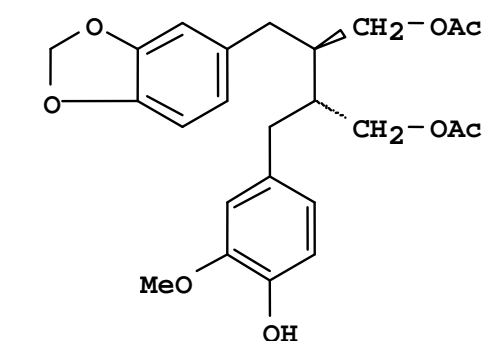
(Rajasekhar D., 1999)



19 Lignane

Justicia procumbens

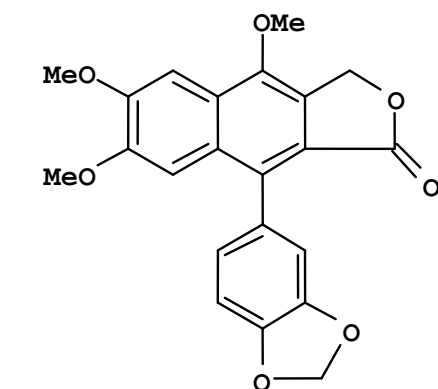
(Chien-Chih C et al., 1998)



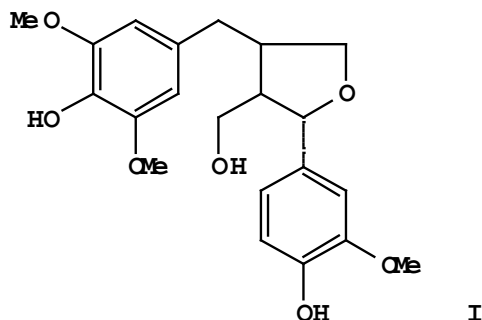
20 Lignane

Justicia procumbens

(Asano J. et al. 1996)



21 Lignane



jusglaucinol

Justicia glauca Rottl.
(Subbaraju G. V. et al.,
1991)

La plupart de ces composés isolés dans le genre *Justicia* possèdent des propriétés cytotoxiques, antiplaquettaires (Chen C. et al, 1996), antivirales (Asano J. et al, 1996), antitumorales (Fukamiya N. et Lee K.J., 1986 ; MacRae W.D. et Towers G.H.N., 1984), antidépresseurs (Ghosal S. et al., 1979), piscicides (Munakata K. et al., 1965) et insecticides (Chitra K.C. et al., 1995).

II.4. Les terpènes et stérols

II.4.1. Généralités

Les terpènes sont une famille de composés issus de la polymérisation d'unités isoprènes à 5 carbones. Malgré leur grande diversité structurale, les terpènes sont synthétisés dans les plantes suivant un nombre restreint de voies de biosynthèse formant ainsi des squelettes au nombre de carbone multiple de 5. Les terpènes sont classés suivant le nombre d'unités isoprènes condensées pour former leur squelette.

Tableau. 5: Les différentes classes de terpènes.

Classe	Unités isoprènes	Nombre de Carbones	Exemples
Hémiterpène	1	5	isoprène, méthylbuténol
Monoterpène	2	10	limonène, menthol, camphre
Sesquiterpène	3	15	artémisine, caryophyllène, gossypol
Diterpène	4	20	taxol, esters de phorbol, ginkgolides
Sesterpène	5	25	ophioboline, lutéone
Triterpène	6	30	squalène, acide oléanolique
Tétraterpène	8	40	β -carotène, lycopène
Polyprénol	n	$n \times 5$	caoutchouc naturel

Avec plus de 23 000 composés différents, la famille des terpènes est la plus grande famille de composés naturels. Elle offre une immense diversité structurale et chaque année de nombreuses nouvelles molécules sont encore isolées.

Les phytostérols et stéroïdes, bien que directement dérivés des triterpènes, font exception à la règle du nombre de carbone multiple de 5. Leur nombre de carbone est ≤ 27 .

II.4.2. Biogenèse

II.4.2.1. Biosynthèse des unités isoprènes

Pendant de nombreuses années la seule voie de biosynthèse des terpènes connue était la voie de l'acide mévalonique, avec comme point de départ l'acétylCoA. Récemment, Rohmer (1999) a mis en évidence une nouvelle voie de biosynthèse appelée la voie du déoxyxylulose phosphate (Eisenreich, 2001) ou voie non mévalonique (Schuhr, 2001). Ces deux voies de biosynthèse conduisent à la formation du même métabolite, l'isopentényl pyrophosphate (IPP), unité isoprène de base dans la synthèse des terpènes. Ces deux voies sont compartimentées au sein de la cellule. La voie du mévalonate opère essentiellement dans le cytoplasme et les mitochondries alors que la voie du déoxyxylulose phosphate se déroule au niveau des plastides (chloroplastes ou chromoplastes dans la cellule végétale). Cette compartimentation n'est toutefois pas absolue car des échanges de métabolites entre compartiments existent (Rohmer, 1999).

II.4.2.1.1. La voie du mévalonate

Cette voie de biosynthèse est la voie classique de synthèse des terpènes (y compris les stéroïdes) au sein de tous les organismes vivants, des bactéries aux mammifères.

Les figures 5a et 5b reprennent les diverses étapes de la biosynthèse de l'isopentényl pyrophosphate à partir de l'acétyl-CoA en passant par l'acide mévalonique. Les principaux enzymes de cette voie sont situés dans le cytoplasme. Ils sont impliqués dans la synthèse de métabolites cytosoliques et particulièrement des triterpènes et des stéroïdes ainsi que quelques sesquiterpènes.

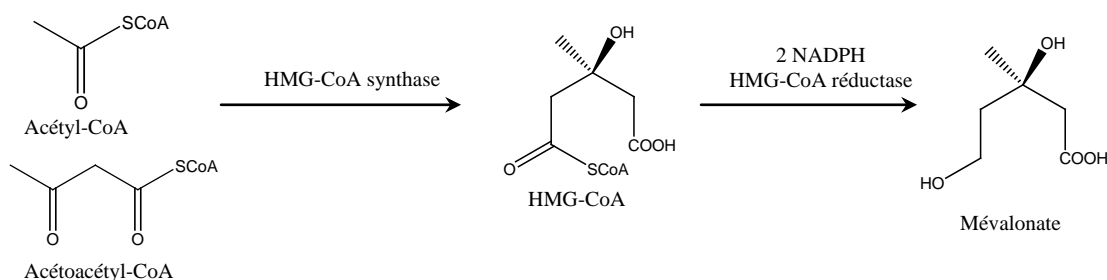


Figure. 5a : Synthèse du mévalonate à partir d'acétylcoenzyme A.

Il est intéressant de noter le rôle de l'isoprène synthase (Figure.5b). Cet enzyme est responsable de la synthèse d'un hémiterpène, l'isoprène. L'isoprène est une molécule volatile libérée par les plantes dans l'atmosphère. On estime à 10^{12} g la quantité totale d'isoprène libérée par an par les plantes (Wolfertz, 2003). Cette molécule joue un rôle très important dans l'interaction des plantes avec leur environnement. En effet, ce composé est libéré essentiellement durant la journée, lors de la photosynthèse. C'est un puissant capteur de radicaux libres et il permet aux plantes de résister à de fortes doses d'ozone (Loreto, 2001). De plus, il joue un rôle important dans la « thermotolérance » des feuilles en stabilisant la membrane des chloroplastes lors de températures élevées (Kesselmeier, 1999 ; Singaas, 1997). Le méthylbuténol de découverte plus récente joue un rôle identique à celui de l'isoprène (Fisher, 2000).

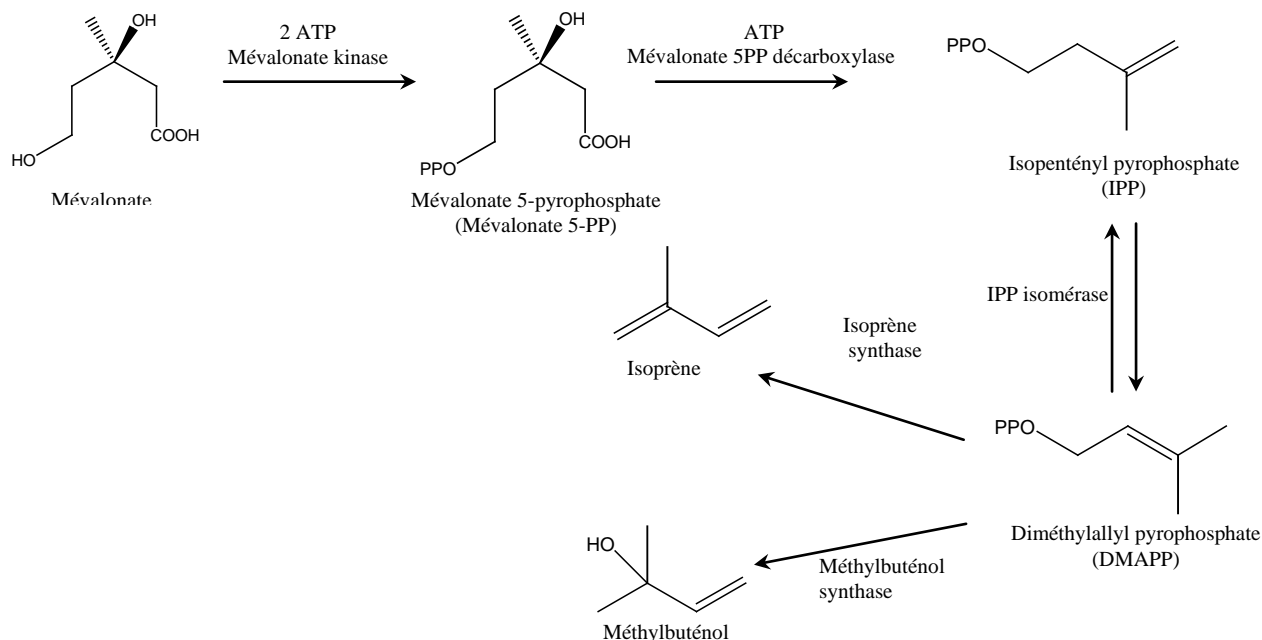


Figure. 5b : Synthèse des unités isoprènes à partir du mévalonate.

II.4.2.1.2. La voie mévalonate-indépendante

Cette voie découverte très récemment possède une multitude de noms : voie mévalonate-indépendante, voie du glycéraldéhyde 3-phosphate/pyruvate, voie du déoxyxylulose (DXP) ou

voie du méthylérythritol phosphate (MEP) (Dewick, 2002). L'ensemble des gènes, enzymes et réactions intervenant dans cette voie de biosynthèse n'est pas encore tous connu. La voie du déoxyxylulose phosphate a été mise en évidence chez les bactéries, les algues, les plantes supérieures et les protozoaires. Il semblerait toutefois que cette voie soit moins souvent impliquée dans la synthèse des terpénoïdes que la voie du mévalonate (Dewick, 2002). La voie mévalonate-indépendante est compartimentée au niveau des plastides des cellules et donne lieu à la synthèse de métabolites tels que les monoterpènes, les diterpènes, les tétraterpènes (caroténoïdes), quelques sesquiterpènes et les chaînes prénylées de la chlorophylle (composant majeur des chloroplastes) (Dewick, 2002). Les plus grosses interrogations sur les différents mécanismes impliqués dans cette voie de biosynthèse se situent au niveau des dernières étapes, lors de la transformation du MECDP en unité isoprène (IPP et DMAPP) (Figure 6). Il semblerait qu'un réarrangement intramoléculaire ait lieu, suivi par une réduction et une déshydratation (Lichtenhaler, 2000). Le rôle de l'IPP isomérase reste énigmatique car il semblerait que l'IPP et le DMAPP puissent être formés indépendamment à partir d'un même intermédiaire (Dewick, 2002). Grâce aux techniques d'incorporation d'intermédiaires marqués au ^{13}C ou au deutérium, il est possible de suivre la voie et les étapes de transformation subies par les métabolites de la plante. La description complète de cette nouvelle voie de biosynthèse ne saurait donc tarder.

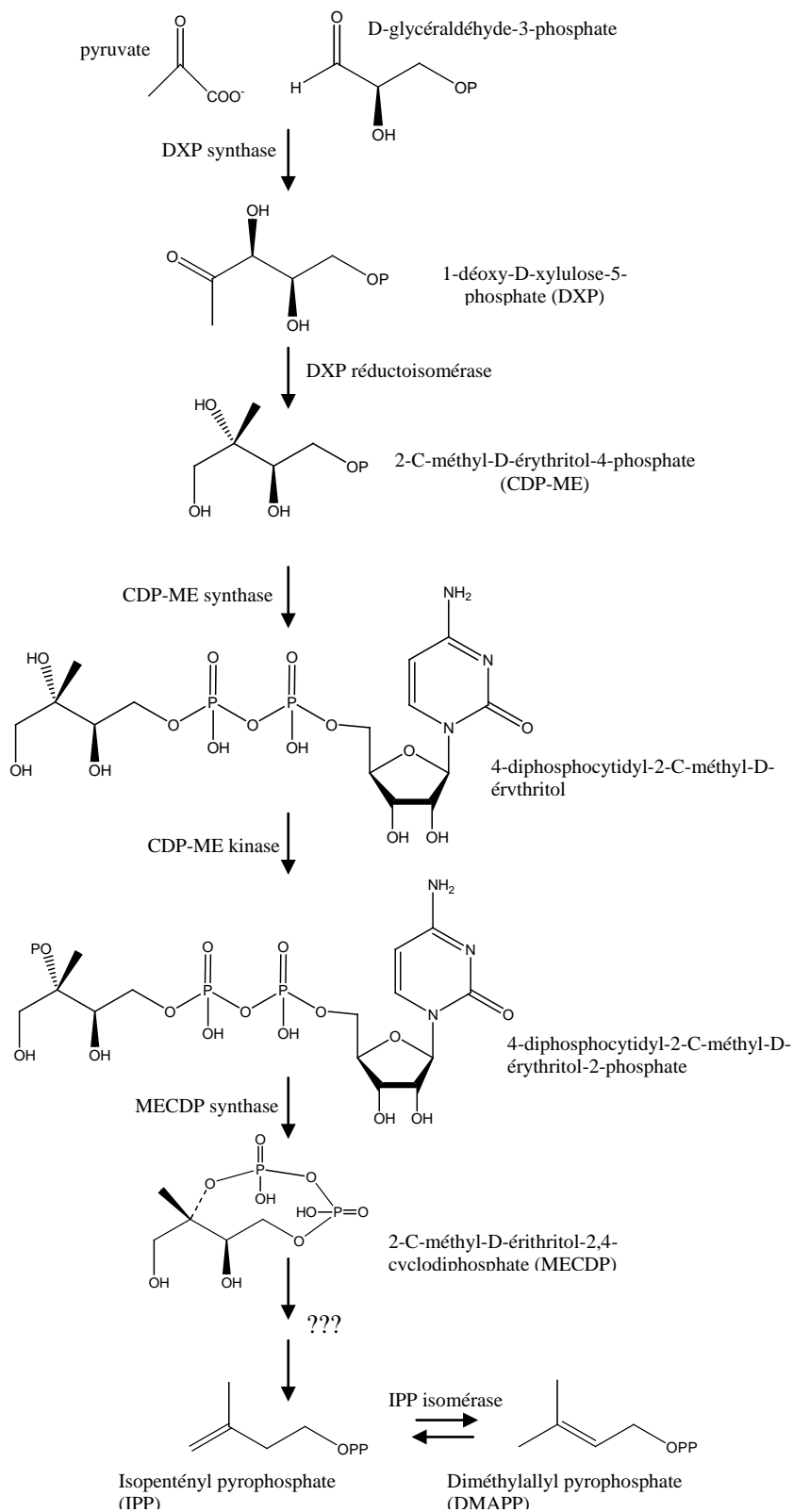


Figure 6. Voie mévalonate indépendante (Dewick, 2002)

II.4.3. Biosynthèse des triterpènes et stérols à partir des unités isoprènes

Les triterpènes sont des composés en C₃₀ issus généralement de la cyclisation biosynthétique du 3S-2,3-époxy-2,3-squalène ou plus rarement, du squalène lui même (figure.7). Ils sont presque toujours hydroxylés en 3 (du fait de l'ouverture de l'époxyde).

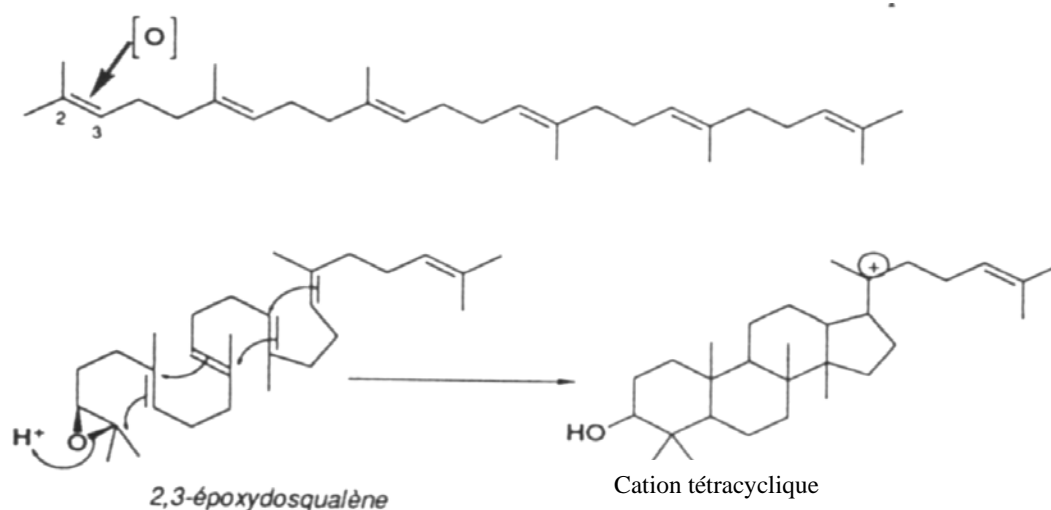


Figure 7a: Formation du 2,3-époxydosqualène et du cation tétracyclique (Bruneton J., 1999)

Les triterpènes malgré la variation des squelettes (4000 composés construits sur plus de 40 squelettes différents), présentent une très forte unité structurale (Chalwood B.V. et al. 1991). Les différences majeures sont d'ordre configurationnel et liées à la conformation adoptée par l'époxydosqualène (ou le squalène) avant la cyclisation (figure. 7a). Le cation issu de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacements 1,2 de proton et de méthyles rationalisant l'existence des différents squelettes tétra – et pentacycliques qui caractérise le groupe (Figure.7b). La conformation du squalène avant la cyclisation explique la variation des squelettes de base et aussi la configuration α et β des substituants de certains carbones asymétriques (α = substituants dirigés vers le bas du plan médian : cf figure. 7b ; et β celui vers le haut soit en avant dans le plan). Les modifications secondaires des triterpènes sont assez limitées : hydroxylations supplémentaires, insaturations, fonctionnalisation des méthyles angulaires, lactonisations et oxydation de groupe méthyle sont les plus usuelles. Le damarane se transforme par ces différentes réactions en une série de triterpènes pentacycliques (Figure 7c). Une exception est

constituée par plusieurs familles des rutaes qui peuvent remanier profondément le squelette tétracyclique initial : oxydation, ouverture- recyclisation, élimination de la chaîne.

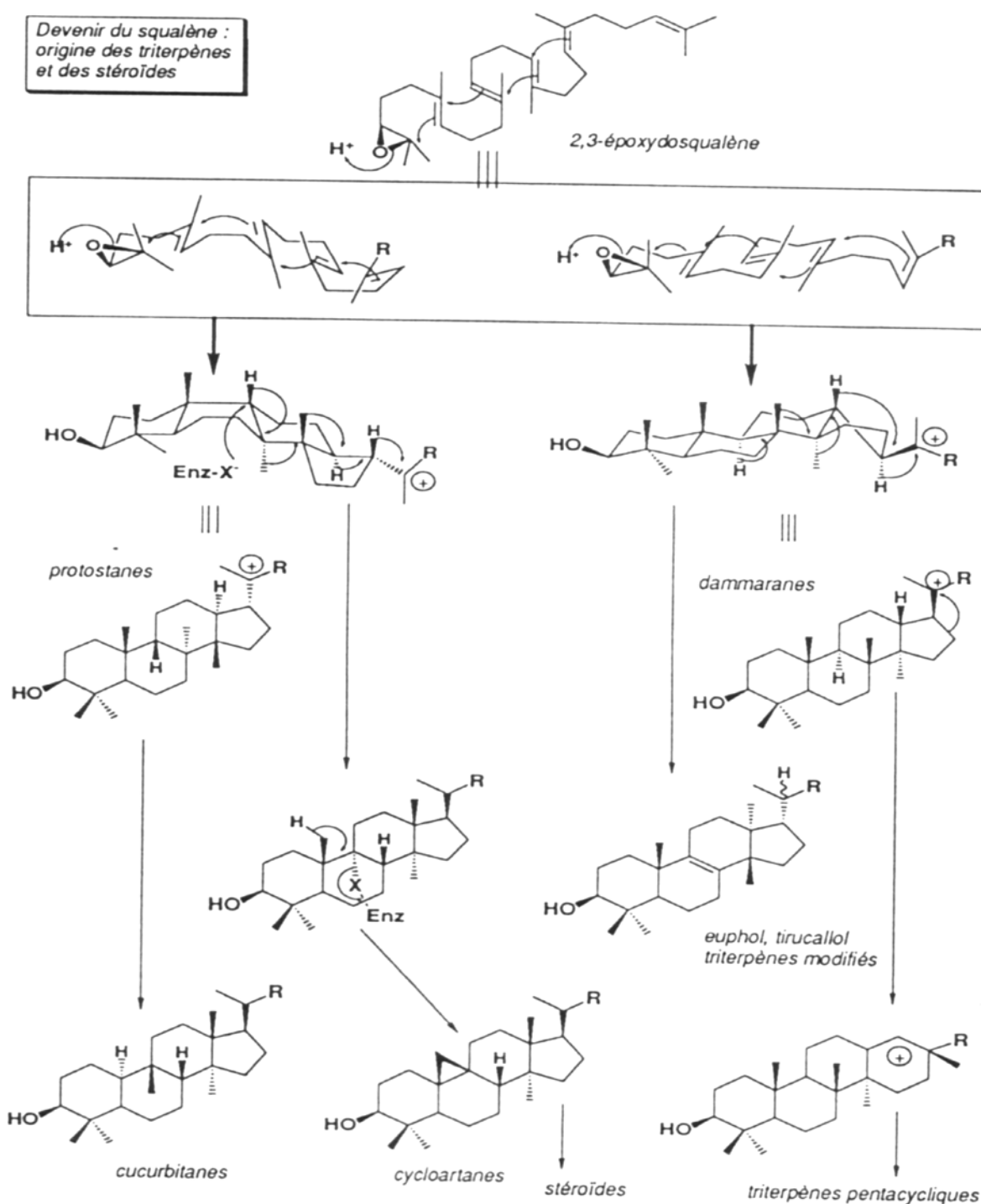
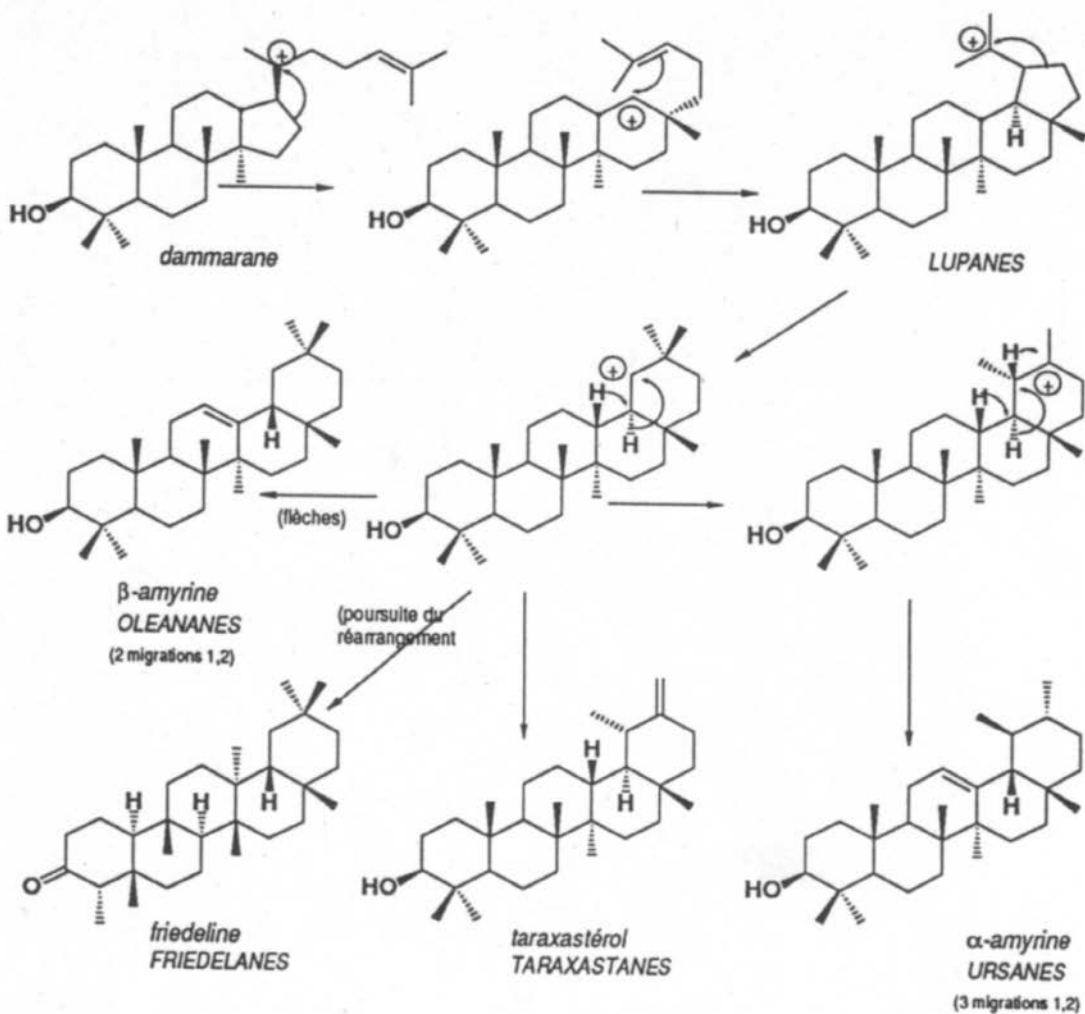


Figure. 7b : Cyclisation de l'époxydosqualène et formation des pentacycles et stéroïdes (Bruneton J., 1999)



Interconversions dans la série des
triterpènes pentacycliques (exemples).

Autres exemples de triterpènes pentacycliques.

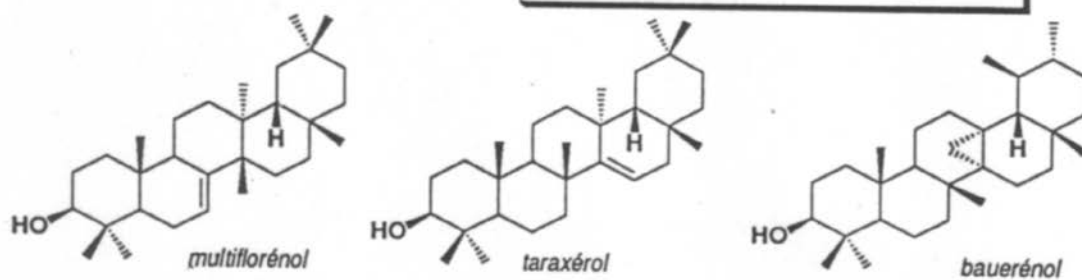


Figure. 7c : Formation de structures type pentacyclique (Bruneton J., 1999)

La nomenclature des triterpènes est basée sur la précision des groupement greffés sur les squelettes connus en indiquant la configuration absolue α ou β du squelette. Le système de numérotation des carbones des triterpènes suit celui des stérols (figure 6a) avec une addition des méthyles sur les carbones 4 et 14 selon l'exemple montré dans le lanostane (Chalwood B.V. et al. 1991).

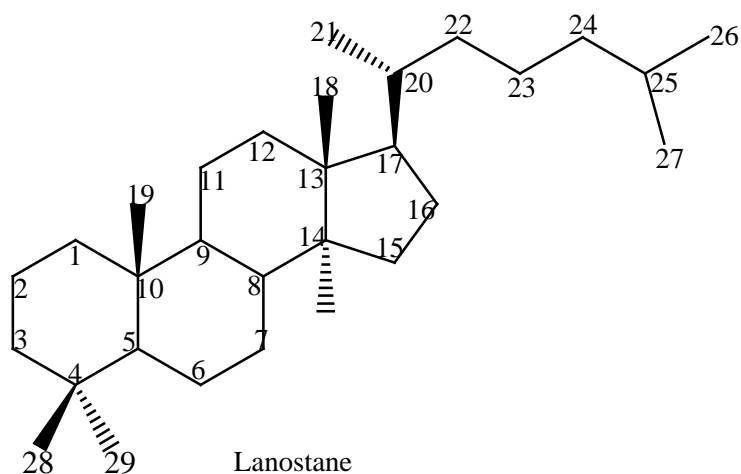


Figure.8a : numérotations des carbones du Lanostane

Au cours des migrations de groupes méthyles qui caractérisent la biosynthèse de plusieurs squelettes triterpéniques, les méthyles gardent généralement leur numéro. Les triterpènes pentacycliques suivent la numérotations des oléananes pour les pentacycliques aux cycles hexaniques et des hopanes pour ceux avec un cycle pentanique (Figure.8b), elle même dérivée de celle de lanostane.

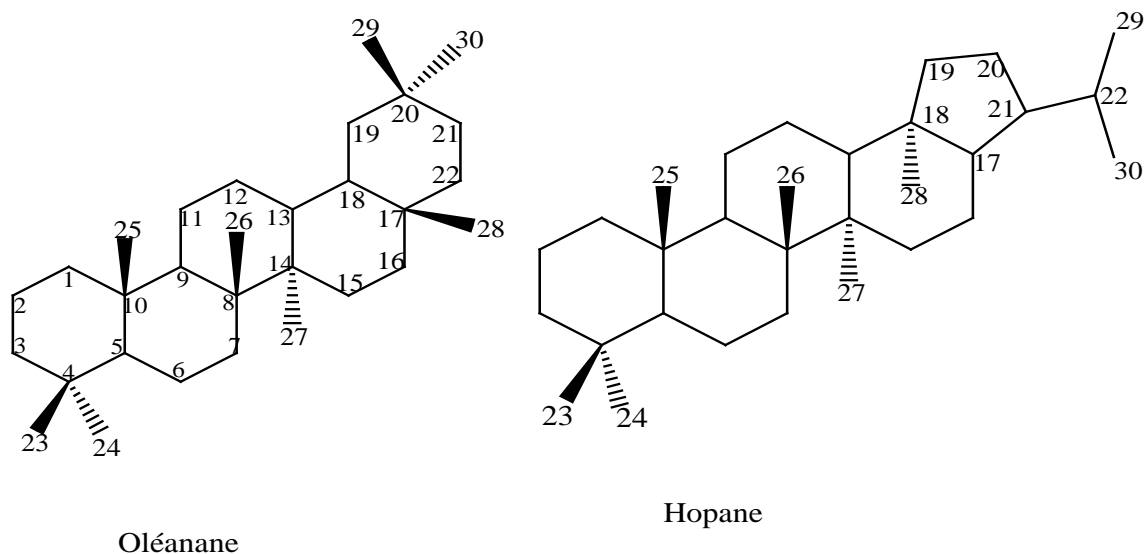


Figure.8b : numérotation des carbones des squelettes oléanane et Hopane

III. ETUDE DES COMPOSÉS

VOLATILS DE *JUSTICIA*

ANSELLIANA

III. ETUDE DES COMPOSES VOLATILS DE *JUSTICIA ANSELLIANA*

III.1. INTRODUCTION

La principale voie de libération des allélochimiques produits par une adventice annuelle est la volatilisation (Akobundu, 1987). Les allélochimiques libérés par cette voie sont les composés les plus volatils de la plante. Ils se retrouvent dans les huiles essentielles de l'adventice.

Le criblage phytochimique a révélé la présence d'huile essentielle aussi bien dans la partie aérienne que dans les racines de *Justicia anselliana*. Il est à noter qu'aucun travail antérieur n'a été effectué ni sur l'extraction, ni sur l'analyse de l'huile essentielle du *Justicia anselliana*.

L'analyse des huiles essentielles de *Justicia anselliana* pourrait permettre non seulement de connaître les allélochimiques volatils de l'adventice mais aussi de suivre l'évolution de la composition de ces huiles en fonction de l'âge de la plante ; ce qui peut orienter dans le choix de la méthode de protection du niébé.

Afin d'étudier les composés volatils de *Justicia anselliana* qui ont des effets allélopathiques sur le niébé, nous avons d'abord extrait et déterminé le pourcentage d'huile essentielle dans la partie aérienne d'une part et dans les racines de *Justicia anselliana* d'autre part puis identifié et quantifié les composés majoritaires de ces huiles par une analyse GC/FID et GC/MS. Les tests allélopathiques de ces huiles et de leurs composants majoritaires ont permis d'élucider l'influence de ces composés volatils sur la germination et la croissance en hauteur du niébé. Des tests de spécificité ont été effectués sur le maïs, l'arachide et le niébé.

III.2. MATÉRIELS ET METHODES

III.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne et des racines de *Justicia anselliana* d'une part et des semences du niébé, du maïs et de l'arachide d'autre part.

III.2.1.1. *Justicia anselliana*.

La partie aérienne et les racines de *Justicia anselliana* ont été collectées dans la vallée de l'Ouémé au Sud du Bénin à Dannou. La plante récoltée a été identifiée et authentifiée par l'Herbier National du Bénin (Figure 9), où un spécimen a été déposé (n° AA6295 / HNB).



Abomey - Calavi le 30 Janvier 2006

CERTIFICAT D'IDENTIFICATION

Le Responsable de l'Herbier National du Bénin, soussigné, certifie que la plante récoltée par Monsieur KPROVISSI Dossou Sika Salomé, du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (Université d'Abomey-Calavi), dans le cadre de ses travaux de recherche de thèse est identifiée sous :

- Numéro : AA 6295 / IINB
- Nom scientifique : *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders.
- Famille : ACANTHACEAE

En foi de quoi, le présent certificat lui est délivré pour servir et valoir ce que de droit.

Le Responsable,



Professeur Akpovi AKOFGNINOU.

Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Végétale 01 B.P. 4521 Cotonou (Rep. du Bénin)
Tel. (229) 36 00 74 / 36 01 26 poste 333 • Fax (229) 30 - 55 - 50

Figure 9 : Identification de *Justicia anselliana*

Identification et quantification d'allélochimiques de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders (Acanthaceae) et évaluation de leurs effets allélopathiques sur le niébé *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

III.2.1.2. Les semences

* Niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

La variété de niébé utilisée est le IT86D-719 de couleur blanche présentant à l'une de ses extrémités une tache rougeâtre. Son cycle est de 75 jours avec un rendement à l'hectare estimé à 1,5 tonne au Sud-Bénin. C'est une variété de niébé sensible au photopériodisme et présentant un port érigé (Ahanchede A., 2003).

Pour vérifier la spécificité de l'action des allélochimiques, nous avons utilisé les semences du maïs et de l'arachide qui sont souvent couplées avec le niébé au Sud du Bénin.

* Maïs (*Zea mays*)

La variété de maïs concernée est le Q PM (Quality Proteine Maïs ; en fon « DUBOGAN ») dont le cycle est de 90 jours avec un rendement de 1,5 tonne à l'hectare au Sud du pays (Ahanchede A., 2003).

* Arachide (*Arachis hypogaea*)

Les semences d'arachide utilisées appartiennent à une variété locale de Glazoué. D'un cycle de 90 jours, cette variété produit 1,2 tonne à l'hectare au Sud du Bénin (Ahanchede A., 2003).

Les semences de niébé, d'arachide et de maïs sont obtenues à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA), station du Bénin.

III.2.2. Extraction des huiles essentielles et obtention de l'eau florale.

La partie aérienne et les racines fraîches de *Justicia anselliana* récoltées sont extraites par la méthode d'hydrodistillation avec un appareil de type Clavenger (Clevenger J.F. 1928) (figure

10). Pour la détermination du rendement en huile de la plante, 200 g de chaque partie ont été extraits à trois reprises. Les huiles obtenues à partir des racines d'une part, et de la partie aérienne d'autre part sont conservées à une température de -20°C pour les analyses GC/FID et GC/MS et pour les tests allélopathiques.

L'eau florale est obtenue par la méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau bouillante dans un alambic (Bruneton, 1993).

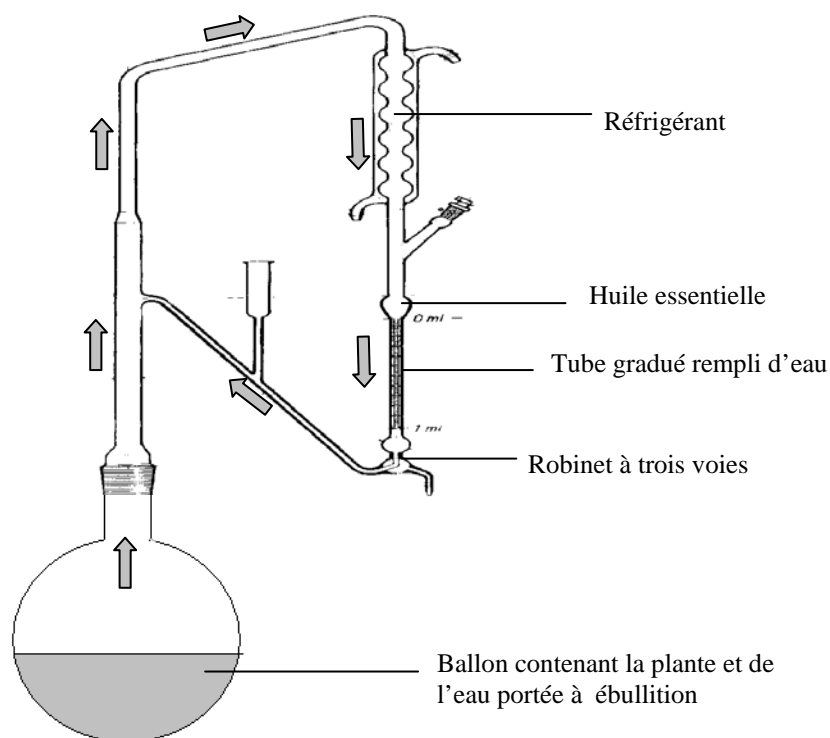


Figure 10: Appareil à distillation décrit par la Pharmacopée Européenne (4^{ème} édition, 2002).

III.2.3. Analyse chimique des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles a été effectuée avec le GC/FID et le couplage GC/MS (AFNOR, 2000).

III.2.3.1. Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse (GC/FID).

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse est d'abord réalisée sur un chromatographe de type DELS/IGC 121C équipé d'une colonne CP WAX 52 CB (25 m x 0.3 mm, df: 0.25 μ m), d'un injecteur (split/splitless) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).

Conditions opératoires:

- Gaz vecteur: Azote U, débit en sortie de colonne: 1mL/min, rapport de fuite: 1/60 = 1mL/mn pression : 0,8 bar.
- Gaz combustible: Hydrogène, débit 30mL/min sous une pression de 1 bar.
- Gaz comburant: Air comprimé, débit 300mL/min sous une pression de 1 bar.
- Température de l'injecteur: 240 °C.
- Température du détecteur: 250 °C.
- Programmation de température du four: palier isotherme à 50 °C pendant 5 mn puis gradient de 2 °C/ min pendant 85 min jusqu'à une température finale de 220 °C.
- Volume injecté: 0,05 μ L.

Un chromatographe de type Hewlett Packard 5890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'un injecteur en mode split/splitless est ensuite utilisé pour la séparation des constituants des huiles avec une colonne capillaire en verre (30m x 0.25 mm i.d.) coulée avec une phase DB 5 d'épaisseur 0.25 μ m ou une colonne capillaire en verre (30 m x 0.25 mm) coulée avec du Supel cowax d'épaisseur 0.20 μ m. Les conditions opératoires sont identiques aux précédentes.

III.2.3.2. Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplé à la masse (GC/MS).

Les huiles sont analysées sur chromatographe de type Hewlett Packard, model 6890 couplé à un spectromètre de masse (SM) de type Hewlett-Packard, model 5873 équipé d'une colonne HP 5 programmée de 50°C (5min) jusqu'à 300°C avec un gradient de 5°C/min suivi d'un palier isotherme de 300°C pendant 5 min. le gaz vecteur était de l'hélium avec un débit de 1 ml/min. L'injecteur est en mode split (1/10). La température de l'injecteur et celle du détecteur sont respectivement 250°C et 320°C. le spectromètre de masse fonctionne en mode à impact électronique à 70eV, la source d'électrons était à 2200 V et la source d'ion à la température de 230°C. Les données des spectres de masse sont obtenues en mode scan avec le rapport m/z situé entre 33 et 450.

III.2.3.3. Identification des constituants.

Les constituants des différentes huiles essentielles sont identifiés par comparaison de leur données spectrales et leurs indices de rétention avec ceux des références bibliographiques (Sadler Research Laboratories, 1986 ; Adams R.P., 1995 ; Sandra P., 1987 ; Masada Y., 1967 ; Heneberg D., 1994 ; National Institute of Standards and Technology, 1994 ; McLafferty F.W., 1991).

III.2.4. Tests allélopathiques.

III.2.4.1. Essais dans des boîtes de Petri

Les essais ont été réalisés dans des boîtes de Petri à usage unique de diamètre 9 cm et de profondeur 2 cm. Le substrat ayant servi de support pour le matériel végétal est ici représenté par des papiers-filtre de type Assistant ayant pour diamètre 125 mm. L'enceinte est caractérisée par

une température ambiante et une humidité relative autour de 30 °C et 70% respectivement au moment des expériences.

III.2.4.1.1 Essai de germination

Afin de s'assurer du bon état des semences, il a été procédé au test de germination des semences de niébé, de maïs et d'arachide. C'est ainsi que 25 graines respectivement de niébé, d'arachide et de maïs ont été disposées sur du papier filtre dans des boîtes de Petri en pyrex. Le contenu de chaque boîte de Petri est imbibé d'eau et l'ensemble a été porté à l'incubateur réglé à une température de 25 ± 1 °C, température conforme à celle préconisée pour les essais de germination du maïs au laboratoire (Baloy J., 1985).

III.2.4.1.2 Application des traitements (Akpo E., 2003)

- **Préparation des boîtes de Petri**

Les boîtes de Petri utilisées dans le cadre de ce travail sont de dimensions 9mm de diamètre et 2 cm de profondeur. A la fin de chaque essai, les boîtes de Petri sont lavées au détergent puis rincées abondamment successivement à l'eau de robinet et à l'eau distillée. A l'utilisation suivante, il est procédé à leur désinfection à l'alcool éthylique au moyen du coton imbibé. Après quelques instants, l'éthanol se volatilise et dès lors, les boîtes de Petri peuvent recevoir les papiers-filtre.

- **Stérilisation des papiers-filtre**

Afin de limiter l'activité microbienne, les papiers-filtre devant servir de substrat aux semences de niébé, d'arachide et de maïs sont mis à l'étuve à 120 °C. Au terme d'une durée de 45min, ils sont retirés puis disposés dans les boîtes de Petri préparées pour la circonstance.

- **Désinfection des semences**

La désinfection des semences de niébé, d'arachide et de maïs se réalise par trempage de ces dernières dans une solution d'hypochlorite de sodium préparée à 2%. L'eau de javel ayant

servi de solution mère étant à 9%. Au bout de 5 minutes, les semences subissent un lavage à grande eau de robinet puis un rinçage à l'eau distillée. Il est procédé ensuite à leur répartition dans les boîtes de Petri à raison de quatre graines disposées de façon équidistante.

- **De l'imbibition à la finition**

L'imbibition des papiers-filtre se fait en une seule fois pour la durée de l'essai à raison de 5 ml d'eau florale par boîte de Petri. Pour le test des huiles essentielles et des composés purs, effectués à une concentration de 600 ppm, 3 mg de chaque composé majoritaire et huile pure de la partie aérienne et des racines de *Justicia anselliana* sont déposés sur le papier filtre Whatman situé dans chaque boîte de pétri. Après imbibition du papier filtre, 5 ml d'eau ayant servi à la préparation de l'eau florale et des huiles essentielles sont additionnés à chaque boîte de pétri. Les boîtes de pétri de contrôle ont reçu uniquement 5 ml d'eau ayant servi à la préparation de l'eau florale et des huiles essentielles (Togbé, 2000). Chaque traitement (y compris chaque témoin) est répété huit (8) fois. Après l'imbibition des papiers-filtre, les boîtes de Petri sont fermées puis scellées au papier parafilm pour éviter les pertes de solution par évaporation. Une fois l'ensemble des boîtes de Petri scellées, du papier aluminium est utilisé pour les couvrir afin d'empêcher d'éventuelle destruction des allélochimiques par la lumière. Car, il faut le noter, les facteurs du milieu préjudiciables aux allélochimiques de *J. anselliana* restent inconnus pour le moment. La dernière opération consiste à mettre l'ensemble des boîtes de Petri à l'incubateur à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Baloy J., 1985 ; Rawat M. S.M., 1998) pour rendre homogène le milieu de conservation de l'essai.

III.2.4.2. Essais dans des pots.

Pour étudier l'influence des composés volatils de *J. anselliana* sur la croissance en longueur du niébé, des essais en ont été effectués dans des pots. Les graines sont mises dans deux groupes de 20 pots (Bernard Reversat F., 1993) contenant chacun 200 g de sol sain des champs. A chaque pot du premier groupe sont additionnés 50 mL d'eau florale le premier jour puis 25 mL

tous les quatre jours jusqu'à la fin des observations. Parallèlement les pots du deuxième groupe sont traités dans les mêmes conditions et avec les mêmes quantités d'eau courante utilisée dans l'obtention de l'eau florale. Le second groupe a servi de lot témoin. Quatre graines sont mises dans chaque pot et quatre pots de chaque groupe sont analysés par cinq jours.

III.2.4.3. Observations

Les observations en ce qui concerne les paramètres à mesurer portent sur la germination, l'émission des racelles, l'élongation et le poids frais de la plantule chez le niébé, l'arachide et le maïs.

Le pourcentage d'inhibition ou de stimulation a été calculé pour chaque paramètre lorsque les effets sont significatifs. Ce pourcentage pour chacun des paramètres est calculé suivant la formule : $i - 100\%$ avec i le pourcentage du paramètre relatif aux traitements rapporté à celui du témoin (Macias F.A., 1993 ; Macias F.A., 1994 ; Macias F.A., 1995).

Les observations sont faites entre cinq et sept jours après l'installation de l'essai selon le cas.

III.2.4.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Statistical Analysis System (SAS). Les données sont analysées par ANOVA (Analysis of Variance). Lorsque les tests statistiques révèlent une différence significative au seuil de 5%, le test de Neuman-Keuls est utilisé pour séparer les moyennes (SAS / STAT User's Guide. 1990).

III.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.3.1. Rendement de l'extraction

Justicia anselliana contient un faible pourcentage d'huile essentielle: $25\mu\text{L} / 100\text{ g} = 25 \cdot 10^{-3} \%$ “ dans sa partie aérienne ” et $20\mu\text{L} / 100\text{ g} = 20 \cdot 10^{-3} \%$ “ dans ses racines ”. L'eau florale obtenue par l'extraction à grande échelle de l'huile est blanchâtre et très odorante.

III.3.2. Composition chimique des huiles essentielles de *J. anselliana*.

Les composés majoritaires de l'huile essentielle de la partie aérienne et des racines de *Justicia anselliana* sont regroupés dans le tableau 6. Cette plante contient en majorité des monoterpènes : 94.56% (β -phellandrène 51.20% ; δ -2-carène 43.36%) dans l'huile de la partie aérienne et seulement 44.34% (δ -3-carène 31.71%, α -phellandrène 12.63%) dans l'huile de la partie souterraine qui contient en plus 38.16% d'un aldéhyde aromatique: le phényl acétaldéhyde et 16.40% d'une cétone aliphatique : 6-méthyl hept-5-ène-2-one. Ces composés appartiennent à des familles chimiques reconnues comme comportant des substances à effets allélopathiques (Rice E. L., 1984; Rizvi S.J.H., 1992; Waller G. R., 1996).

On note ainsi la présence du β -phellandrène dans la partie aérienne qui serait convertit entre autres en l'isomère α -phellandrène dans les racines.

Tableau 6: Composition chimique des huiles essentielles de *Justicia anselliana*.

Composé	RI ^a	Partie Aérienne	Racine
Butyrate de propyle	909	0.33	-
6-méthyl hept-5-ène-2-one	990	-	16.40
δ-2- carène	998	43.36	-
α-Phéllandrène	1005	-	12.63
δ-3-carène	1010	-	31.71
β-Phellandrene	1033	51.20	-
Phényl acétaldéhyde	1045	-	38.16
Dihydrotagetone	1061	0.40	-
Total		95.29	98.90
Non identifié		4.71	1.1

^aRI = indices de rétention sur colonne DB 5.

III.3.3. Pouvoir allélopathique des différents extraits sur le niébé.

Les taux de germination de 100% observés pour toutes les semences utilisées dans les différents tests rassurent quant à la vitalité de ces semences (tableau 7). Le taux admissible de germination préconisé est de 70% (Aho N., 1997).

Tableau 7 : Résultats de l'essai de germination du niébé du maïs et de l'arachide.

Répétitions	Niébé		Arachide		Maïs	
	Nombre de graines germées sur 25	Taux de germination (%)	Nombre de graines germées sur 25	Taux de germination (%)	Nombre de graines germées sur 25	Taux de germination (%)
1 ^{ère} répétition	25	100	25	100	25	100
2 ^{ème} répétition	25	100	25	100	25	100
Moyenne	25	100	25	100	25	100

III.3.3.1 Effets sur la germination et la plantule du niébé.

Les tests effectués aussi bien dans des boîtes de pétri que dans des pots révèlent un pourcentage d'inhibition de germination du niébé de 0,00% par l'eau florale du *Justicia anselliana*.

L'eau florale stimule l'émission des racicules à un taux de 14,78% alors qu'elle inhibe faiblement la longueur (-8,36%) et le poids frais (-1%) de la plantule du niébé de cinq (5) jours (figure 11).

Ces résultats insinuent que l'eau florale de *Justicia anselliana* n'a pas un effet significatif sur la germination ou sur la plantule du niébé de cinq jours à cette dose (tableau 8).

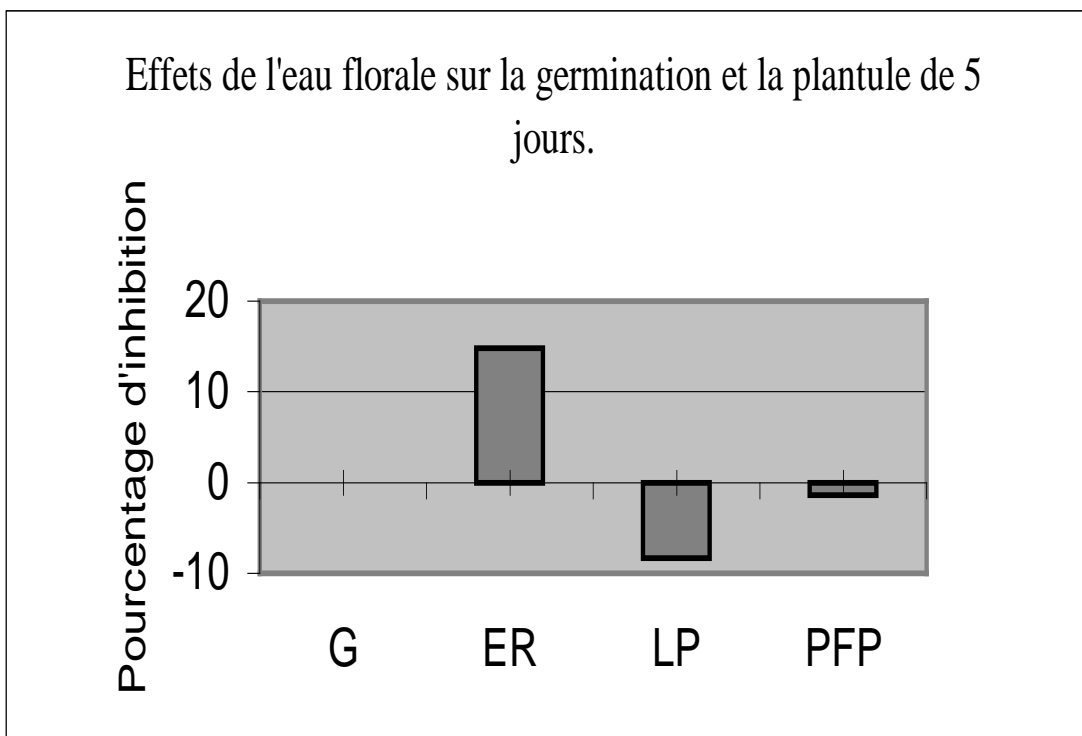


Figure 11: Effets de l'eau florale sur la germination et la plantule de niébé.

G = germination,

ER = émission des radicules ;

LP = longueur de la plantule ;

PFP = poids frais de la plantule.

Tableau 8: Effets de l'eau florale de *J. anselliana* sur la germination et croissance des plantules du niébé

	Log(X ₁ +1)	Log(X ₂ +1)	Longueur moyenne de la plantule (cm)	Poids frais moyen de la plantule (g)
E	0,70 ±0,00 a	1,18 ±0,10 a	12,42 ±1,59 a	0,89 ±0,06 a
EF	0,70 ±0,00 a	1,25 ±0,04 a	11,38 ±1,33 a	0,88 ±0,05 a
CV	11,82%	23,58%	22,81%	9,64%

X₁ : Nombre moyen de graines germées sur 4

X₂ : Nombre moyen de racelles émises par plantule

Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Newman-Keuls.

CV : coefficient de variation

E: eau distillée = essai contrôlé

EF: eau florale

A la concentration de 600 ppm, les huiles essentielles du *Justicia anselliana* inhibent de façon significative la germination du niébé (30,56% pour l'huile de la partie aérienne et 26,04% pour celle des racines). Le même effet d'inhibition est observé à la même dose sur l'émission des racelles (70,08% pour l'huile de la partie aérienne et 65,10% pour celle des racines) et sur le poids frais de la plantule de niébé de 5 jours (Figure 12).

Le test allélopathique des composés purs des huiles essentielles de *Justicia anselliana* à la dose de 600 ppm révèle que le β-phellandrene et le phényl acétaldéhyde présentent les niveaux maximum d'inhibition pour les trois paramètres mesurés : respectivement 86,98% et 73,96% pour la germination ; 88,96 et 91,62 pour l'émission des racelles ; et 60,15 et 47,93 pour le poids frais de niébé de 5 jours. (Figure 12).

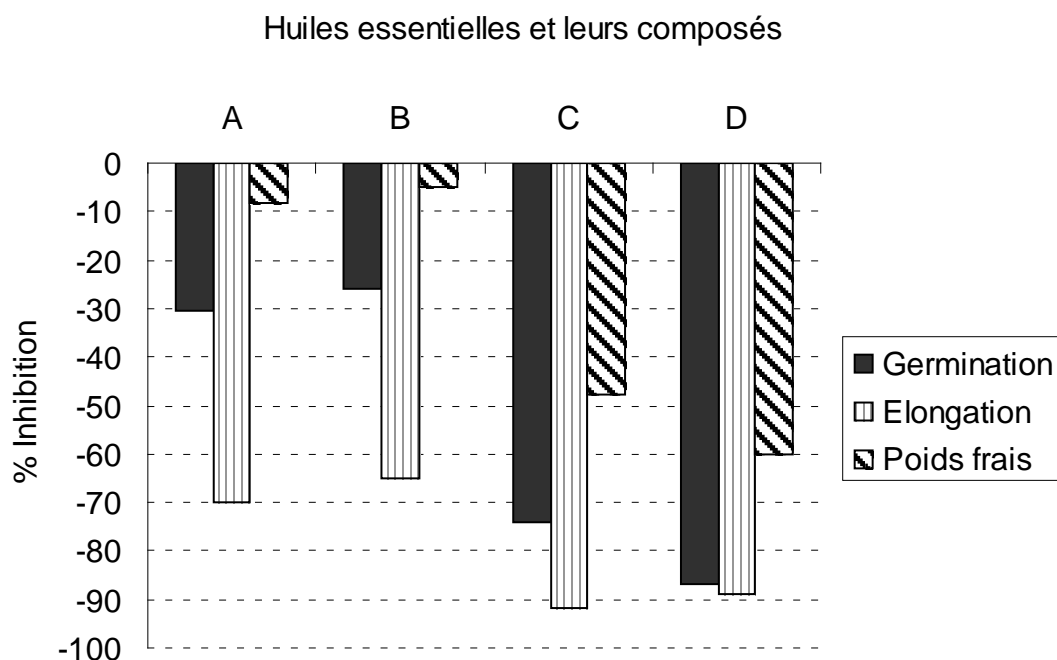


Figure 12 : Effets à 600ppm des huiles essentielles de *Justicia anselliana* et de leurs composés sur la culture des semences du niébé *Vigna unguiculata*.

A- huile de la partie aérienne,

B- huile des racines;

C- Phényl acétaldéhyde;

D- β -Phellandrène.

III.3.3.2 Effets sur la croissance en hauteur du niébé.

L'observation du système racinaire de 20 jours (figure 13) met en évidence une forte inhibition du développement des racines du niébé par l'eau florale.

De 19.19% le cinquième jour et 26.83% le dixième jour, le niveau d'inhibition double au quinzième jour (46.86%) pour atteindre 57.7% le vingtième jour (figure 14). L'inhibition du développement des racines du niébé par l'eau florale devient très significative dans la deuxième semaine du traitement.

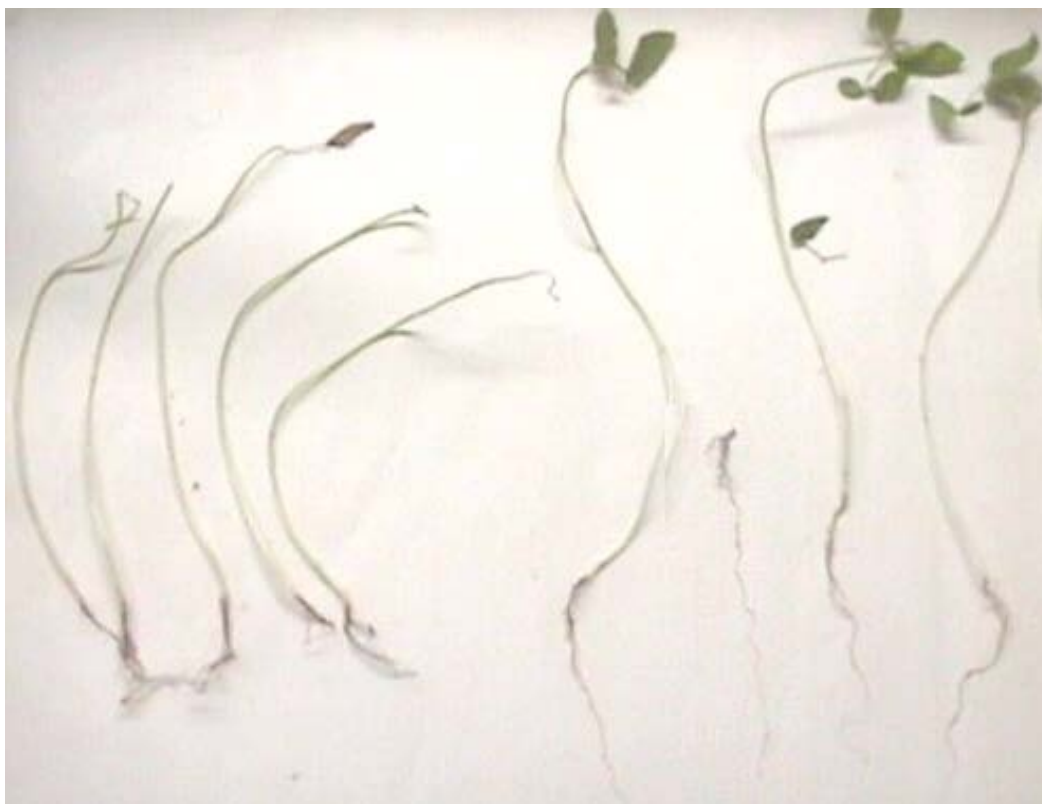


Figure 13: Effets de l'eau florale sur la croissance du niébé de 20 jours. Plantes du niébé traitées avec l'eau florale à gauche et avec l'eau courante à droite.

L'eau florale induit un jaunissement des feuilles du niébé. Celles-ci s'assèchent puis tombent (figure 13). Cet effet d'inhibition négligeable au cinquième jour, faible (8.9%) le dixième jour, devient très intense (66.57%) le quinzième jour. Il s'accroît (82.50%) le dix-septième jour pour atteindre 100% le vingtième jour (figure 15).

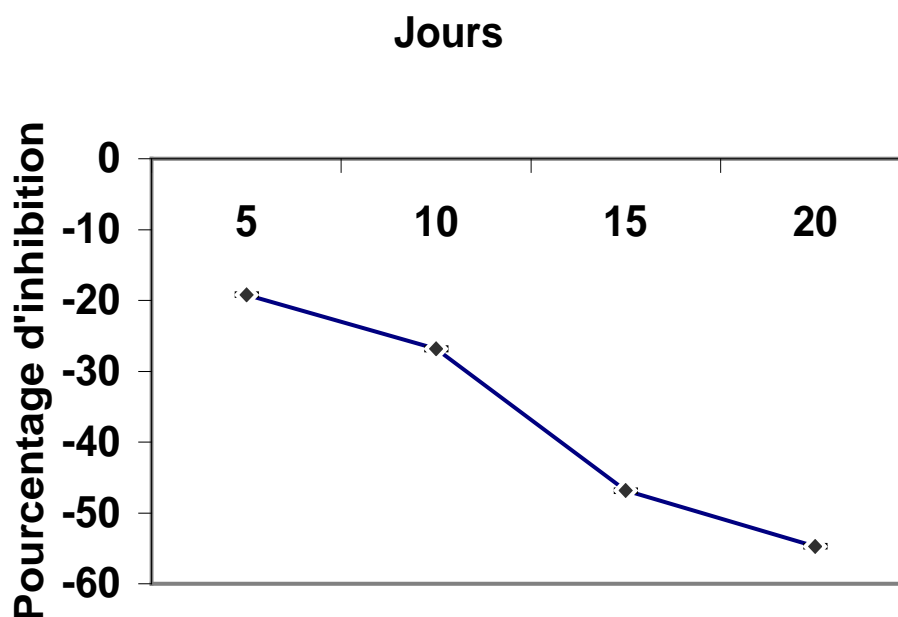


Figure 14: Inhibition de l'émission des racines du niébé entre 0 et 20 jours. n = 4 répétitions.

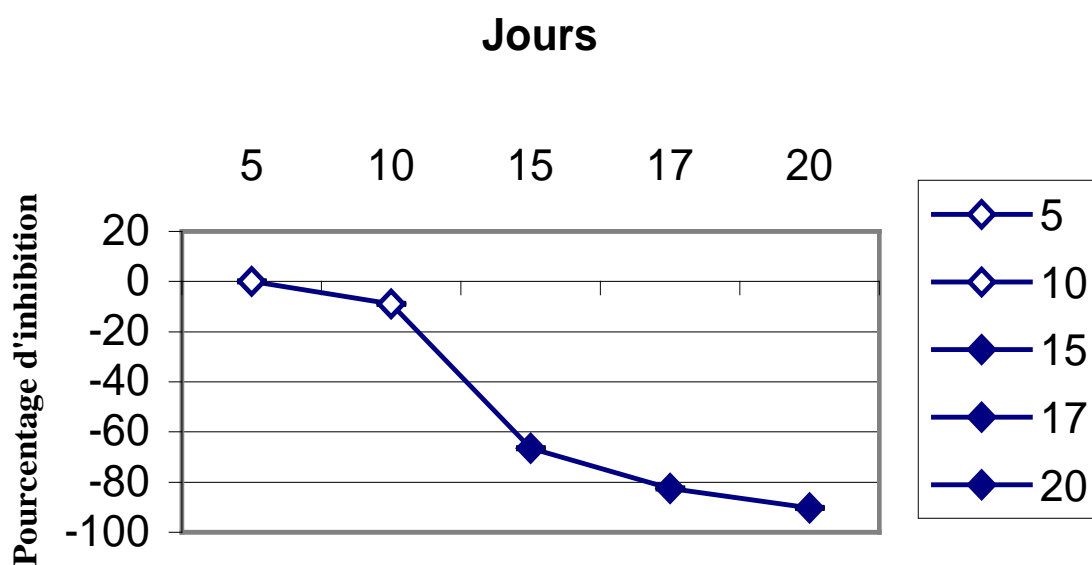


Figure 15 : Inhibition de l'émission des feuilles du niébé entre 5 et 20 jours. Les points noirs sont significativement différents du contrôle. n = 4 répétitions.

L'inhibition du développement des racines du niébé dans la seconde semaine de traitement est accompagnée dans la même période de l'inhibition de l'émission de ses feuilles par l'eau florale. Ces effets allélopathiques seraient dûs aux terpènes (Bernard Reversat F., 1993 ; Moral R.D., 1969) et au phényl acétaldéhyde qui constituent les composés majoritaires des huiles essentielles de *Justicia anselliana* et qui révèlent les niveaux maximums d'inhibition lors des tests allélopathiques dans les boîtes de pétri.

III.3.3.3. Etude de la spécificité des allélochimiques de *Justicia anselliana*.

Contrairement à ce qui est observé au niveau du niébé, les composés volatils de *Justicia anselliana* à faible dose, inhibent la germination du maïs à -15,62% et celle de l'arachide à -9,38% (figure 16).

Au moment où ces composés stimulent l'émission des racelles du niébé à 15,65% et celle de l'arachide à 19,6%, ils inhibent le même paramètre au niveau du maïs (-4,61).

A l'exception de la longueur des plantules sur laquelle l'effet des composés volatils de *J. anselliana* est d'inhibition pour tous les espèces étudiées, on constate une spécificité de l'action de ces composés sur les autres paramètres (figure 16).

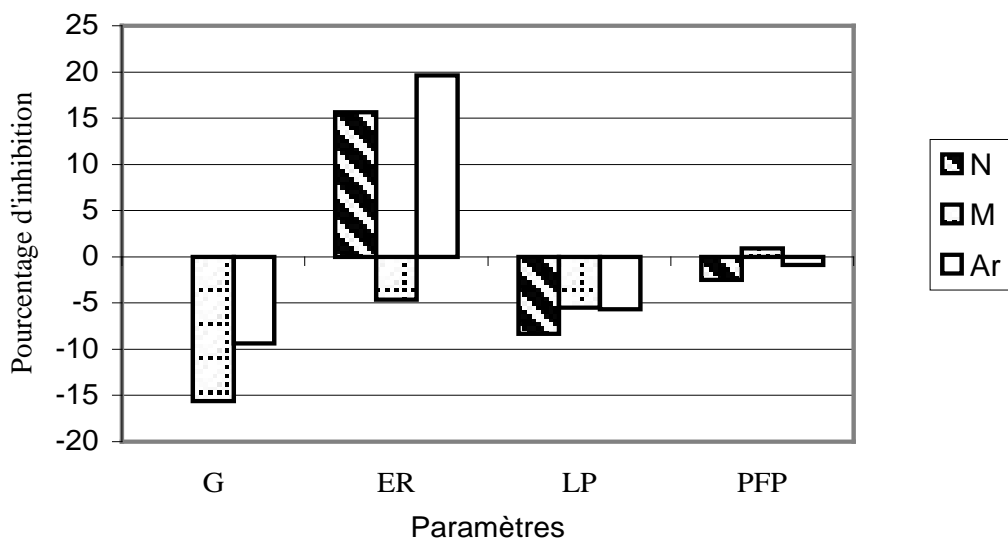


Figure 16: Effets de l'eau florale sur la germination et les plantules du niébé (N), du maïs (M) et de l'arachide (Ar).
G = germination,
ER = émission des radicelles ;
LP = longueur de la plantule ;
PFP = poids frais de la plantule.

Globalement, l'effet des composés volatils de *J. anselliana* sur la plantule du niébé, du maïs et de l'arachide de 5 jours n'est pas très significatif selon le test de Neuman-Keuls (Tableau 9).

Tableau 9: Effets de l'eau florale de *J. anselliana* sur des paramètres de développement chez l'arachide, le maïs et le niébé.

	Log(X ₁ +1)	Log(X ₂ +1)	Longueur moyenne de la plantule (cm)	Poids frais moyen de la plantule (g)
Arachide (Ar)				
EAr	0,70 ± 0,00 a	1,09 ± 0,13 a	5,03 ± 1,08 a	1,17 ± 0,08 a
EFAr	0,66 ± 0,08 a	1,11 ± 0,29 a	4,74 ± 1,29 a	1,16 ± 0,13 a
CV	12,77%	30,14%	31,51%	9,58%
Maïs (M)				
EM	0,69 ± 0,03 a	0,86 ± 0,03 a	25,34 ± 4,37 a	0,81 ± 0,11 a
EFM	0,62 ± 0,13 a	0,85 ± 0,04 a	23,95 ± 3,96 a	0,82 ± 0,09 a
CV	24,28%	4,74%	19,25%	13,22%
Niébé (N)				
EN	0,70 ± 0,00a	1,15 ± 0,05 a	12,32 ± 1,66 a	0,99 ± 0,05 a
EFN	0,70 ± 0,00a	1,21 ± 0,09 a	12,4 ± 1,19 a	0,99 ± 0,09 a
CV	25,68%	25,76%	22,23%	12,21%

X₁ : Nombre moyen de graines germées sur 4

X₂ : Nombre moyen racelles émises par plantule

Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Newman-Keuls.

CV :coefficient de variation

E: eau courante = essai contrôl

EF: eau florale

III.4. CONCLUSION

Le *Justicia anselliana* présente un rendement faible en huile essentielle : 25 μ L / 100mg “dans sa partie aérienne” et 20 μ L / 100mg “dans ses racines”.

Ces huiles essentielles contiennent en majorité des terpènes: β -phellandrène (51,20%) et δ -2-carène (43,36%) dans la partie aérienne; δ -3-carène (31.71%) et α -phellandrène (12.63%) dans la partie souterraine avec un aldéhyde aromatique (le phényl acétaldéhyde à 38,16%) et une cétone aliphatique (la 6-méthyl hept-5-ène-2-one à 16,40%).

En dehors de l'eau florale qui n'a pas un effet remarquable sur la germination du niébé, toutes les huiles du *Justicia anselliana* de même que leurs composants inhibent significativement la germination et les paramètres de croissance de la plantule du niébé. Ces composés ont un effet toxique sur la croissance en hauteur du niébé. Cet effet se traduit par le ralentissement du développement des racines et un jaunissement des feuilles de niébé à partir de la deuxième semaine de traitement.

On note enfin une spécificité de l'action des allélochimiques du *Justicia anselliana* en observant leurs influences sur les paramètres de germination du niébé comparativement au maïs et à l'arachide.

IV. ETUDE DES COMPOSÉS
MOINS VOLATILS DE *JUSTICIA*
ANSELLIANA

IV. ETUDE DES COMPOSÉS MOINS VOLATILS DE *JUSTICIA ANSELLIANA*

IV.1. INTRODUCTION

Bien que la volatilisation soit la principale voie pour la libération des allélochimiques (Kongchuihua et al., 1998), certains peuvent être libérés dans l'environnement à travers la décomposition des résidus (Chavez et Frans, 1996), les exsudats racinaires et le lessivage sur les parties aériennes (Lance, 1996). Ces voies favorisent la libération des allélochimiques moins volatils. Nous avons alors décidé d'étudier les composés moins volatils de *Justicia anselliana* afin d'élucider leur propriété allélopathique sur le niébé (*Vigna unguiculata*). Pour cela, il était avant tout nécessaire de faire un screening phytochimique afin d'identifier les grandes familles chimiques de *Justicia anselliana*, puis d'évaluer l'effet allélopathique des extraits bruts de différentes parties de *Justicia anselliana* obtenus à partir de différents solvants. Cette deuxième étape permettra de déceler la partie de la plante qui est plus riche en allélochimiques et d'identifier l'extrait brut le plus actif sur le niébé. Une fois l'extrait le plus actif identifié, nous allons procéder à son fractionnement par des solvants de polarités croissantes. L'évaluation des effets allélopathiques de ces fractions permettra d'avoir une idée générale sur la polarité des composés actifs de l'extrait brut. Nous utiliserons ensuite ces informations pour déterminer les systèmes de solvants pour les différents fractionnements bio-guidés de l'extrait brut le plus actif. Le fractionnement bio-guidé est une suite de fractionnements à partir de l'extrait brut au cours desquels la ou les fraction(s) les plus active(s) est ou sont ensuite fractionnée(s) jusqu'à l'obtention de composés purs. Le fractionnement a été guidé dans ce travail par l'analyse des effets allélopathiques des fractions sur le *Vigna unguiculata* (niébé). Ce procédé a l'avantage d'orienter l'étude phytochimique vers des composés ayant l'activité biologique voulue. L'activité cytotoxique des composés purifiés sera enfin évaluée sur les cellules humaines et de souris afin de rechercher l'impact des allélochimiques de *Justicia anselliana* sur l'environnement d'une part et de vérifier si leur activité allélopathique est due à une toxicité d'autre part.

IV.2. IDENTIFICATION DE L'EXTRAIT BRUT LE PLUS ACTIF DE LA PLANTE

IV.2.1. Introduction

La première étape d'une étude phytochimique est de connaître les grandes classes de composés du métabolisme secondaire que contient la plante à étudier. Il s'agira ici de faire le screening phytochimique de la plante et des extractions par différents solvants de différentes parties de *Justicia anselliana*. Une comparaison des activités allélopathiques de ces différents extraits bruts permettra d'identifier l'extrait brut le plus actif qui sera soumis à des fractionnements futurs en vue de l'isolement et l'identification des allélochimiques de *Justicia anselliana*.

IV.2.2. Matériels et méthodes

IV.2.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est la partie aérienne d'une part et les racines d'autre part de la plante récoltées dans la vallée de l'ouémé (Dannou), au Sud du Bénin. Après séparation de la partie aérienne des racines, chaque partie a été séchée pendant deux semaines dans une chambre, à l'abri de la lumière. Elle est ensuite pulvérisée au moulin et stockée dans un conservateur à température ambiante.

IV.2.2.2. Criblage phytochimique

La première étape dans l'analyse de la composition chimique d'une plante consiste à déterminer ses principales classes de métabolites secondaires. Cette information est essentielle pour la sélection de la méthode d'extraction et des différentes méthodes chromatographiques à appliquer. De plus, la comparaison des résultats du criblage aux données chimiotaxonomiques sur les plantes de ce genre peut donner des précisions sur le type de principes actifs rencontrés.

Le criblage phytochimique est une analyse chimique qualitative basée sur des réactions de colorations ou de précipitations plus ou moins spécifiques à chaque classe de principes actifs (Tableau 10). Le détail de ces tests ainsi que la composition des réactifs sont repris dans

l'ouvrage de P.J Houghton : "*Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts*" (Houghton, 1998).

Tableau 10. Réactifs spécifiques au criblage phytochimique.

Classes de principes actifs	Réactif spécifique et Réaction
Alcaloïdes	-Dragendorff (iodobismuthate de potassium) → précipité orange -Mayer (iodomercurate de potassium) → précipité jaunâtre
Tanins	-FeCl ₃ → coloration bleu-foncée
Flavonoïdes	-Shinoda (réaction à la cyanidine) → coloration orange-rouge
Anthocyanes	-Coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu alcalin
Leucoanthocyanes	-Alcool chlorhydrique (EtOH 50°/HCl _{cc} 2:1) → coloration rouge cerise
Dérivés quinoniques	-Bornträger (réaction entre cycles quinoniques en milieu NH ₄ OH) → coloration rouge violacée
Saponosides	-Détermination de l'indice mousse (positif si IM>100)
Stéroïdes et Terpènes	-Liebermann-Burchard (Anhydride acétique-H ₂ SO _{4cc} 50:1) → coloration violette -Kedde (acide dinitrobenzoïque 1% dans l'EtOH + NaOH 1N 1:1) → coloration rouge pourpre (cardénolides)
Dérivés cyanogénétiques	-Guignard (Papier imprégné d'acide picrique) → coloration marron
Mucilages	-Etude de la viscosité des infusés et décoctés
Huiles essentielles	-Entraînement à la vapeur -Odorat

IV.2.2.3. Préparation d'extraits bruts

* Macération :

Les macérations sont faites d'une part avec 100 g de poudre dans 1000 ml d'éthanol pendant 72 h et d'autre part avec 50 g de poudre dans 500 ml d'eau pendant 24 h. Les extraits bruts alcooliques et aqueux sont obtenus après filtration et séchage des filtrats à l'étuve à 50°C.

* Percolation :

Cette extraction a pour but d'extraire la majeure partie des principes solubilisables contenus dans une drogue végétale ou animale par un épuisement progressif de cette drogue au moyen

de solvants appropriés. Cette opération consiste à faire passer le solvant lentement et régulièrement à travers la drogue convenablement pulvérisée et disposée en couche suffisamment épaisse (A. Denoël, 1971). Nous avons laissé macérer 100 g de poudre dans 500 mL d'éthanol pendant 24 heures. Le mélange est ensuite placé dans le percolateur.

1000 mL de solvant sont utilisés avec un débit de 1 mL / min.

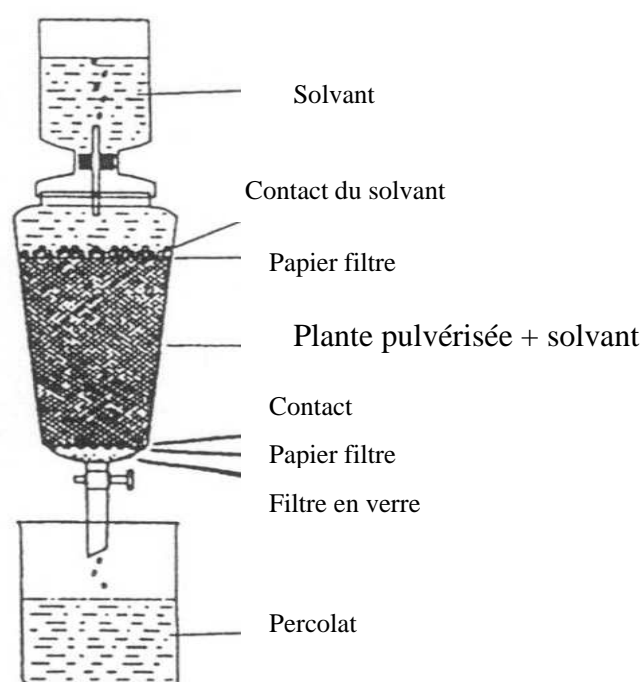


Figure 17 : schéma d'un percolateur.

Les extraits aqueux et alcooliques de la partie aérienne et des racines obtenus par ces différentes méthodes ont été utilisés pour les tests alléopathiques.

IV.2.2.4. Tests allélopathiques.

Les tests allélopathiques ont été effectués selon la méthode décrite en III.2.4

Les solutions testées sont obtenues par dissolution des extraits bruts dans l'eau distillée et rapportés à 25%, 15%, 10%, 5% et 1% du matériel végétal séché. Les masses d'extrait brut dissous dans 5 mL d'eau distillée sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11: Masse d'extrait brut dissous dans 5 mL d'eau distillée.

Pourcentage (%)*	Masse d'extrait brut de partie (g)			
	Aérienne (A)		Souterraine (S)	
	alcoolique	aqueux	alcoolique	aqueux
15%	0,108	0,142	0,203	0,139
10%	0,072	0,095	0,081	0,093
5%	0,036	0,047	0,040	0,046
1%	0,007	0,009	0,008	0,009

* Pourcentage rapporté à la masse du matériel végétal séché.

IV.2.3. Résultats et discussions

IV.2.3.1. Analyses Phytochimiques de *Justicia anselliana*

Les tests du criblage phytochimique se basent sur une série de réactions d'identification caractéristiques pour chaque classe de composés et les résultats permettent d'orienter le choix des méthodes de fractionnement. Notons qu'aucun résultat antérieur d'analyse phytochimique n'est disponible sur le *Justicia anselliana*. Afin de localiser les grandes familles chimiques de cette plante, le criblage phytochimique a été effectué sur sa partie aérienne d'une part et ses racines d'autre part. Les résultats sont consignés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Résultats du criblage phytochimique de la partie aérienne et des racines de *Justicia anselliana*.

CLASSE DE PRINCIPE ACTIF	RESULTATS	
	Partie Aérienne	Racines
Alcaloïdes	-	-
Tanins galliques	+++	-
Tanins catéchiques	++	-
Flavonoïdes	+++ (flavones)	++
Anthocyanes	-	++
Leucoanthocyanes	++	++
Dérivés quinoniques	-	-
Saponosides	-	-
Stéroïdes et terpènes	+	-
Dérivés cyanogénétiques	-	-
Mucilages	-	-
Huiles essentielles	+	+

-(absence ou non révélé) ; + (présence) ; ++ (abondant) ; +++(très abondant)

Ces résultats révèlent la présence de flavonoïdes, de leucoanthocyanes et d'huiles essentielles aussi bien dans la partie aérienne que dans les racines de *Justicia anselliana*. Les tanins galliques et catéchiques sont spécifiquement retrouvés dans sa partie aérienne avec les stérols et triterpènes, tandis que les anthocyanes sont seulement révélés dans ses racines.

(Tableau 12). Ces familles de composés ont été reconnues comme comportant des substances à effets allélopathiques (Putnam, 1985 ; Rice, 1984 ; Rizvi, 1992 ; Waller, 1996).

Même si le criblage phytochimique nous permet d'avoir une bonne indication sur les classes de composés présents dans la plante, il est toutefois important de souligner que la sensibilité et la limite de détection de ces essais ne sont pas connue. Ces résultats sont donc à considérer uniquement comme une première indication. Des essais plus poussés seraient nécessaires pour identifier toutes les classes de métabolites secondaires présents dans la plante.

IV.2.3.2. Rendement des extractions et pouvoir allélopatrique des différents extraits sur le niébé.

Les rendements obtenus par différentes méthodes d'extractions et calculés à partir de trois extractions indépendantes sont consignés dans le tableau 13. Il apparaît que la percolation présente un rendement un peu plus élevé que la macération pour l'extraction éthanolique des deux parties de *Justicia anselliana*, puisque le solvant reste moins en contact avec la poudre de plante, ce qui évite les effets de saturation. L'extraction éthanolique des racines fournit un rendement plus élevé que celle de la partie aérienne pour les deux techniques utilisées. Par contre les extraits aqueux des deux parties de *Justicia anselliana* sont obtenus avec environ le même rendement (≈ 9.42 g à partir de 50 g de matériel végétal).

Tableau 13: Rendements en grammes des extractions pour 50g de matériel végétal.

Plante	Extrait		
	Ethanolique		Aqueux
	Percolation	Macération	Macération
Partie Aérienne (50g)	7.25	6.19	9.54
Racines (50g)	8.12	7.91	9.31

Ces différents extraits ont été testés pour leurs propriétés allélopatriques sur le niébé. Le but de ces tests est d'identifier l'extrait brut le plus actif sur le niébé.

Excepté le traitement de l'extrait aqueux de la partie aérienne à 15% (A1), les extraits aqueux de la partie aérienne et des racines de *Justicia anselliana* aux différentes concentrations (10%, 5% et 1%) n'ont pas un effet significatif sur le nombre de graines germées (Tableau 14). Par contre les effets des traitements sur l'émission des radicules, la longueur et le poids frais de la plantule se sont révélés significativement différents des témoins. Toutefois le test de Newman-Keuls ne montre pas une séparation assez nette des traitements.

Les effets significatifs d'inhibition de la germination ont été obtenus avec les extraits alcooliques de la partie aérienne à 15 et 10 % (Tableau 15).

Tableau 14: Effets des extraits aqueux d'organes aériens et souterrains séchés de *J. anselliana* sur la croissance des plantules du niébé.

	Log(X_1+1)		Log(X_2+1)		Longueur moyenne de la plantule (cm)		Poids frais moyen de la plantule (g)	
E	0,70	±0,00 a	1,18	±0,10 ab	12,42	±1,59 ab	0,89	±0,06 a
A1	0,52	±0,22 b	0,91	±0,20 ab	8,46	±2,18 cd	0,76	±0,10 b
A2	0,69	±0,03 a	1,05	±0,19 ab	9,79	±3,37abcd	0,80	±0,10 ab
A3	0,70	±0,00 a	0,94	±0,38 ab	12,08	±3,77 abc	0,81	±0,09 ab
A4	0,70	±0,00 a	1,09	±0,14 ab	13,00	±3,10 a	0,91	±0,06 a
S1	0,62	±0,07a	0,81	±0,36 b	7,66	±2,15 b	0,79	±0,09 ab
S2	0,64	±0,05a	0,91	±0,20 ab	9,12	±1,74 bcd	0,79	±0,05 ab
S3	0,70	±0,00 a	0,88	±0,38 ab	10,76	±2,60 abcd	0,82	±0,08 ab
S4	0,69	±0,03 a	1,21	±0,05a	13,48	±1,49 a	0,91	±0,03 a
CV	11,82%		23,58%		22,81%		9,64%	

X_1 : Nombre moyen de graines germées sur 4

X_2 : Nombre moyen radicules émises par plantule

Les moyennes suivies de la même lettre (a, b, c ou d) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Newman-Keuls.

CV : coefficient de variation

E = eau distillée = essai contrôlé;

A1, A2, A3 et A4 : dilutions de l'extrait aqueux de la partie aérienne respectivement à 15, 10, 5 et 1% ;

S1, S2, S3 et S4 : dilutions de l'extrait aqueux de la partie souterraine respectivement à 15, 10, 5 et 1%.

Tableau 15: Effets des extraits alcooliques d'organes aériens et souterrains séchés de *J. anselliana* sur des paramètres de développement chez le niébé.

	Log(X ₁ +1)	Log(X ₂ +1)	Longueur moyenne de la plantule (cm)	Poids frais moyen de la plantule (g)
E	0,70 ±0,00 a	1,12 ±0,09 a	10,93 ±1,27 a	0,86 ±0,06 a
A1 _{OH}	0,39 ±0,18c	0,24 ±0,41 d	5,44 ±1,39 cd	0,72 ±0,04 cd
A2 _{OH}	0,57 ±0,14 b	0,33 ±0,35 cd	4,67 ±0,93 d	0,70 ±0,08 d
A3 _{OH}	0,69 ±0,03 a	0,76 ±0,32 ab	7,49 ±0,93 bc	0,81 ±0,06 abc
A4 _{OH}	0,69 ±0,03 a	1,10 ±0,13 a	8,88 ±1,67 b	0,82 ±0,05 ab
S1 _{OH}	0,70 ±0,00 a	0,46 ±0,50 bcd	4,54 ±0,20 d	0,68 ±0,08 d
S2 _{OH}	0,70 ±0,00 a	0,67 ±0,48abc	6,98 ±2,29bcd	0,74 ±0,08 bcd
S3 _{OH}	0,69 ±0,03 a	1,06 ±0,10 a	11,31 ±2,26 a	0,85 ±0,06 a
S4 _{OH}	0,70 ±0,00 a	1,05 ±0,08 a	11,56 ±2,9 a	0,78 ±0,09abcd
CV	12,47%	42,12%	23,24%	9,42%

X₁ : Nombre moyen de graines germées sur 4

X₂ : Nombre moyen racelles émises par plantule

Les moyennes suivies de la même lettre (a, b, c ou d) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Newman-Keuls.

CV : coefficient de variation

E = eau distillée = essai contrôl ;

A1_{OH}, A2_{OH}, A3_{OH} et A4_{OH} : dilutions de l'extrait éthanologique de la partie aérienne respectivement à 15, 10, 5 et 1% ;

S1_{OH}, S2_{OH}, S3_{OH} et S4_{OH} : dilutions de l'extrait éthanologique de la partie souterraine respectivement à 15, 10, 5 et 1%.

Globalement, les extraits aqueux de *Justicia anselliana* à basses concentrations, ont des effets non significatifs sur le niébé selon le test de Newman-Keuls ; l'extrait brut le plus actif est l'extrait éthanologique de la partie aérienne.

IV.2.4. Conclusion

Le criblage phytochimique a révélé la présence de flavonoïdes, de leucoanthocyanes et d'huiles essentielles aussi bien dans la partie aérienne que dans les racines du *Justicia anselliana*. Les tanins galliques et catéchiques sont spécifiquement retrouvés dans sa partie aérienne avec les stérols et triterpènes, tandis que les anthocyanes sont seulement révélés dans ses racines.

Les extraits aqueux et éthanoliques de la partie aérienne et des racines ont été testés pour leurs pouvoirs allélopathiques sur le niébé. Parmi les quatre extraits testés, l'extrait éthanolique de la partie aérienne est le plus actif. Les allélochimiques de *Justicia anselliana* sont donc plus concentrés dans sa partie aérienne et pourraient faire partie des grandes familles chimiques révélées précédemment par le criblage phytochimique. L'extrait éthanolique de cette partie aérienne mérite des fractionnements guidés par des tests allélopathiques en vue de la purification des allélochimiques de la plante.

IV.3. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE.

IV.3.1. Introduction

Une fois l'extrait le plus actif sélectionné, nous allons procéder dans cette partie à une extraction plus importante par la méthode de percolation qui, comme nous l'avons montré conduit à un meilleur rendement. 950 g de la partie aérienne de *Justicia anselliana* récolté dans la vallée de l'Ouémé à Dannou ont donné, 137.75 g d'extrait éthanolique brut, conservés à basse température (5 et 10 °C) pour usage ultérieur.

La deuxième étape de cette partie consistera en une étude préliminaire de l'extrait éthanolique qui débouchera sur l'identification des allélochimiques moins volatils de cette plante. Pour cela on fera des fractionnements liquide-liquide de l'extrait éthanolique à température ambiante et au Soxhlet avec des solvants de différentes polarités. Une comparaison des activités allélopathiques des différentes fractions ne permettra pas certes de déterminer la nature et la polarité de tous les composés actifs mais donnera des informations pour les fractionnements futurs en vue de leur identification.

IV.3.2. Matériel et méthodes

IV.3.2.1. Fractionnements

IV.3.2.1.1. Fractionnement liquide-liquide à température ambiante.

C'est une méthode de séparation des composés d'un mélange basé sur leur coefficient de partage entre liquides non miscibles. Elle est largement utilisée actuellement surtout par les appareils de HSCCC (High Speed Counter-Current Chromatography). Pour ce travail, nous avons fait une séparation par décantation eau - méthanol (50 -50) et dichlorométhane dans une ampoule à décanter (figure .18). L'extrait éthanolique est dissous dans un mélange eau-méthanol puis extrait 3 fois avec 50ml dichlorométhane.

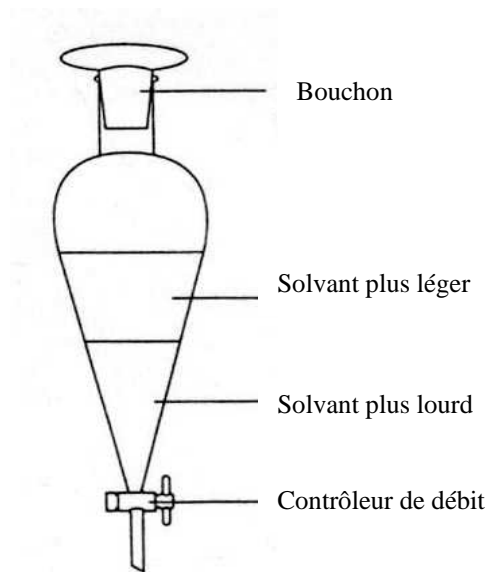


Figure.18 : Schéma d'une ampoule à décanter.

IV.3.2.1.2. Fractionnement liquide- liquide au Soxhlet.

En vue d'expérimenter une autre méthode de séparation (Rawat M.S.M., 1998), nous avons effectué le fractionnement Liquide – liquide de l'extrait éthanolique au Soxhlet.

C'est une méthode d'extraction qui est aussi utilisée pour le fractionnement d'extrait brut dans un appareil de Soxhlet (Figure.16). Le solvant sous l'effet de la chaleur distille et est condensé au niveau du réfrigérant. Les gouttelettes formées retombent dans une ampoule où se trouve une cartouche en cellulose contenant l'extrait éthanolique à fractionner. Le solvant extrait les composés solubles puis retourne dans le ballon via un système de siphon. Le solvant chauffé distille à nouveau et le cycle recommence. Ce système donne une sorte de macération répétée avec renouvellement de solvant, et permet aussi d'obtenir les portions de composés solubles de la plante dans un petit volume de solvant. Le principal risque est la perte des composés thermolabiles. 30g d'extrait éthanolique sont successivement extraits avec de l'hexane (HPLC Grad ; Fisher Scientific), du chloroforme (HPLC Grad ; Fisher Scientific), de l'acétate d'éthyle (HPLC Grad ; Fisher Scientific) et du méthanol (redistillé au Laboratoire). Chaque extraction a duré 4 heures et le solvant est remplacé par un solvant de polarité supérieure. Après évaporation du solvant organique à pression réduite et à l'évaporateur rotatif, la fraction obtenue est pesée et conservée à basse température (5 – 10 °C).

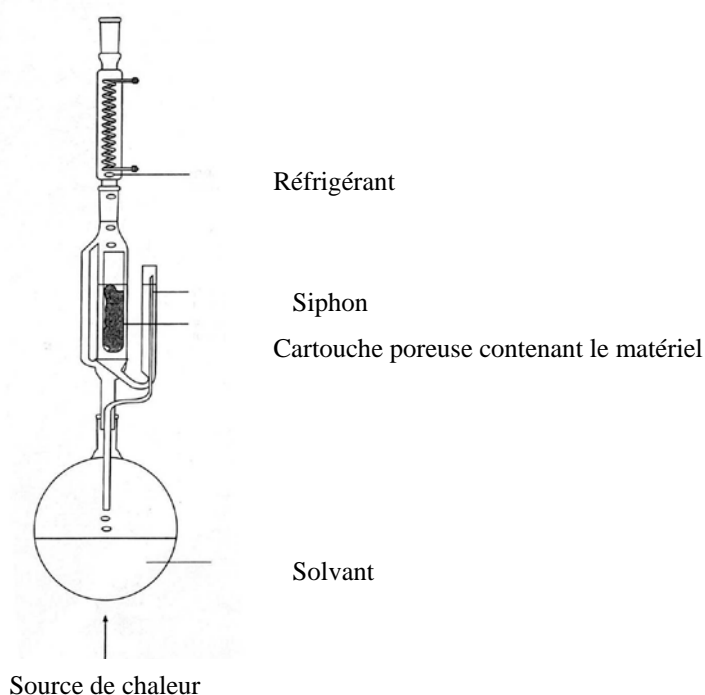


Figure.19 : schéma d'un soxhlet

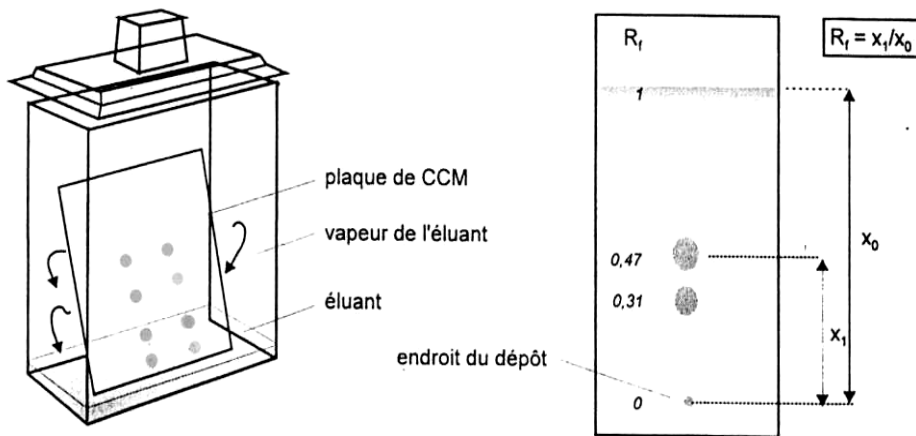
Les fractions obtenues par ces différentes méthodes ont été analysées par CCM puis GC/MS pour l'identification préliminaire de quelques principes actifs et par ailleurs utilisées pour des tests allélopathiques et cytotoxiques. Ces tests permettront d'identifier la fraction la plus active pour ses propriétés allélopathiques sur le niébé et de vérifier si la fraction la plus allélopathique est aussi active sur des cellules de l'homme et de la souris.

IV.3.2.2. Analyse des fractions de l'extrait éthanolique.

IV.3.2.2.1. Analyse par CCM

Avant de poursuivre les purifications de l'extrait éthanolique, il était essentiel de développer une méthode d'analyse simple et rapide pour étudier la composition des différents extraits et

fractions de la plante. La technique la plus fréquemment utilisée pour l'analyse des extraits de plante est la chromatographie sur couche mince (CCM). Cette technique offre l'avantage de sa rapidité, de son faible coût et permet une visualisation directe de la séparation des composés (Figure 20).



X_0 = hauteur au front de solvant ; X_1 = hauteur au Spot

Figure. 20 : schéma d'une cuve de CCM.

Les fractions et extraits seront analysés par CCM afin d'étudier leur composition et de mettre en évidence les principales classes de principes actifs à l'aide de réactifs plus ou moins spécifiques.

Les analyses par CCM remplaceront les détecteurs à la sortie des colonnes et les fractions seront rassemblées en fonction de leur profil chromatographique.

Finalement, l'analyse par CCM des produits isolés nous donnera une indication sur leur pureté.

L'extrait éthanolique est un extrait susceptible de contenir différents types de molécules : terpènes, stéroïdes, saponosides, flavonoïdes, hétérosides, composés phénoliques etc. Pour certains d'entre eux, il existe relativement peu de révélateurs spécifiques en CCM. Nous avons donc décidé d'utiliser des révélateurs courants tels que l'anisaldéhyde sulfurique, la vanilline sulfurique pour les composés terpéniques et autres molécules proches. Pour identifier les composés polaires, nous avons pris le Réactif de NE/PEG (Natural product/polyethylene glycol reagent) et le $FeCl_3$ (Wagner H et Bladt. S, 1995). Ce révélateur est assez spécifique des dérivés phénoliques et acides phénoliques. Pour les alcaloïdes, nous avons choisi le réactif de Dragendroff (Wagner H et Bladt S., 1995). Pour les autres composés, nous avons utilisé l'acide sulfurique à 10%, suivi d'un chauffage.

Les plaques utilisées sont des plaques de silice normale et la détection des bandes des différents composés s'est faite d'abord par visualisation directe des bandes colorées, ensuite sous UV (254 et 366 nm) et finalement à l'aide des révélateurs précités.

Pour chaque échantillon analysé, 10 µl d'une solution à 5 mg/ml sont déposés sur la plaque. La méthode la plus fréquente était celle impliquant l'utilisation de plaques de silice normale avec comme éluant un mélange de Toluène-Acétate d'éthyle-Méthanol (80:18:2) et comme révélateur, l'anisaldéhyde sulfurique. Cet éluant est couramment indiqué pour la séparation des terpènes et stéroïdes.

D'autres méthodes ont été développées pour l'analyse de produits plus polaires ou pour l'analyse d'une classe spécifique de principes actifs. La liste des différentes méthodes de CCM utilisées au cours de ce travail est reprise ci-dessous.

▪ Plaques :

- TLC Silica gel 60 F_{254S} Merck®.
- RP-8 F_{254S} Merck®.
- RP-18 F_{254S} Merck®.
- Cellulose F Merck®.
- Alumine 60 F_{254S} Merck® neutre (type E).
- Préparative Silicagel sans indicateur de fluorescence (2 mm) Merck®.

▪ Phases mobiles :

- Composés apolaires : Toluène-Acétate d'éthyle -Méthanol (80-18-2) (système 1)
- Composés polaires :
 - * Acétone – butanone – acide formique (10 - 7 – 1) (Système 2)
 - * Acétate d'éthyle – acide formique – eau (6-1-1) (système 3)
 - *Acétate d'éthyle- acide acétique glacial- acide formique- eau (100-11-11-5) (Système 4).
 - *n-Butanol-acide acétique-eau (63-10-27) (Système 5)
- Alcaloïdes :

- *Chloroforme- Méthanol -Ammoniaque 10 % (80-40-1.5) (système 6)
- *Toluène-Acétate d'éthyle - Diéthylamine (70-20-10) (système 7)
- * Hexane-Acétate d'éthyle- Méthanol (10-5-2) ou (10-5-1) (système 8, 9)
- * Hexane-Acétate d'éthyle (10-5) (système 9)
- * Benzène- Acétate d'éthyle- Acide formique (36-12-5) (système 10)

▪ Révélateurs :

- Anisaldéhyde sulfurique :
 - ♦ Préparation : EtOH *p*-anisaldéhyde-Acide Acétique (90-5-1) + 5% H₂SO₄ ajouté extemporanément. Après pulvérisation, chauffage 5 min à 105°C.
 - ♦ Détection : Spots colorés (mauve-rose-bleu) ou sous UV.
 - ♦ Classes de molécules mises en évidence : terpènes, stéroïdes, saponosides ...

- Acide sulfurique 10 % :
 - ♦ Préparation : 10 ml H₂SO₄ dans 80 ml d'eau et 20 ml d'éthanol. Après pulvérisation, chauffage 5 min à 105°C.
 - ♦ Détection : Spots colorés (noir-brun).
 - ♦ Classes de molécules mises en évidence: la plupart des composés organiques

- Vanilline sulfurique :
 - ♦ Préparation : Vanilline (1% dans EtOH) + H₂SO₄ (10 % dans EtOH) en mélange 1:1. Après pulvérisation, chauffage 5 min à 105°C.
 - ♦ Détection : Spots colorés (mauve-rose-bleu) ou sous UV
 - ♦ Classes de molécules mises en évidence : terpènes, stéroïdes, saponosides, tanin condensés ...

- Réactif de Dragendorff
 - ♦ Préparation : Solution a : 0.85 g de nitrate de bismuth dans 10 ml d'acide acétique et 40 ml d'eau. Solution b : 8 g d'iodure de potassium dans 30 ml d'eau. Solution stock : Solution a-Solution b (1:1). Solution de pulvérisation : 1 ml de solution stock + 2 ml d'acide acétique + 10 ml d'eau.
 - ♦ Détection : Spots jaunâtres

- ♦ Classes de molécules mises en évidence : alcaloïdes

- Réactif de NP/PEG (Natural product/ polyethylene glycol reagent)
- ♦ Préparation : mélange de 5% de polyéthylène glycol 600 dans de l'éthanol et de réactif de Neu (dissoudre 1g de diphénylborate de 2-aminoéthyle) dans 100ml de méthanol à 50 :50
- ♦ Détection : spot Jaune à orange ou bleu, UV 365nm
- ♦ Classes de molécules mises en évidence : Flavonoïdes et acides phénols

- Réactifs FeCl₃
- ♦ Préparation : 10% d'une solution aqueuse de FeCl₃
- ♦ Détection : spot Jaune à orange ou violet à vert dans le visible, UV 365nm
- ♦ Classes de molécules mises en évidence : Flavonoïdes, acides phénols et tanins

IV.3.2.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectroscopie de masse permet de séparer les composés d'un mélange selon leur polarité et leur capacité de se volatiliser puis d'identifier leur structure par analyse de leur spectre de masse.

* Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les principaux avantages sont : son extrême sensibilité, sa polyvalence, la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et les possibilités d'automatisation, qui augmente encore son intérêt. La séparation sur colonne se fait sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou des solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés thermostables et suffisamment volatils. Un appareil de CPG comprend schématiquement trois modules spécifiques : un injecteur, une colonne et un détecteur. Dans le cas de couplage de la CPG à la MS, la colonne est directement reliée à la chambre d'ionisation de la MS et le tout est réuni

dans un bâti unique. La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur (dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé l'hélium). Les débits, contrôlés avec précision, permettent une bonne répétitivité des temps de rétention. L'analyse débute à l'instant où on introduit une petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de porter cet échantillon à l'état gazeux et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Cette dernière se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire (les phases stationnaires commerciales sont assimilées généralement à des liquides, rarement à des solides). La colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Dans le cas du GC/MS la phase gazeuse en aval de la colonne passe dans la chambre d'ionisation du MS (voir figure 21).

* La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des espèces atomiques ou moléculaires individuelles de l'échantillon analysé mais aussi de fragment de ces molécules, ce qui permet de recueillir des informations sur sa structure. Les perfectionnements successifs ainsi que l'apparition de nouvelles techniques d'ionisation, a fait de cette méthode celle qui a le plus vaste champ d'application en analyse par sa polyvalence et par son extrême sensibilité (Rouessac F, Rouessac A., Ourisson G, 1998).

* Principe

Après élution par le gaz vecteur, les molécules sous forme gazeuse sont ionisées afin de soumettre les espèces chargées qui en résultent à l'action d'un champ électrique et/ou magnétique selon le type d'appareil. L'étude des trajectoires suivies, dans une enceinte où règne un vide poussé (10^{-4} Pa), permet de déterminer le rapport masse/charge des ions donc éventuellement leur nature (de Hoffmann E., 1994).

Le spectromètre de masse réalise une série d'opérations successives que l'on peut classer de la manière suivante :

1. Ionisation : l'espèce étudiée est vaporisée et ionisée dans la source de l'appareil par un des nombreux procédés existants (ex : MALDI, FAB, electrospray, ...) (pour l'ionisation de notre échantillon, nous avons

utilisé la méthode de l'impact électronique).

2. Accélération : aussitôt formés, les ions sont extraits de la source, focalisés et accélérés par des lentilles électroniques, pour accroître leur énergie cinétique.
3. Séparation : les ions sont "filtrés" suivant leur rapport masse/charge par l'analyseur, certains appareils combinant plusieurs types d'analyseurs en série (ex : analyseur quadripolaire, ion trap, ...).
4. Détection : après séparation les ions terminent leur course en venant frapper un détecteur qui quantifie les charges électriques (ex : multiplicateurs d'électrons à dynodes séparées, multiplicateurs d'électrons à dynode continue,...).
5. Présentation du spectre de masse issu du signal du détecteur de l'appareil.

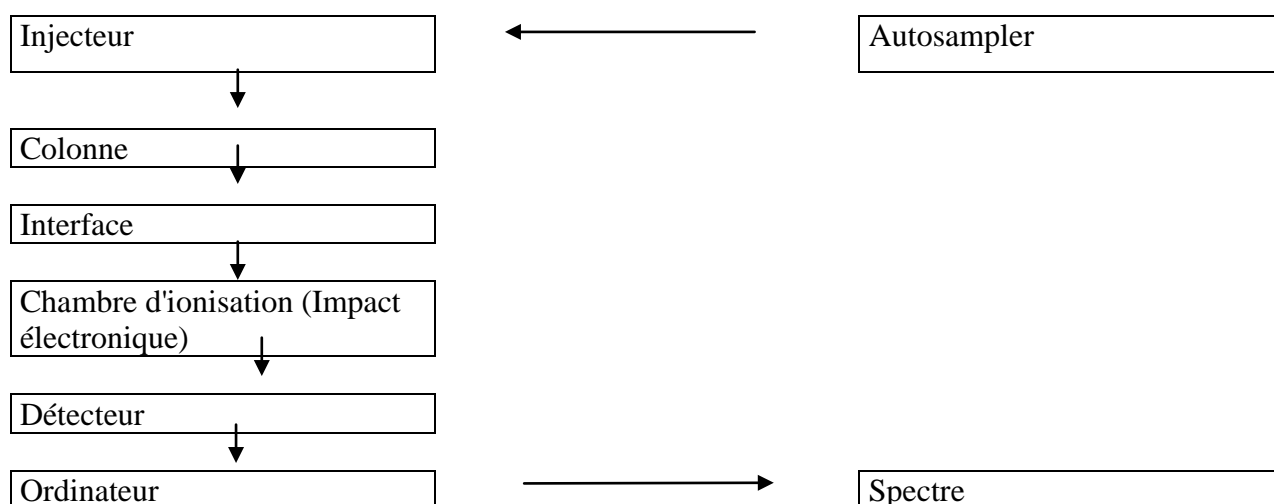


Figure. 21: étapes de l'obtention d'un spectre par un GC-MS

* L'ionisation par impact électronique

L'ionisation par impact électronique reste le procédé le plus largement utilisé pour les molécules relativement volatiles. C'est le seul procédé qui conduit à des spectres reproductibles, et qui permet des comparaisons à l'aide de spectrothèques (Analyse chimique - Méthodes et techniques instrumentales modernes,...).

L'ionisation est provoquée dans la source, par impact d'électrons obtenus par effet thermoïonique sur les molécules de l'échantillon. La source d'électron provient donc d'un

filament chauffé qui émet des électrons accélérés vers une anode (de Hoffmann, 1994).

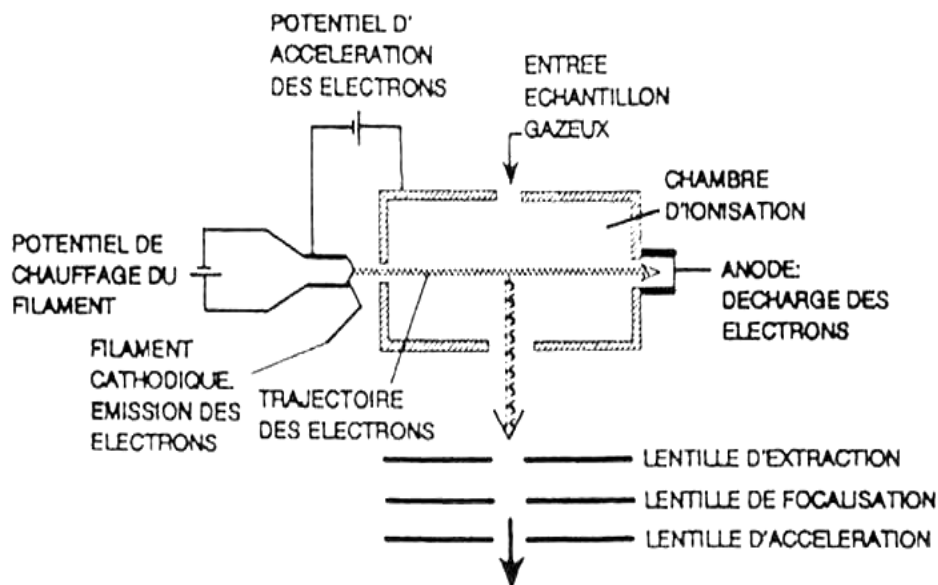
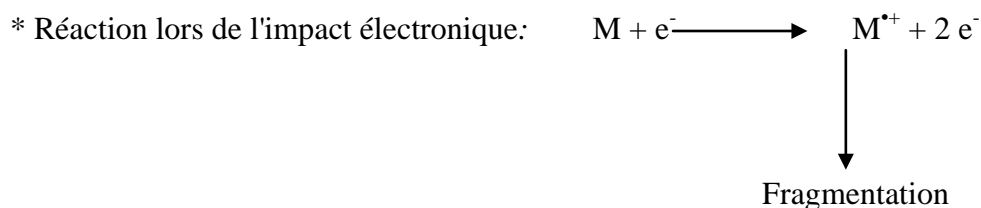


Figure. 22: schéma d'une source par impact électronique

Ces électrons sont accélérés par une différence de potentiel de 70 V. Ceci leur fournit une énergie cinétique suffisante pour que la collision entre un électron et une molécule de l'échantillon entraîne l'ionisation de cette dernière. L'énergie moyenne d'ionisation d'une molécule est de 70 eV. A 70 eV le rendement de l'ionisation est de 1 ion formé pour 10000 molécules.



* Appareillage

Le chromatographe utilisé était le TRACE GC 2000 series (ThermoQuest, Italy), équipé d'un autosampler AS2000 (ThermoQuest). Le système GC est couplé au Trace MS mass spectrometer (ThermoQuest) à ionisation électronique.

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne capillaire (DB-XLB; de 15 m × 0.25 mm avec 0.25 µm de diamètre interne) de chez J&W Scientific (Agilent Technologies, USA). L'hélium était utilisé comme gaz d'élution à un débit de 1.2ml/min. Les échantillons étaient injectés au mode split (rapport split : 1/9). La température d'injection était

réglée à 250 °C et celle du four programmée entre 50 °C et 320 °C (10 °C/min) et cette dernière température était maintenue pendant 3 min. La température de couplage du GC était de 320 °C. L'énergie des électrons était de 70eV et la source des électrons à 250 °C. Les échantillons ont été analysés en mode full-scan (250-650 amu).

*** Identification des constituants**

L'identification des constituants est basée sur la comparaison des temps de rétention et des données spectrales des standards, la comparaison des indices linéaires de rétention relative (ILR) de la série des *n*-hydrocarbures et des données commerciales disponibles dans l'ordinateur (NIST 95 and ADAMS). Les témoins purs d' α -amyrine (Extrasynthèse), de β -amyrine (Extrasynthèse), de β -sitostérol (95%, Sigma), de lupéol (Extrasynthèse), de campestanol (Herbstandard), du stigmastérol (Sigma) de squalène (extrasynthèse) ont été utilisés. Pour les témoins non disponibles nous nous sommes basés sur les standards dans la librairie du logiciel de l'appareil avec une conformité du spectre de masse supérieure à 86%.

IV.3.2.3. Tests biologiques

IV.3.2.3.1. Tests alléopathiques des fractions

*** Description du test**

Le pouvoir alléopathique de différentes fractions était testé à 600 ppm sur les graines de niébé (*Vigna unguiculata* (L. >Walp). Soixante milligrammes de chaque fraction sont dissous dans 20 ml du solvant ayant servi à son fractionnement. Un millilitre de cette solution est versé sur du papier filtre (Watman n°1) stérilisé et soigneusement disposé dans des boîtes de pétri préalablement stérilisées. En contrôle, respectivement 1 ml des différents solvants organiques purs est utilisé. Après évaporation des solvants organiques, 5 ml d'eau distillée sont ajoutées par boîte de pétri avec 4 graines de niébé.

Chaque traitement aussi bien des fractions que du contrôle a été reproduit six fois. Les boîtes de pétri sont alors couvertes par un autre papier filtre puis fermées par leurs couvercles. Elles sont dès lors conditionnées dans du papier aluminium et introduites dans l'incubateur à 25±1 °C pendant 5 jours. Le pourcentage d'inhibition ou de stimulation en termes de taux de germination, d'élongation et du poids frais de la plantule du niébé a été calculé en considérant le contrôle comme zéro (Macias F.A., 1993 ; Macias F.A., 1994 ; Macias F.A., 1995 ; Rawat M.S.M., 1998; Parvez, M.M., 2004).

***Analyses statistiques**

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Statistical Analysis System (SAS). Les données sont analysées par ANOVA (Analysis of Variance) (SAS / STAT User's Guide, 1990). Lorsque les tests statistiques révèlent une différence significative au seuil de 5%, le test de Neuman-Keuls est utilisé pour séparer les moyennes (Steel R.G.D., 1980).

IV.3.2.3.2. Test de cytotoxicité

*** Description du test**

Lignées cellulaires et culture: Les cellules J774 (macrophage de souris) sont cultivées dans du RPMI 1640 contenant 0.33% de L-glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de pyruvate de sodium et des antibiotiques (100 UI de pénicilline/ml, 100 µg de streptomycine/ml), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco BRL). Les cellules WI-38 (fibroblastes embryonnaires humains de poumon), HeLa (cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus) et Mel-43 (melanoma) sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco BRL) et de pénicilline (100 UI/ml). Les cellules sont incubées dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO₂, à la température de 37°C.

Test de MTT: Les solutions stocks des fractions et extraits bruts sont préparées dans le DMSO à une concentration de 10 mg/ml et conservées à 4°C. L'activité cytotoxique des fractions et extraits bruts sur toutes les cellules en utilisant le test de MTT (sigma) qui est un essai colorimétrique basé sur la réduction du sel de tétrazolium (MTT) en diformazan par les déshydrogénases des cellules vivantes (Mosmann T., 1983) . La quantité de diformazan (de

couleur mauve) ainsi formée est directement proportionnelle à l'activité métabolique des cellules et donne donc une information sur la survie et la multiplication des cellules. Le test est réalisé dans des plaques de microtitration à 96-puits. 5000 cellules HeLa, Mel-43, WI38 et J774 dans 200 µl de milieu de culture (DMEM, Gibco BRL) sontensemencées dans chaque puit. Les cellules sont ensuite laissées au repos durant 24h dans un incubateur à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂ (5 %). Après 24h d'incubation, le milieu est enlevé et remplacé par 200µl de milieu frais contenant différentes dilutions d'extraits bruts, de fractions ou de DMSO par puit de sorte à obtenir la même concentration finale. Au minimum, 6 puits sont utilisés par concentration. Une fois les dilutions d'extraits rajoutées dans les puits, on laisse incuber la plaque durant 72h. Ensuite, le milieu est éliminé et remplacé par 100 µl de DMEM (sans sérum) contenant 10 µl de solution du MTT (Sigma) (0.3 mg/ml dans PBS). Après 45 min, le milieu est à nouveau éliminé et le diformazan formé est dissous dans 100 µl de DMSO. Le contrôle négatif correspond au DMEM additionné de quantités de DMSO équivalentes à celles présentes dans les différentes dilutions des solutions stocks. On considère que dans les puits traités par le contrôle négatif, il y a 100 % de viabilité cellulaire. Afin de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire, l'absorbance des puits est lue à l'aide d'un lecteur de micro-plaques à des longueurs d'onde de 570 et 620 nm. Le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé en comparant l'absorbance des puits traités à l'absorbance des contrôles négatifs (considérée comme 100 % de viabilité cellulaire) par la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Absorbance des traités}}{\text{Absorbance des contrôles négatifs}} \times 100$$

Camptothecine (Sigma) était utilisé comme composé de référence pour le contrôle positif d'activité cytotoxique (Stevigny, C., 2002). Les résultats sont exprimé en terme de IC₅₀ (concentration diminuant de 50% le pourcentage de viabilité cellulaire) calculée par régression linéaire des courbes obtenues avec cinq différentes concentrations de chaque extrait et fraction.

*** Analyse statistique**

Un test *t* de student est également réalisé afin de déterminer si la différence entre traités et contrôles négatifs est significative ($p < 0.05$ = différence significative ; $p < 0.001$ = différence fortement significative). Ces essais sont répétés au minimum trois fois afin de déterminer l'IC₅₀. Le principe de ce test reste le même pour tous les produits testés lors de ce travail.

IV.3.3. Résultats et discussions**IV.3.3.1 Rendement des fractionnements Liquide – liquide de l'extrait éthanolique.**

5g de l'extrait éthanolique ont été dissous dans 300 mL d'un mélange hydro-alcoolique (eau-méthanol 50-50) puis extrait trois fois avec chaque fois 250 ml de dichlorométhane. L'évaporation à sec des solvants a conduit à l'obtention respectivement d'une fraction dichlorométhanique (A) et d'une fraction hydro-alcoolique (B). Les résultats sont consignés dans le tableau 16a.

Tableau 16a : Résultat quantitatif du fractionnement liquide-liquide à température ambiante.

	Fraction dichlorométhanique (A)	Fraction hydro-alcoolique (B)
Quantité d'extrait sec (en g)	3.425	1.361

30g de l'extrait éthanolique sont successivement extraits au soxhlet avec de l'hexane (HPLC Grad ; Fisher Scientific), du chloroforme (HPLC Grad ; Fisher Scientific), de l'acétate d'éthyle (HPLC Grad ; Fisher Scientific) et du méthanol (redistillé au Laboratoire). Chaque extraction a duré 4 heures. Après évaporation du solvant organique à pression réduite et à l'évaporateur rotatif, l'extrait obtenu est pesé et les résultats résumés dans le tableau 16b.

Tableau 16b : Masses obtenues par fractionnement liquide – liquide de 30 g d'extrait éthanolique au soxhlet.

Solvant	Hexane (C)	Chloroforme (D)	Acétate d'éthyle (E)	Méthanol (F)
Masse de fraction (en g)	1,69	7,43	2,19	14.10

IV.3.3.2. Activité alléopathique des fractions.

Les résultats des tests alléopathiques des fractions issues de deux techniques de fractionnement liquide-liquide (décantation à froid et par percolation au soxhlet à chaud) ont été résumés sur la figure 30. Il ressort que seule la fraction hexanique (C) présente un effet de stimulation et seulement au niveau de l'élongation (+ 10%) et du poids frais (+ 45%) de la plantule du *Justicia anselliana* à la dose de 600 ppm.

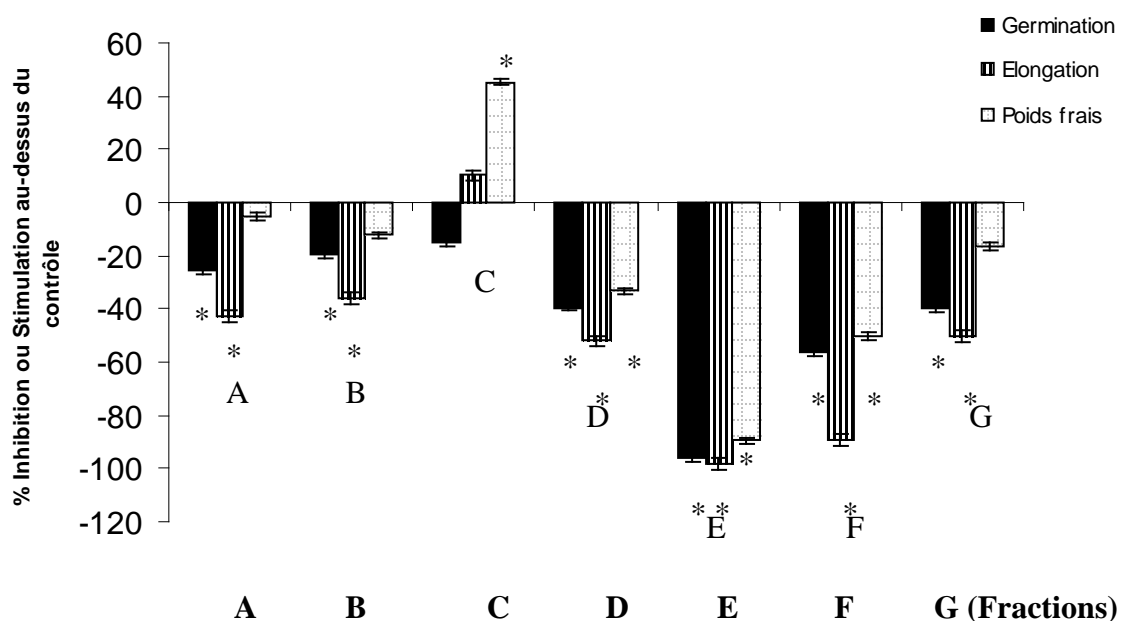


Figure 30: Effets allélopathiques à 600 ppm des extraits de *Justicia anselliana* sur le NIEBE
 nombre de répétitions des tests : N=6 ; différence significative : $P < 0.05$; les résultats qui sont significativement différents à 0.05 sont marqués de * ; A = CH_2Cl_2 ; B = Eau-MeOH ; C = Hexane ; D = CHCl_3 ; E = EtOAc ; F = MeOH ; G = EtOH L'évolution vers le haut (> 0) correspond à une stimulation du paramètre mesuré tandis que la décroissance vers le bas (< 0) indique une inhibition.

A cette même dose les autres fractions [dichlorométhane (A), hydrométhanolique (B) « issues du fractionnement à température ambiante », chloroformique (D), acétate d'éthyle (E), méthanolique (F) et éthanolique (G) « issues du fractionnement au Soxhlet] inhibent tous les trois paramètres à savoir le taux de germination, l'élongation et le poids frais de la plantule ; avec un effet très intense pour la fraction acétate d'éthyle (E). La fraction E est alors plus concentrée en allélochimiques inhibiteurs des paramètres de germination du niébé. Nous avons alors décidé de faire l'isolement et l'identification des constituants de la fraction d'acétate d'éthyle.

La comparaison des résultats des deux techniques de fractionnement prouve que le fractionnement au Soxhlet donne des fractions qui expriment mieux des propriétés allélopathiques des allélochimiques de *Justicia anselliana*. La décantation bien que fournissant des fractions actives (A) et (B), présente des résultats encore bruts qu'il est nécessaire d'améliorer.

L'observation des résultats (Figure 31) des tests allélopathiques des fractions (A₁, A₂ et A₃) obtenus par CCM préparative de (A) montre que celle-ci contient aussi bien des composés inhibiteurs (concentrés dans A₂ et A₃) que stimulateurs (concentrés dans A₁) des paramètres de germination de niébé.

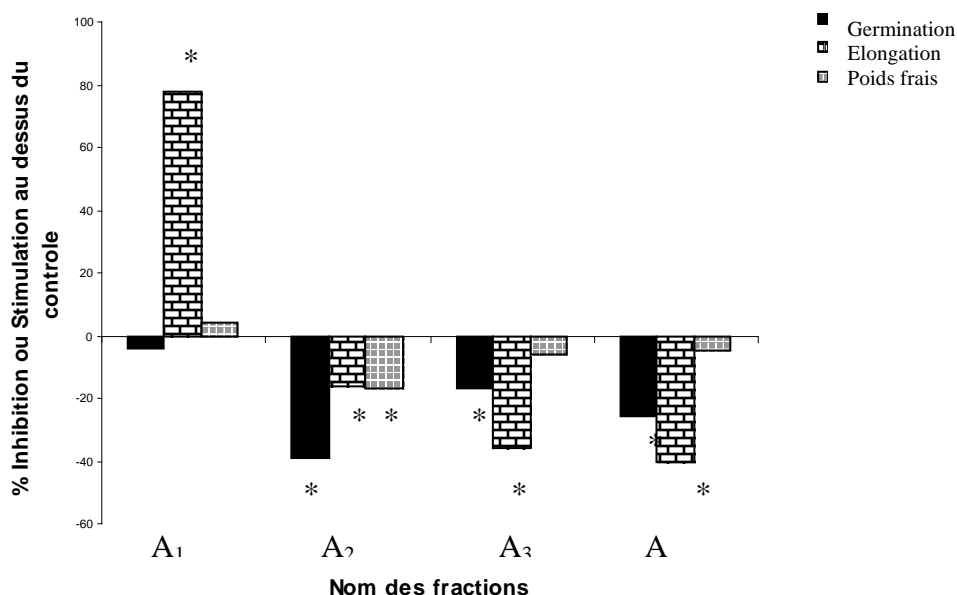


Figure 31 : Effets allélopathiques à 600 ppm des extraits de *Justicia anselliana* sur le NIEBE
 nombre de répétitions des tests : N=6 ; différence significative : P < 0.05 ; les résultats qui sont significativement différents à 0.05 sont marqués de * . A = CH₂Cl₂ ; A₁, A₂ et A₃ = Fractions issues du CCM préparative de A ; L'évolution vers le haut (> 0) correspond à une stimulation du paramètre mesuré tandis que la décroissance vers le bas (< 0) indique une inhibition.

IV.3.3.3. Activité cytotoxique des fractions.

L'activité cytotoxique des différentes fractions sur les cellules J774 (macrophage de souris), WI-38 (fibroblastes embryonnaires humains de poumon), HeLa (cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus) et Mel-43 (melanoma) est résumée dans le tableau 18. Les

valeurs des IC₅₀ du test de MTT montre que la fraction hexanique (C) a un effet cytotoxique seulement sur les cellules J774 (IC₅₀=2.17±1.09µg/ml) et HeLa (IC₅₀=37.63±1.15µg/ml) pendant que la fraction dichlorométhanique et l'extrait brut (G) inhibent seulement les cellules J774 respectivement avec IC₅₀=1.568±0.195µg/ml et IC₅₀=3.86±1.00µg/ml. Les autres fractions (D), (E) et (F) ne sont pas toxiques sur les lignées cellulaires testées. Ces résultats indiquent que l'effet allélopathique de la fraction la plus inhibitrice des paramètres de germination du niébé E ne semble pas être dû à une cytotoxicité.

Tableau 18: Activité Cytotoxique des fractions

Fractions	IC ₅₀ (µg/ml) ^a			
	J774 ^b	HeLa ^c	WI-38 ^d	Mel-43 ^e
A	1.568±0.195	> 100	> 100	> 100
B	> 100	93.90±1.97	> 100	> 100
C	2.165± 1.09	37.63±1.15	> 100	> 100
D	> 100	> 100	> 100	> 100
E	> 100	> 100	> 100	> 100
F	> 100	> 100	> 100	> 100
G	3.858±1.00	> 100	> 100	> 100

^aIC₅₀ (concentration diminuant de 50% le pourcentage de viabilité cellulaire);
^bmacrophage de souris; ^ccellules cancéreuses humaines du col de l'utérus;
^dfibroblastes embryonnaires humains de poumon; ^emelanoma. A = CH₂Cl₂ ; B = Eau-MeOH ; C = Hexane ; D = CHCl₃ ; E = EtOAc ; F = MeOH; G = EtOH

IV.3.3.4. Analyse des fractions.

IV.3.3.4.1. Analyse CCM de la fraction B.

Dans le but d'identifier les composés polaires, nous avons réalisé une chromatographie de la fraction B avec différents témoins phénoliques disponibles. Quatre différents systèmes de solvants ont été utilisés (Brasseur T., 1998 ; Kil B.S., 1989) :

- Système 2
- Système 3
- Systeme 4
- Système 5

Les résultats des analyses CCM obtenus dans le système 4 qui a montré une meilleur séparation des composés, avec comme détecteurs le NP/PEG (Natural product/ polyethylene glycol reagent) et le chlorure ferrique sont respectivement présentés dans les figures 23 et 24. Les témoins utilisés sont : t_1 = acide gallique ; t_2 = acide cafféique ; t_3 = acide chlorogénique; t_4 = rutine; t_5 = pyrogallol; t_6 = acide syringique ; t_7 = quercétine ; t_8 = saponine ; t_9 = acide benzoïque ; t_{10} = acide salicylique.

Fraction : B = fraction hydro-alcoolique ; **Système de solvant** : Système 4.

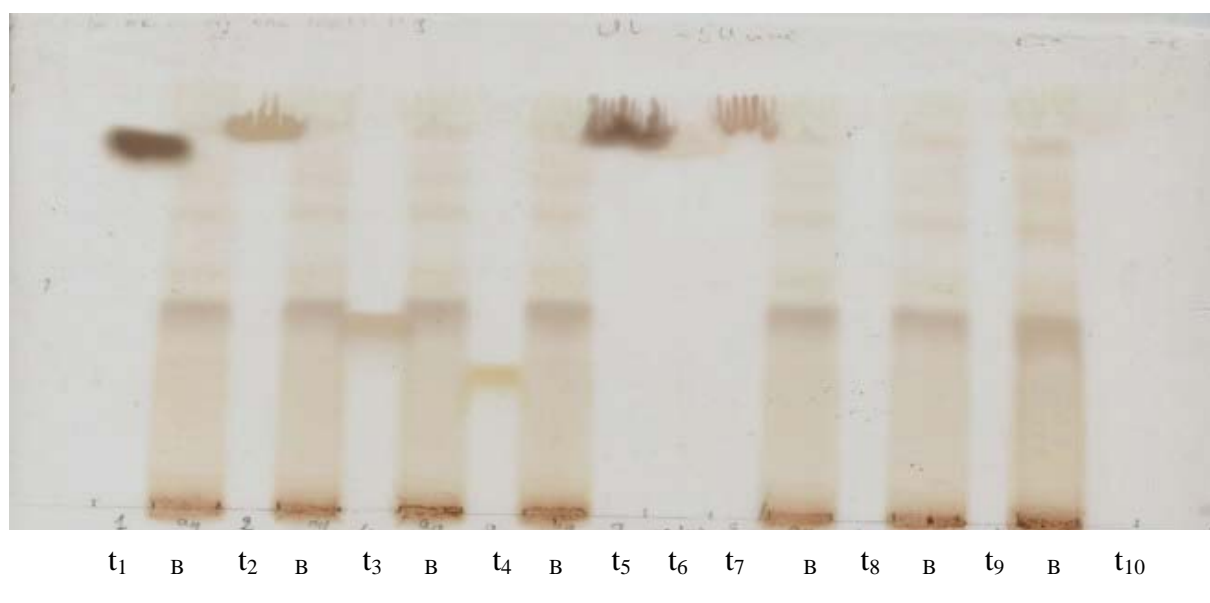


Figure 23 : CCM de la fraction B et de quelques témoins révélés au réactif de NP/PEG.

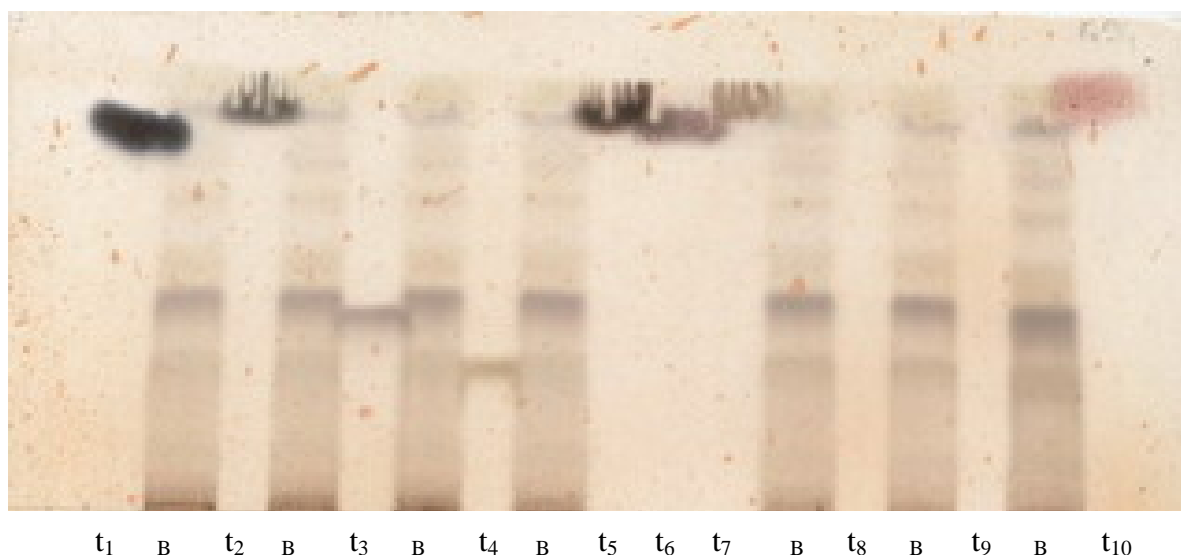


Figure 24 : CCM de la fraction B et de quelques témoins révélés par FeCl₃.

On peut constater en lisant les R_f (figure 23 et 24) que la rutine (t₄) se retrouve dans l'extrait hydro-alcoolique B avec probablement l'acide chlorogénique (t₃). Pour lever l'équivoque à propos de l'acide chlorogénique, nous avons fait une CCM en couplant ce témoin avec la fraction B (figure 25).

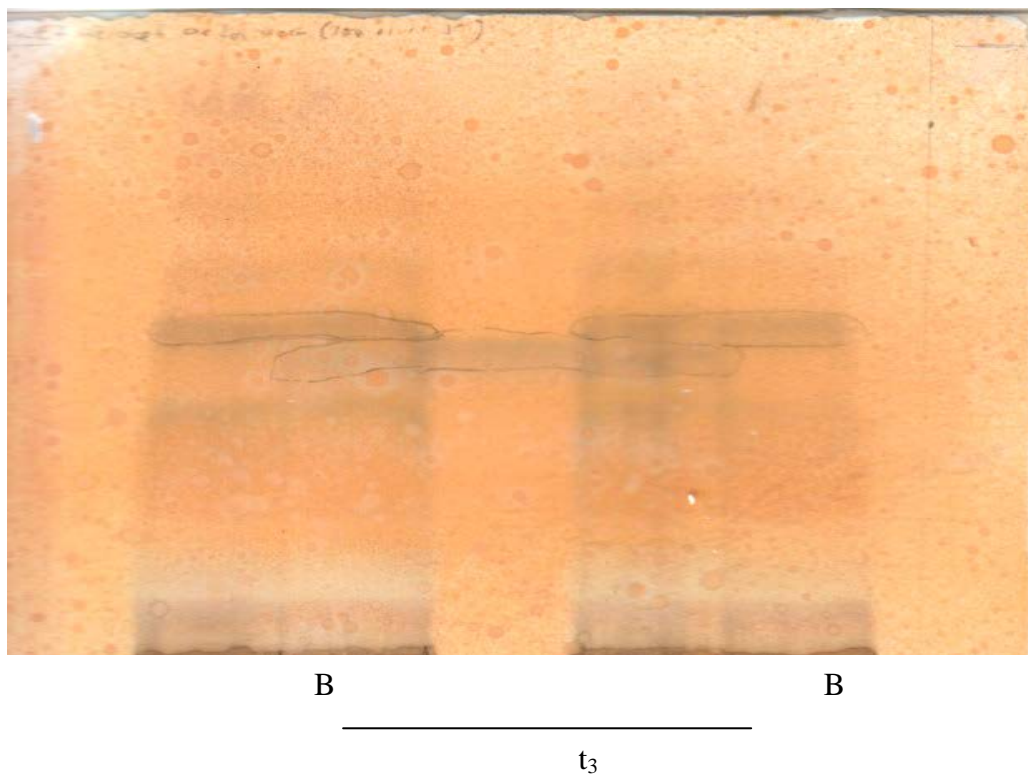


Figure 25 : CCM de la fraction aqueuse B couplée avec l'acide chlorogénique, révélée par FeCl_3 .

Cette CCM montre une légère différence de R_f entre l'acide chlorogénique et le spot de l'extrait tout en gardant la même coloration. On a alors pensé à un isomère de l'acide chlorogénique.

IV.3.3.4.2. Analyse CCM de la fraction A

Vu la forte coloration des spots de la fraction dichlorométhane A par l'anisaldéhyde (figure 26), nous avons décidé de tester quelques stérols et triterpènes disponibles.

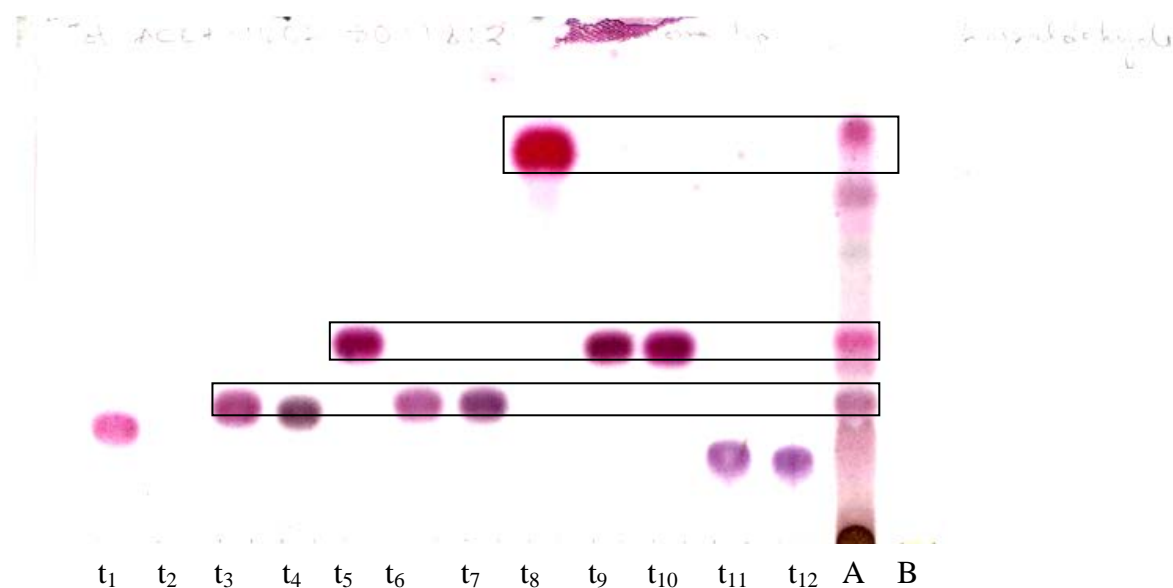


Figure 26 : CCM des fractions A, B et de quelques témoins révélés par l'anisaldéhyde.

Nous avons utilisé :

- **Témoins** : t_1 = Betuline ; t_2 = Campestanol ; t_3 = Cholestérol ; t_4 = Ergostérol ; t_5 = Lupéol; t_6 = β -sitostérol ; t_7 = Stigmastérol ; t_8 = squalène; t_9 = α -amyrine ; t_{10} = β -amyrine.; t_{11} = l'acide oléarolique ; et t_{12} = l'acide ursolique.
- **Fractions** : A = fraction dichlorométhanique ; B = fraction hydro-alcoolique.
- **Système de solvant** : Système 1.
- **Révélateur** : anisaldéhyde sulfurique à 5% lecture au visible après chauffage.

On peut constater en lisant les R_f que trois groupes de composés pourraient se retrouver dans l'extrait dichlorométhanique A :

- groupe N°1 = squalène ;
- groupe N°2 = lupéol, α -amyrine et/ou β -amyrine.
- groupe N°3 = cholestérol, ergostérol, β -sitostérol et/ou stigmastérol.

Pour confirmer ces résultats, nous avons fait une l'analyse au GC/MS.

IV.3.3.4.3. Analyse GC/MS de la fraction A

Nous avons alors, au regard de ces constats au CCM, poursuivi le fractionnement de A par une CCM préparative afin d'analyser les spots correspondants par GC/MS.

* Préparation des fractions

3mg par millilitre de l'extrait dichlorométhanique est préparé avec le dichlorométhane. 5 ml de cette solution sont déposés, soit 15 mg d'extrait par plaque (CPEP 20 X 20 cm, Gel de silice 60.2mm MERCK); avec les témoins (squalène "groupe N°1", α -amyrine" groupe N°2" et β -sitostérol "groupe N°3") identifiés dans A. Après migration et séchage des plaques, les témoins sont révélés à l'anisaldéhyde puis les fractions de même Rf récupérées et regroupées dans un même erlen rodé. 100mL de dichlorométhane sont ajoutés à chaque fraction. Après 12 heures d'agitation, le mélange est filtré avec un filtre de type LS 50 μ m (Millipore S.A. 67120 Molsheim, Made in France). La silice est rincée trois fois avec 100 mL de dichlorométhane puis, enfin avec une quantité équivalente de méthanol. Les solutions de rinçage de chaque fraction sont regroupées et séchées. Trois fractions sont donc obtenues :

- A₁ = squalène (correspondant au groupe N°1);
- A₂ = α -amyrine, β -amyrine et/ou lupéol (correspondant au groupe N°2) ;
- A₃ = cholestérol, ergostérol, β -sitostérol et/ou stigmastérol (correspondant au groupe N°3).

Les fractions A₁, A₂, et A₃ sont dissoutes chacune dans 1mL de dichlorométhane et filtrées avec un micro filtre de type Whatman 4 mm Syringe Filter (0,45 μ m PVDF, 24mmX ϕ 10mm, Cat. N°. 6779-0404). Les filtrats sont conditionnés et prêts pour l'analyse au GC/MS.

*Analyse GC/MS des fractions A₁, A₂, et A₃

Le chromatographe gazeux utilisé est de la série des TRACE GC 2000 (TeramoQuest, Italy) équipé d'un auto sampleur AS 2000 (TeramoQuest). Le système GC était couplé à un spectromètre de masse de type TRACE (TeramoQuest) opérant en mode à impact d'ion.

Les séparations chromatographiques sont réalisées dans une colonne capillaire (DB-*XLB* ; dimensions colonne : 15 m X 0.25 mm avec un diamètre intérieur de 0.25 µm) fabriquée par J&W Scientific (Agilent Technologies, USA). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, avec un débit de 1.2 mL/min. Les échantillons (1µL, dans dichlorométhane) sont injectés dans le mode split (Rapport split : 1/9). La température d'injection est réglée à 250 °C et celle du four programmée de 50 °C à 320 °C (10 °C /min) et la température finale est maintenue pendant 3 min. La température du détecteur est réglée à 320 °C. L'énergie des électrons est de 70 eV et la source d'ion à 250 °C. Les échantillons sont analysés dans un mode full-scan (250-650 amu).

Les standards utilisés sont l'α-amyrine (with HPLC, Extrasynthèse), la β-amyrine (with HPLC, Extrasynthèse), le β-sitostérol (95%, Sigma), le lupéol (with HPLC, Extrasynthèse), le clérostérol (Herbstandard), l'uvaol (with HPLC, extrasynthese).

*** Résultats de l'analyse GC/MS**

L'analyse au GC/MS nous a permis d'obtenir, pour chaque fraction, les chromatogrammes suivants :

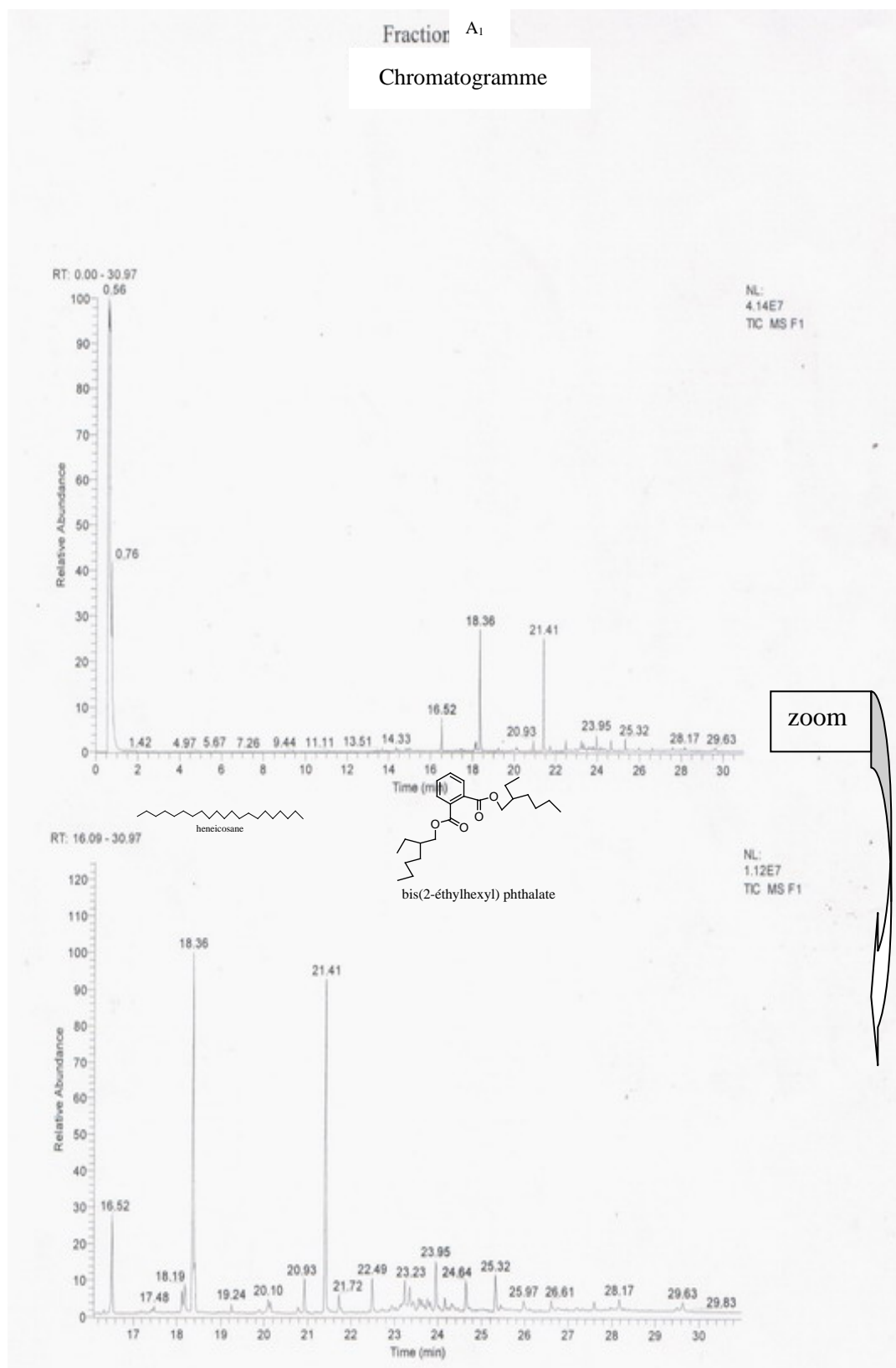


Figure 27 : Chromatogramme de la Fraction A₁

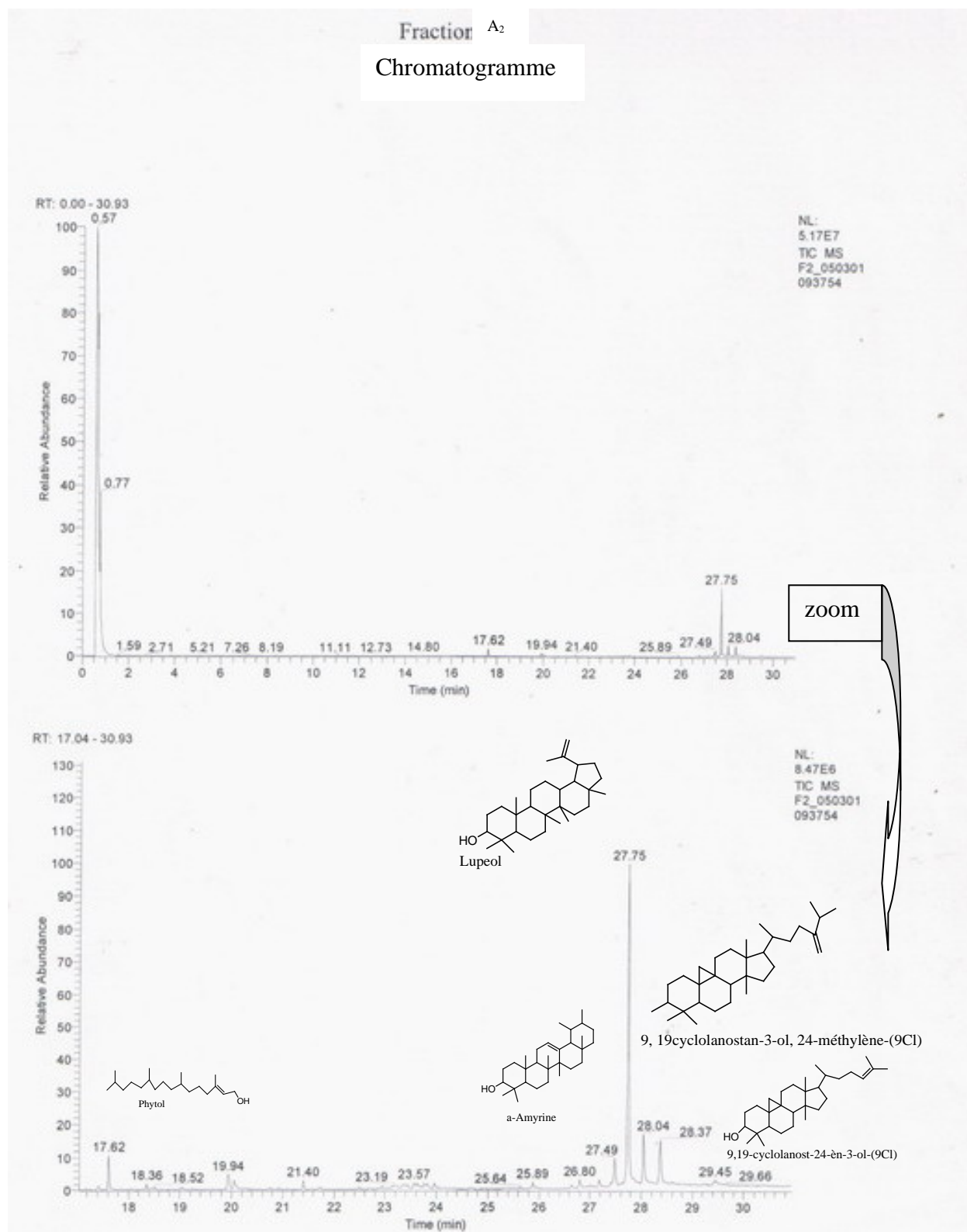


Figure 28 : Chromatogramme de la Fraction A₂

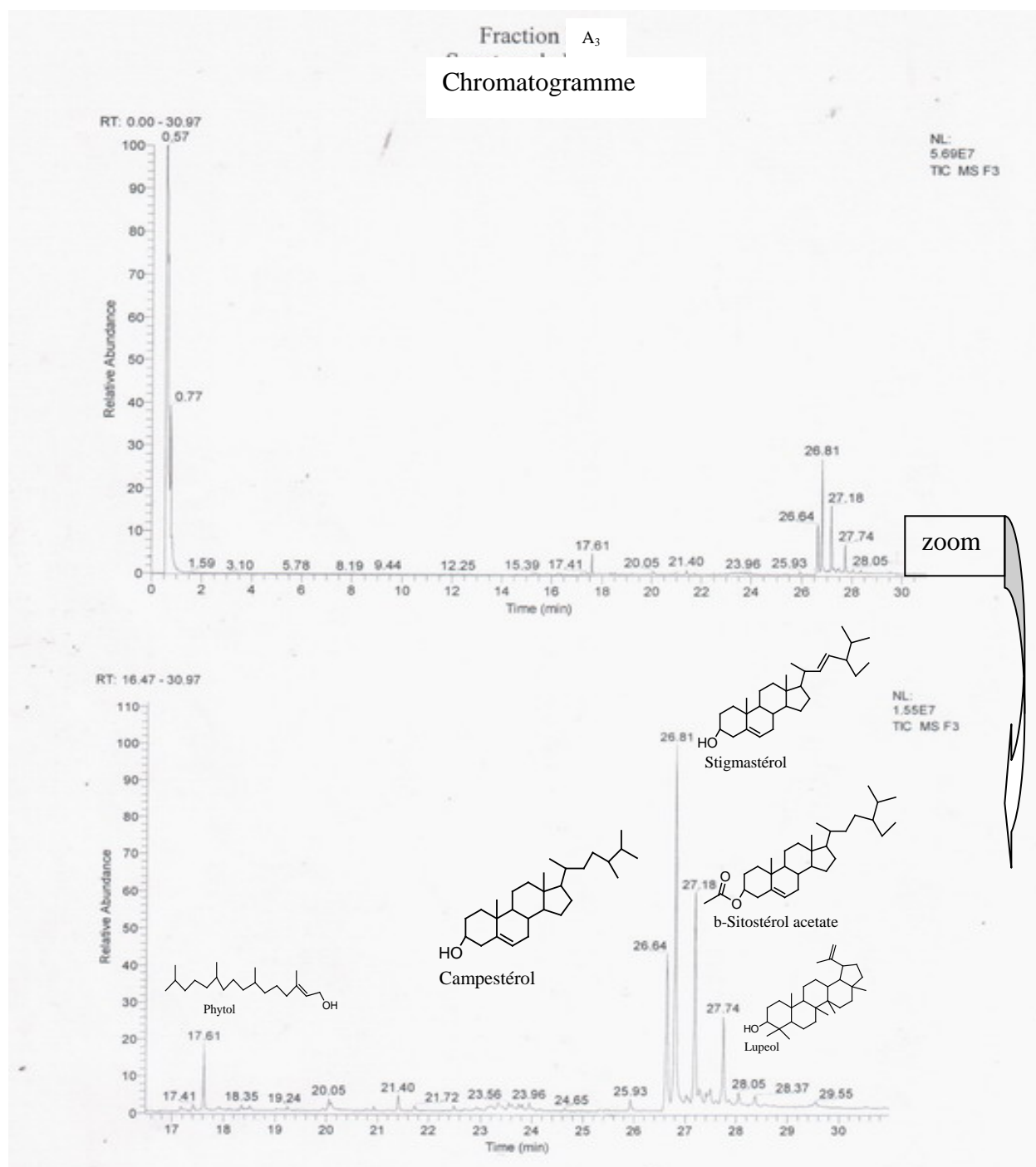

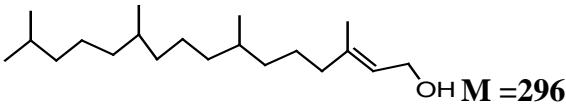

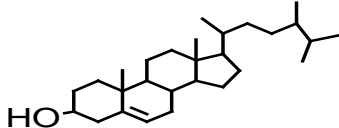
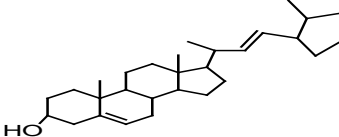
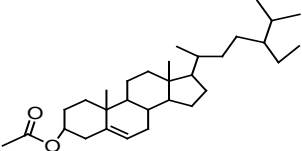
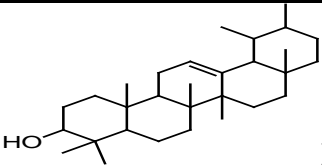
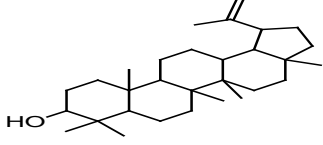
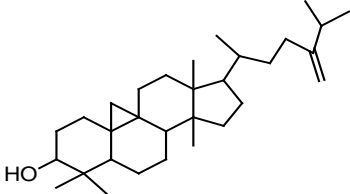
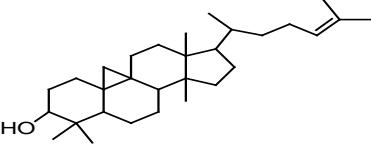


Figure 29 : Chromatogramme de la Fraction A₃

L'analyse de ces chromatogrammes montre la présence de trois stérols, de cinq triterpènes et d'autres molécules regroupées dans le tableau ci-après :

Tableau 17 : Molécules identifiées dans les fractions A₁, A₂, et A₃. t

N°	Composé (standard)	t _R (min)	Structures et Masse moléculaire	Fractions		
				A ₁	A ₂	A ₃
1	palmitate d'éthyle	16.52	 M=260	+	-	-
2	Phytol	17.67	 OH M =296	-	+	+
3	henéicosane	18.36	 M =296	+	-	-
4	Campestérol	26,60	 M = 400	-	-	+
5	Stigmastérol	26.8	 M = 412	-	+	+
6	Acétate de β-sitostérol	27.18	 M = 456	-	-	+
7	α - amyrine	27.49	 M = 426	-	+	-
8	Lupéol	27.74	 M = 426	-	+	+
9	9, 19-cyclolanostan-3-ol, 24-méthylène-(9Cl)	28.04	 M =454	-	+	-
10	9,19-cyclolanost-24-èn-3-ol-(9Cl)	28.37	 M = 454	-	+	-

 Identification et quantification d'alléochimiques de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders (Acanthaceae) et évaluation de leurs effets alléopathiques sur le niébé *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

IV.3.4. Conclusion

Afin d'amorcer le fractionnement de l'extrait brut le plus actif en vue de l'identification de la fraction la plus active et des allélochimiques moins volatils de *Justicia anselliana*, deux techniques de fractionnement ont été expérimentées. L'analyse des résultats des tests allélopathiques des fractions prouve que cette plante contient aussi bien des allélochimiques inhibiteurs que stimulateurs des paramètres de germination du niébé. Ces résultats permettent de conclure aussi que la fraction acétate d'éthyle polaire est la plus concentrée en composés inhibiteurs de germination du niébé. Nous avons aussi montré que l'extrait le plus allélopathique n'est pas cytotoxique sur des cellules humaines et de souris; ceci prouve que l'effet allélopathique des principes actifs de *Justicia anselliana* ne serait pas dû à une cytotoxicité.

La richesse en stérols et tritèrènes des fractions actives de *Justicia anselliana* a été mise en évidence. Nous avons identifié par CCM et GC/MS trois stérols (acétate de β -sitostérol ; Campesterol ; stigmastérol), cinq tritèrènes (phytol ; 9,19-cyclolanostan-3-ol-24-méthylène ; 19-cyclolanost-24-ène-3-ol, lupéol, α -amyrine), l'heneicosane et le palmitate d'éthyle (dans la fraction dichlorométhanique) la rutine et un acide proche de l'acide chlorogénique (dans la fraction hydrométhanolique) dont les effets allélopathiques seront élucidés dans une étape ultérieure de ce travail. Vu la forte inhibition de la fraction acétate d'éthyle, nous allons alors procéder à l'isolement et à l'identification de ses allélochimiques.

IV.4. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES ALLELOCHIMIQUES DE LA FRACTION LA PLUS ACTIVE DE *Justicia anselliana*.

IV.4.1. Introduction

Parmi les différentes fractions obtenues du fractionnement de l'extrait éthanolique, la fraction acétate d'éthyle (E) est la plus active sur les paramètres de germination du niébé. Dans cette partie, il s'agira de poursuivre le fractionnement de E par VLC ou CLV (Vacuum Liquid Chromatography ou Chromatographie Liquide sous Vide) et MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography) pour purifier ses composés actifs. La rutine et l'acide isomère de l'acide chlorogénique révélés seulement par CCM seront aussi purifiés. Enfin, tous les composés purifiés seront analysés par RMN, MS et/ou GC/MS en vue de la détermination de leur structure.

IV.4.2. Matériels et méthodes

IV.4.2.1. Fractionnement et purification de la fraction la plus active

IV.4.2.1.1. CLV (Chromatographie Liquide sous Vide) de la fraction la plus active

La chromatographie liquide sous vide peut être considérée comme une séparation avec CCM préparative. Seulement ici, c'est une colonne qui remplace la plaque dans la CCM et le débit de l'éluent est accéléré par un vide appliqué à la colonne. Cette technique est particulièrement utilisée pour la séparation rapide des composés d'un mélange en fonction de leurs affinités pour la silice. Pour cela on utilise comme éluent, un gradient de solvant de polarité croissante. Cette méthode est moins efficace que la MPLC car elle ne permet pas l'utilisation de phase stationnaire de fine granulométrie. Elle offre cependant la possibilité de fractionner rapidement jusqu'à 30 g d'extrait, avec un très simple montage ; mais la reproductibilité de la séparation n'est pas aisée (Hostettman, 1998; Coll, 1986).

***Préparation de la colonne et fractionnement de l'échantillon.**

La fraction acétate d'éthyle E (6g) est soumise à une CLV sur silice (0.063 – 0.200mm) 60g de gel de silice : kieselgel 60 (0.063 – 0.200mm ; 70 230 mesh ASTM) MERCK sont trempés dans 300ml de méthanol pendant 24 heures et puis paqués dans une colonne (P2 ; B24). La colonne ainsi préparée est éluee par 500 mL d'hexane pour son conditionnement. 200 mg de la fraction d'acétate d'éthyle E sont soigneusement dissous dans 2.5 ml d'acétate

d'éthyle. A cette solution sont progressivement ajouté 7g de silice jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette opération a permis d'adsorber la fraction C sur la silice. Cette poudre est alors appliquée au dessus de la colonne qui a subi un gradient d'élution : Hexane - Chloroforme (CHCl₃) - Acétate d'éthyle (EtOAc) - Méthanol (MeOH) avec 200 mL d'éluent à chaque étape, comme l'indique le tableau 18. Nous avons utilisé les indices visuels (couleur de la fraction, mouvement des bandes de pigment à travers la colonne) pour distinguer le moment où une grande quantité de d'éluent de même polarité doit être utilisée et le moment où nous devons changer de polarité. Au total 56 fractions ont été récupérées et regroupées par analyse au CCM en 30 fractions, réduites à l'évaporateur rotatif, séchées puis pesées. Les masses de ces fractions (E1 à E30) sont consignées dans le tableau 19.

Tableau 19 : CLV de la fraction acétate d'éthyle E : Etapes d'élution et masse de fractions

N° de la Fraction	Solvant d'élution	Volume (ml)	Masse de la fraction (mg)
E1	Hexane 100	2 x 200	3.25
E2	Hexane-CHCl ₃ 90 : 10	200	4.46
E3	Hexane-CHCl ₃ 80 : 20	200	5.14
E4	Hexane-CHCl ₃ 50 : 50	200	5.42
E5	Hexane-CHCl ₃ 20 : 80	200	4.35
E6	Hexane-CHCl ₃ 10 : 90	200	3.45
E7	CHCl ₃ 100	200	5.55
E8	CHCl ₃ - EtOAc 90 : 10	200	14.45
E9	CHCl ₃ - EtOAc 85 : 15	200	4.12
E10	CHCl ₃ - EtOAc 80 : 20	3 x 200	5.53
E11	CHCl ₃ - EtOAc 75 : 25	3 x 200	6.83
E12	CHCl ₃ - EtOAc 70 : 30	200	4.15
E13	CHCl ₃ - EtOAc 65 : 35	200	3.47
E14	CHCl ₃ - EtOAc 60 : 40	2 x 200	6.8
E15	CHCl ₃ - EtOAc 55 : 45	2 x 200	4.73
E16	CHCl ₃ - EtOAc 50 : 50	2 x 200	6.06
E17	CHCl ₃ - EtOAc 45 : 55	200	5.79
E18	CHCl ₃ - EtOAc 40 : 60	200	4.52
E19	CHCl ₃ - EtOAc 30 : 70	200	5.56
E20	CHCl ₃ - EtOAc 20 : 80	2 x 200	7.4
E21	EtOAc 100	3 x 200	6.85
E22	EtOAc - MeOH 95 : 5	4 x 200	7.5
E23	EtOAc - MeOH 90 : 10	200	3.15
E24	EtOAc - MeOH 80 : 20	6 x 200	9.45
E25	EtOAc - MeOH 70 : 30	200	5.33
E26	EtOAc - MeOH 60 : 40	200	5.5
E27	EtOAc - MeOH 50 : 50	2 x 200	5.68
E28	EtOAc - MeOH 60 : 40	2 x 200	5.87
E29	EtOAc - MeOH 80 : 20	2 x 200	6.75
E30	MeOH 100	5 x 200	10.45

IV.4.2.1.2. MPLC (Medium Pressure Liquide Chromatography) de la fraction la plus active

La MPLC est une technique de chromatographie préparative liquide-solide, très utile pour la purification des fractions obtenues de la CLV. On peut ainsi accéder à des composés avec une pureté convenable. Les colonnes de MPLC sont des tubes en verre remplis de phase stationnaire composée généralement de silice. Ces colonnes peuvent être préparées au laboratoire à l'aide de silice normale ou greffée. Le principe de séparation est le même qu'en HPLC. La différence avec la HPLC se situe au niveau de la taille des grains de silice. En MPLC, les grains sont plus gros et moins réguliers, leur taille varie de 15 à 25 μm . La pression et l'efficacité de séparation sont donc moindres qu'en HPLC où la taille des grains varie entre 3 et 10 μm . (Hostettmann, 1998 ; Houghton, 1998 ; Salituro, 1998).

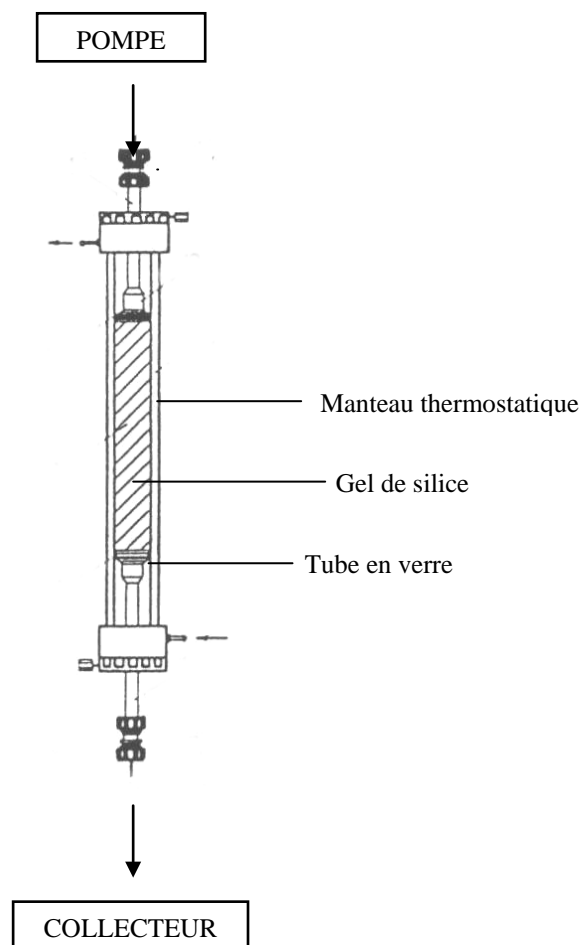


Figure 32: schéma représentant une colonne de MPLC.

La purification de la fraction pré-purifiée par CLV a nécessité la mise au point d'une phase mobile qui assurera une séparation optimale des composés de la fraction.

Une fois les conditions mises au point, la fraction est dissoute dans un minimum de phase mobile (max. 5 ml) et injectée au sommet de la colonne MPLC. La phase mobile est alors injectée à un débit de 1 ml/min et la sortie de la colonne reliée à un collecteur de fraction (4 min/tube). Les fractions sont collectées dans des tubes et leur composition est analysée par CCM sur gel de silice (éluant : Tol-EtOAc (98 :2) ; révélateur : anisaldéhyde sulfurique). Les fractions sont ensuite rassemblées en fonction de leur profil chromatographique. A la fin de la séparation, la colonne est rincée par du méthanol afin de récupérer le maximum de composés non-élus par la phase mobile.

*** Mise au point de la séparation**

Lors des purifications, nous avons principalement utilisé de la silice normale. L'étape la plus importante de cette purification consistait donc à sélectionner la meilleure phase mobile pour la séparation. Pour ce faire, nous avons utilisé des plaques de CCM de silice normale sur lesquelles les fractions à purifier sont déposées. Plusieurs systèmes de solvants de polarités variables ont été utilisés afin de trouver une phase mobile qui assure en CCM une bonne séparation des composés tout en veillant à ce qu'ils migrent avec un $R_f < 0,3$. Si les composés migrent trop haut en CCM, ils risquent de ne pas être retenus sur la colonne et de ne pas être séparés.

Après plusieurs essais, seul le mélange toluène-acétate a conduit ici à un résultat convenable.

***Matériel**

- Colonne : Colonne en verre : Omnifit (OM 6427 15 x 750 mm)
- Phase stationnaire : Lichroprep Si 60 Merck® (taille des grains : 15-25 μM)
- Débit de phase mobile : 1 ml/min
- Collection des fractions : 4-8 min/tube

Phase Mobile : Toluène – Acétate d'éthyle (98-2)

Révélateur : Anisaldéhyde sulfurique.

IV.4.2.2. Purification de la rutine.

La rutine a été purifiée par CCM préparative suivie de CLV.

IV.4.2.2.1. TLC -préparative de la fraction B.

* Préparation des plaques et récupération du spot.

Une solution de 3mg /ml de la fraction aqueuse B est préparée avec du méthanol. Un volume de 5 ml de cette solution est déposé, soit 15 mg d'extrait par plaque (DC - Fertigplatten, TLC plates : gel de silice 60 F₂₅₄, Plaque 10 X 20 cm, épaisseur de la couche 0,25mm, MERCK) avec comme témoin la rutine précédemment identifiés dans (B). Le système de solvant utilisé est : acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique, eau (100 :11 :11 :5).

Après migration et séchage des plaques, le témoin est révélé au chlorure ferrique FeCl₃ et les spots ayant le même Rf sont récupérés dans un même Erlen.

* Extraction et filtrage du spot.

Dans un erlen à col rodé contenant le spot obtenu de cinq plaques, sont ajoutés 100mL de méthanol. Après 12 heures d'agitation, le mélange est filtré avec un filtre de type Millex – GC 0,22µm (Millipore S.A. 67 Molsheim, Made in France). La silice est rincée trois fois avec 100mL de méthanol. Les solutions de rinçage sont regroupées et concentrées à pression réduite à l'évaporateur rotatif.

IV.4.2.2.2. Filtrage par la chromatographie liquide sous vide (CLV).

* Préparation de la colonne.

La chromatographie liquide sous vide est réalisée sur du gel de silice (0,063 – 0,200 mm) trempé dans du méthanol pendant 24 heures et puis paqué dans une colonne (10 cm X 5 cm). 5 mg de la fraction sèche dissous dans 1 mL de méthanol sont appliqués sur la colonne.

* Elution de la colonne.

- Afin d'éliminer tout composé lipophile de la fraction, la colonne est éluée avec 150 ml de diéthyle éther.

- On élue ensuite avec 100 mL de méthanol. La fraction méthanolique concentrée sous pression à l'évaporateur rotatif permet d'obtenir 2.5 mg de rutine purifiée B₁.

*** Test de pureté de la rutine.**

Afin de s'assurer de la pureté de B₁, nous avons réalisé un CCM avec le témoin, la fraction aqueuse B et la fraction purifiée B₁.

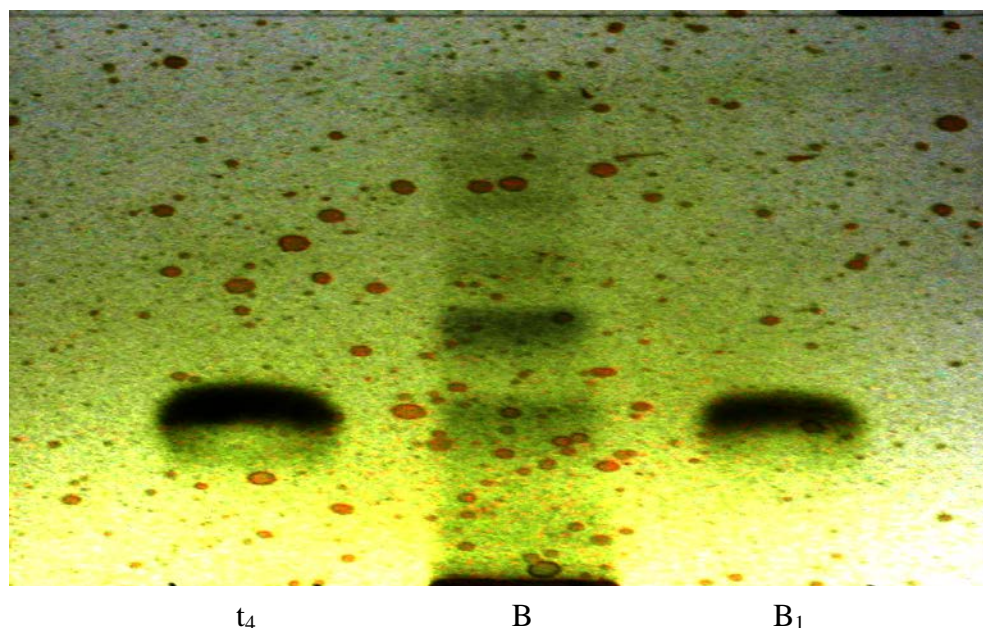


Figure 35 : CCM de la fraction aqueuse B, de la fraction purifiée B₁ et du témoin t₄ révélée par le chlorure ferrique FeCl₃.

- **Témoins** : t₄ = rutine préparée à la concentration de 1g / mL.
- **Système de solvant** : acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique, eau (100 :11 :11 :5).
- **Révéléateur** : FeCl₃ (10%)

IV.4.2.3. Détermination de structure

IV.4.2.3.1. Spectre de Masse (SM)

Nous avons choisi de travailler avec l'impact électronique comme mode d'ionisation (EI/MS) car il est fréquemment décrit dans la littérature sur les triterpènes (Van der Doelen et al. 1998). La spectrométrie de masse, même si elle entraîne la destruction de l'échantillon analysé, n'exige que des quantités infimes de molécules (10^{-12} g).

La spectrométrie de masse fournit de nombreuses informations sur la molécule analysée :

- Poids moléculaire et formule brute. Grâce à la spectrométrie de masse à haute résolution, nous pouvons obtenir la masse exacte de la molécule et ainsi déterminer sa formule brute qui permet également de déterminer le nombre d'insaturations (I) de la molécule :

$$I = \text{nbr de Carbone} - \frac{\text{nbr d'Hydrogène}}{2} - \frac{\text{nbr d'Halogène}}{2} + \frac{\text{nbr d'Azote}}{2} + 1$$

- Identification de la molécule grâce à la comparaison des spectres de masses contenues dans une spectrothèque .
- Informations sur la structure de la molécule grâce à l'analyse des fragments. Le développement de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS et MSⁿ) a permis d'améliorer l'analyse de la fragmentation.

* Matériel

Les spectres de masse ont été réalisés par un LCQ mass spectrometer, équipé d'une source EI (Finnigan MAT, San Jose, CA.).

Les échantillons sont dissous dans le méthanol ou le chloroforme (HPLC grade) et filtrés avec un filtre de type DynagardTM (Microgon Inc) avant les injections.

IV.4.2.3.2. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN est la technique spectrale qui nous fournit le plus d'informations sur la structure de la molécule surtout grâce au développement de la RMN à deux dimensions. Cette technique exige des quantités plus grandes de matériel (± 5 mg) que l'on dissout dans du chloroforme,

DMSO ou éthanol deutérés additionnés de TMS (tetra-méthylsilane) comme standard interne ($\delta = 0$ ppm). L'échantillon peut-être récupéré après analyse.

Chaque spectre donne des informations spécifiques sur le squelette, sur les fonctions et leurs positions, sur la stéréochimie, sur le nombre d'atomes d'hydrogène ou de carbone. La comparaison de ces informations avec d'autres données spectrales de molécules proches conduit à la détermination de la structure de la molécule. (Silverstein, 1991 ; Rouessac, 1998)

*** RMN à 1-D :**

• **Spectre du proton (^1H).**

- L'intégration des pics permet de déterminer le nombre total de protons et le nombre de protons correspondant à un pic donné.
- La multiplicité des raies fournit des informations sur le nombre de protons portés par les carbones voisins (singulet, doublet, triplet ...).
- Le déplacement chimique des pics (δ en ppm) permet l'identification des groupements et fonctions de la molécule grâce à la comparaison de leur déplacement chimique à ceux des tables de référence ou de la littérature.
- La constante de couplage entre les pics (J en Hz) renseigne sur la position des protons les uns par rapport aux autres.

• **Spectre du carbone découplé (^{13}C).**

- Le nombre de pics détermine le nombre de carbones (sauf si la molécule présente une symétrie).
- Le déplacement chimique des pics (δ en ppm) permet l'identification des groupements et fonctions de la molécule en les comparant à ceux des tables de référence ou de la littérature.

*** RMN à 2-D: Spectre COSY homonucléaire H-H (Correlated Spectroscopy).**

Les pics de corrélation (cross-peaks) permettent d'étudier les couplages entre les protons portés par un même carbone ou des carbones voisins et de les positionner sur le squelette.

- Matériel

Bruker 400 à 400.13 MHz (^1H) et 100.62 MHz (^{13}C)

- Expériences réalisées en collaboration avec le Professeur Jacques Poupaert et Coco Kapanda de l'unité CMFA, UCL.

IV.4.3. Résultats et discussions**IV.4.3.1. Purification des composés de la plante.***** Purification des composés de la fraction la plus active.**

L'analyse au CCM des fractions obtenues par VLC de la fraction acétate d'éthyle E (Figure 33a) a montré que les fractions E₇ et E₈ contenaient des spots fortement colorés en orange par l'ansaldéhyde. Après l'étape d'obtention de E₇, nous avons introduit dans la colonne un éluant de polarité intermédiaire (500 mL, CHCl₃-EtOAc 95-5) qui a donné la fraction E₈ contenant trois spots (S) majoritaires, fortement colorés par l'ansaldéhyde (Figure 33b). 506.6 mg de cette fraction E₈ ont été dès lors purifiés par CLV puis finalement à la MPLC.

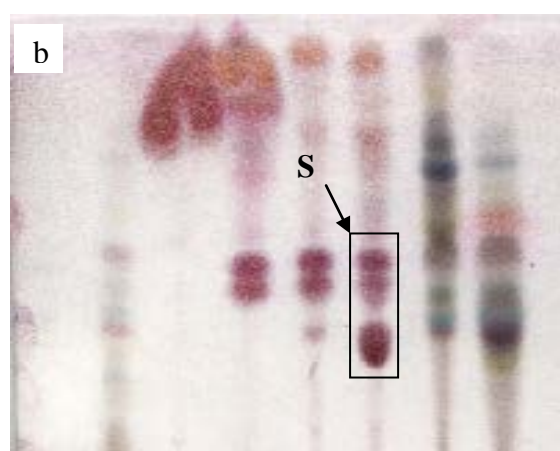
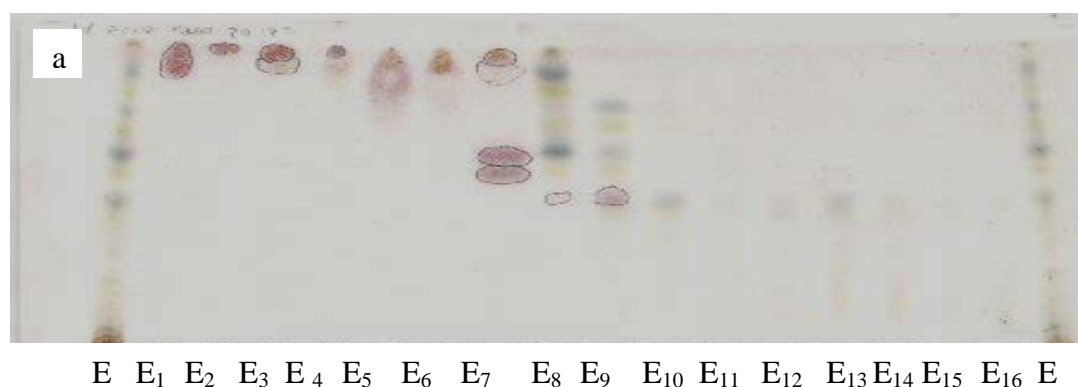


Figure 33 : Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des fractions obtenues par chromatographie liquide sous vide (CLV) de la fraction acétate d'éthyle E.

Système de solvant : Système 1.

Révéléteur : anisaldéhyde sulfurique à 5%
lecture au visible après chauffage

La purification au MPLC de la fraction E_{8'} (Figure 34) a conduit à l'obtention des fractions E_{8'-4}, E_{8'-8} et E_{8'-10} contenant les spots **S** et dont la somme des masses est supérieure à la moitié de la masse de E_{8'} fractionnée.

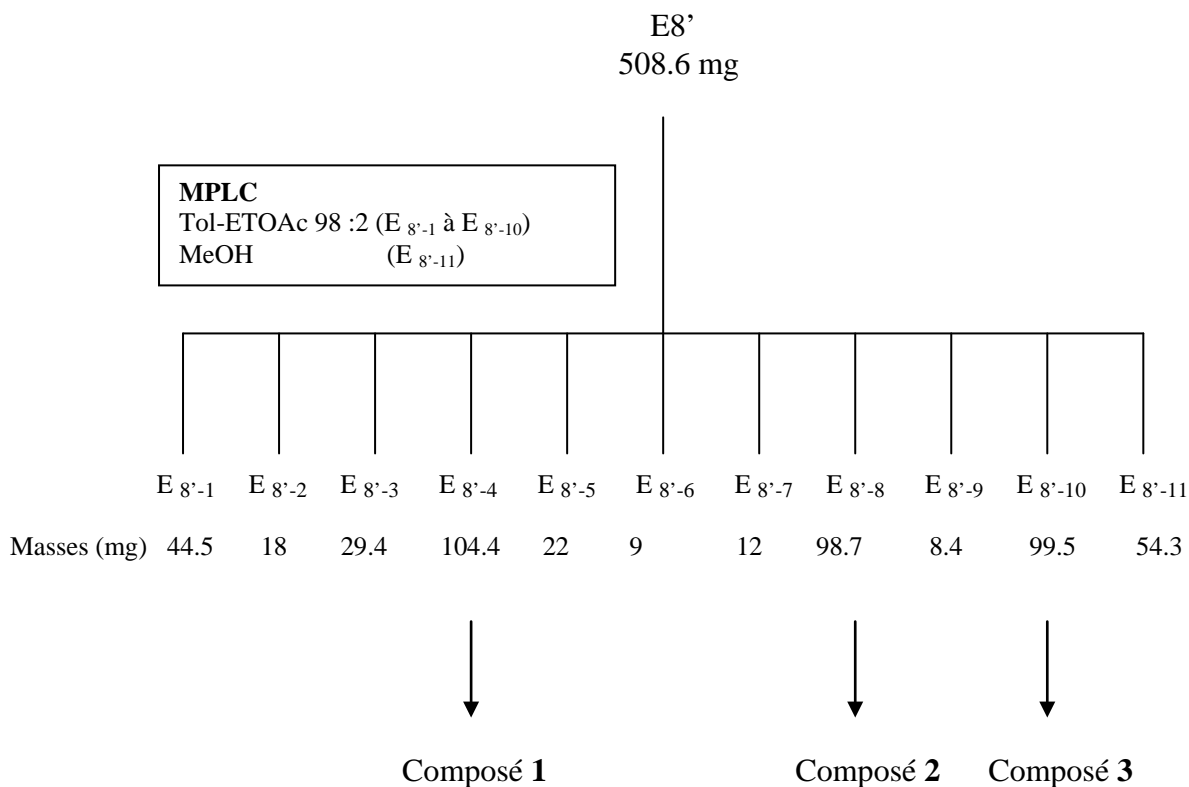


Figure 34 : Purification au MPLC de la fraction E8'.

L'analyse CCM et GC-MS des fractions E_{8'-4}, E_{8'-8} et E_{8'-10} a montré qu'elles contenaient chacune un seul composé relativement pur (respectivement composé **1**, **2** et **3**).

IV.4.3.2. Identification des composés.

* Composés 1, 2 et 3.

Les spectres de masse (EI/MS) des composés **1**, **2** et **3** indiquent que leurs masses sont 426 (**1**), 412 (**2**) et 414 (**3**). Les données des spectres RMN de ces composés sont présentées dans le tableau 20.

Tableau 20. Données des spectres RMN des composés **1**, **2** et **3** (400.13 MHz pour ^1H et 100.62 MHz pour ^{13}C ; dans CDCl_3 et utilisant tétraméthylsilane (TMS) comme standard interne).

Position	Composé 1		Composé 2		Composé 3	
	$^{13}\text{C}\delta(\text{ppm})$	$^1\text{H}\delta(\text{ppm})$	$^{13}\text{C}\delta(\text{ppm})$	$^1\text{H}\delta(\text{ppm})$	$^{13}\text{C}\delta(\text{ppm})$	$^1\text{H}\delta(\text{ppm})$
1	38.7	38.7m 0.90m	37.3	1.84 m 1.08 m	37.3	1.01 m
2	27.5	1.59m 1.67m	31.9	1.83 m 1.51 m	31.6	1.37 m
3	79.0	3.20dd	71.8	3.51 m	71.8	3.82 m
4	38.9	–	42.3	2.30 m 2.23 m	42.3	2.62 m
5	55.3	0.68m	140.8	–	140.8	–
6	18.3	1.40m 1.50m	121.7	5.33 m	121.7	5.32 t
7	34.3	1.32m 1.42m	31.9	1.97 m 1.50 m	31.9	1.93 m
8	40.8	–	31.9	1.46 m	31.7	1.54 m
9	50.5	1.29m	50.2	0.94 m	50.2	0.94 m
10	37.2	–	36.5	–	36.5	–
11	20.9	1.20m 1.40m	21.2	1.50 m	21.1	1.44 m
12	25.2	1.07m 1.68m	39.7	2.00 m 1.18 m	39.8	1.69 m
13	38.1	1.68m	42.2	–	42.3	–
14	42.8	–	57.0	1.01 m	56.7	1.10 m
15	27.5	1.00m 1.68m	24.4	1.58 m 1.06 m	24.3	1.51 m
16	35.6	1.37m 1.48m	28.9	1.72 m 1.28 m	28.3	4.61 m
17	43.0	–	56.8	1.75 q	56.1	1.74 m
18	48.3	1.37m	12.3	0.70 s	11.9	0.67 s
19	48.0	2.38ddd	19.4	1.01 s	19.4	0.98 s
20	151.0	–	40.5	2.06 m	36.2	1.90 m
21	29.9	1.37m 1.92m	21.2	1.03 d	18.8	0.92 d
22	40.0	1.37m 1.19m	138.3	5.17 dd	34.0	1.62 m
23	28.0	0.97s	129.3	5.04 dd	26.1	1.65 m
24	15.4	0.76s	51.3	1.54 m	45.9	1.58 m
25	16.1	0.83s	31.9	1.55 m	29.2	1.58 m
26	16.0	1.03s	21.1	0.85 dd	19.0	0.82 d
27	14.6	0.94s	19.0	0.80 dd	19.8	0.80 d
28	18.0	0.79s				
29	109.3	4.54d 4.67d				
30	19.3	1.68s				
24 ¹			25.4	1.43 m 1.18 m	23.1	1.52 m
24 ²			12.1	0.81 t	12.3	0.84 t

Les composés **1**, **2** et **3** ont été respectivement identifiés comme étant le lupéol, le stigmastérol et le β -sitostérol (Figure 36) après comparaison de leurs spectres ^{13}C avec les données disponibles dans la littérature (Tableau 21) (Yue et al., 2004; Mahato et al., 1994; Connolly and Hill, 1991; Saxena and Sosanna, 2005; Peter and Katalin, 2004).

Tableau 21: Données de la RMN ^{13}C obtenus pour les composés **1**, **2** et **3** comparés à celles déjà publiées (Yue et al., 2004; Mahato et al., 1994; Connolly and Hill, 1991; Saxena and Sosanna, 2005; Peter and Katalin, 2004)

Position	^{13}C		^{13}C		^{13}C	
	1	Lupéol	2	stigmastérol	3	β -sitostérol
1	38.7	38.7	37.3	37.6	37.3	37.3
2	27.5	27.5	31.9	31.9	31.6	31.6
3	79.0	79.0	71.8	72.0	71.8	71.8
4	38.9	38.9	42.3	42.5	42.3	42.3
5	55.3	55.3	140.8	140.8	140.8	140.8
6	18.3	18.3	121.7	121.8	121.7	121.7
7	34.3	34.3	31.9	32.1	31.9	31.9
8	40.8	40.9	31.9	32.2	31.7	31.9
9	50.5	50.5	50.2	50.5	50.2	50.2
10	37.2	37.2	36.5	36.5	36.5	36.5
11	20.9	21.0	21.2	21.2	21.1	21.1
12	25.2	25.2	39.7	40.0	39.8	39.8
13	38.1	38.1	42.2	42.2	42.3	42.3
14	42.8	42.9	57.0	57.1	56.7	56.8
15	27.5	27.5	24.4	24.5	24.3	24.3
16	35.6	35.6	28.9	28.9	28.3	28.3
17	43.0	42.9	56.8	56.3	56.1	56.1
18	48.3	48.2	12.3	12.2	11.9	11.9
19	48.0	47.9	19.4	19.5	19.4	19.4
20	151.0	150.9	40.5	40.4	36.2	36.2
21	29.9	29.9	21.2	21.4	18.8	18.8
22	40.0	40.0	138.3	138.3	34.0	34.0
23	28.0	28.0	129.3	129.7	26.1	26.1
24	15.4	15.3	51.3	51.5	45.9	45.9
25	16.1	16.1	31.9	32.2	29.2	29.2
26	16.0	15.9	21.1	21.2	19.0	19.1
27	14.6	14.6	19.0	19.2	19.8	19.8
28	18.0	18.0				
29	109.3	109.3				
30	19.3	19.3				
24 ¹			25.4	25.4	23.1	23.1
24 ²			12.1	12.2	12.3	12.0

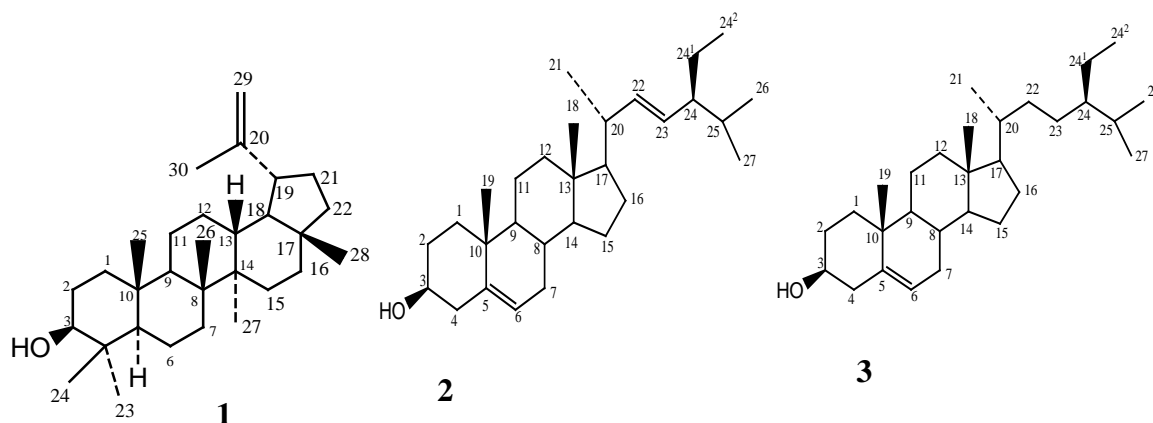


Figure 35: Structure des composés **1** (lupéol), **2** (stigmastérol) and **3** (β -sitostérol).

Les temps de rétention et les spectres de masse des composés **1**, **2** et **3** sont respectivement identiques à ceux du Lupéol, du stigmastérol et du β -sitostérol ; ceci confirme les résultats de détermination de structure (Tableau 22).

Tableau 22 : Temps de rétention et quelques fragments caractéristiques des ions observés dans les spectres de masse EI après analyse GC-MS des composés isolés ou de références.

composés	Masse moléculaire	$[M]^+$	$[M-CH_3]^+$	$[M-H_2O]^+$	$[M-CH_3-H_2O]^+$	Temps de Rétention (min)
1	426	426	411	408	393	27.7
Lupéol	426	426	411	408	393	27.7
2	412	412	399	393	379	26.8
stigmastérol	412	412	397	394	379	26.8
3	414	414	399	396	381	27.2
β -sitostérol	414	414	399	396	381	27.2

1 (lupéol), **2** (stigmastérol) et **3** (β -sitostérol).

IV.4.4. Conclusion

Deux stérols : le stigmastérol, le β -sitostérol, et un triterpène : le lupéol sont isolés de l'extrait le plus actif du *Justicia anselliana*. Ces composés connus, sont pour la première fois identifiés dans cette plante. Les tests allélopathiques de ces molécules isolés et de tous les composés identifiés nous renseigneront sur leur part dans l'effet allélopathique de la plante sur le niébé.

IV.5. ACTIVITES ALLELOPATHIQUES DES COMPOSES ISOLES ET IDENTIFIES DE *Justicia anselliana*.

IV.5.1. Introduction

Nous avons en tout identifié dans le *Justicia anselliana* quatre stérols (acétate de β -sitostérol ; β -sitostérol ; Campestérol ; stigmastérol), cinq triterpènes (phytol ; 9, 19-cyclolanostan-3-ol-24-méthylène ; 19-cyclolanost-24-ène-3-ol, lupéol, α -amyrine), l'heneicosane, le palmitate d'éthyle et la rutine dont les effets allélopathiques seront élucidés dans cette partie. Par une étude de l'activité cytotoxique de ces allélochimiques, nous vérifierons aussi dans cette partie si les composés allélopathiques du *Justicia anselliana* sont aussi actifs sur des cellules de l'homme et de la souris.

IV.5.2. Matériels et méthodes

Les tests allélopathiques et de cytotoxicité des composés identifiés et isolés du *Justicia anselliana* sont réalisés suivant le même protocole que dans l'étape « IV.3.2.3. » des « Tests biologiques ».

IV.5.3. Résultats et discussion

Les résultats des tests allélopathiques (à 200 ppm) des principes actifs du *Justicia anselliana* sont résumés sur la figure 39. De l'analyse de ces résultats, il ressort que, comme dans le cas des fractions (section IV.3.3.3), les allélochimiques de cette plante ne se comportent pas de la même façon sur le niébé. Le palmitate d'éthyle (G) stimule deux des trois paramètres mesurés sur la germination du niébé (taux de germination et l'élongation) et la rutine (I) a le même effet sur le troisième paramètre (poids frais). Pendant ce temps, tous les autres allélochimiques identifiés inhibent les trois paramètres de germination. Cet effet d'inhibition se retrouve aussi bien au niveau des stérols (A = stigmastérol ; B = β -sitostérol ; C = campèstérol ; D = phytol) que des triterpènes (E = α -amyrine ; F = lupéol) le β -sitostérol (B) produisant le plus faible effet d'inhibition sur ces trois paramètres. Il faut noter que parmi tous

les composés identifiés et isolés de cette plante, seule la rutine (I) n'a pas d'effet significatif sur le taux de germination du niébé.

Les effets d'inhibition des trois principes actifs (A = stigmastérol ; B = β -sitostérol et F = lupéol) isolés de la fraction la plus allélopathique (fraction acétate d'éthyle : section IV.3.3.3.) sont plus faibles que ceux de cette fraction (section IV.3.3.3.). Cela prouve que soit ces allélochimiques isolés agissaient dans la fraction par synergisme, ou qu'il reste encore dans cette fraction d'autres composés qui isolément exerceraient plus d'effets allélopathiques sur le niébé.

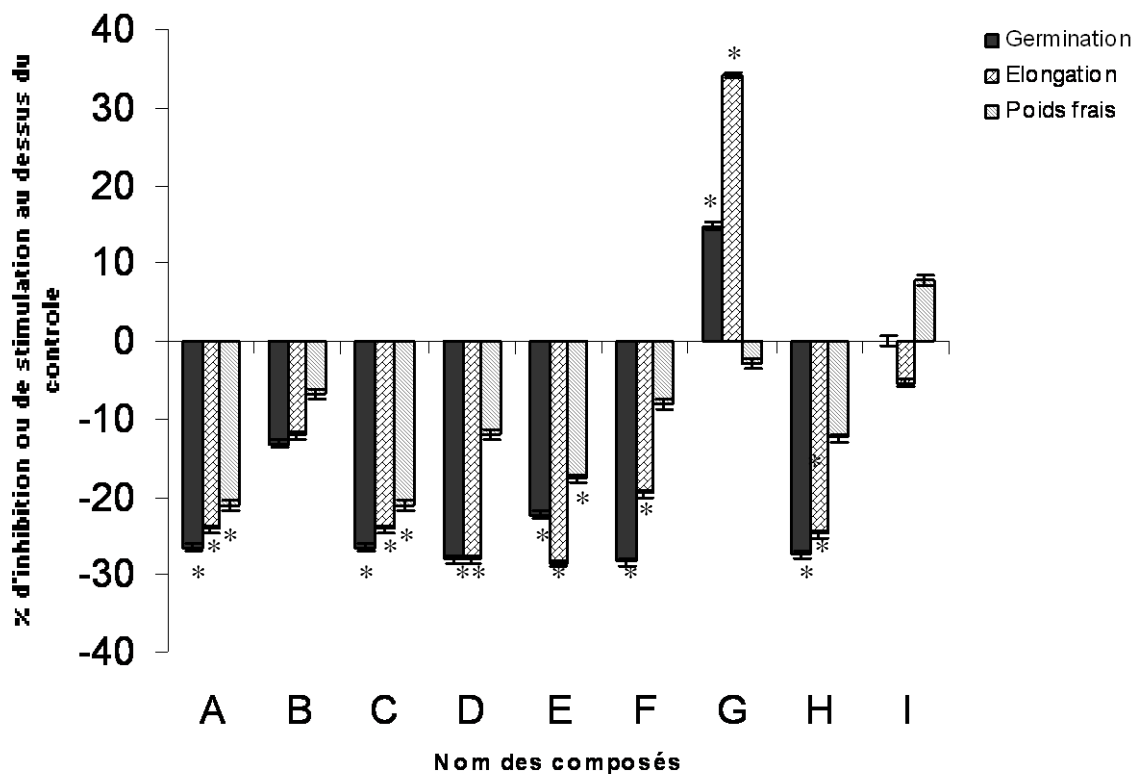


Figure 36 : Effets allélopathiques à 200 ppm des composés du *Justicia anselliana* sur le NIEBE (N=6 (nombre de répétition des tests), $P^* < 0.05$ (différence significative)). A = stigmastérol ; B = β -sitostérol ; C = campèstérol ; D = phytol ; E = α -amyrine ; F = lupéol ; G = palmitate d'éthyle ; H = hénéicosane ; I= rutine. L'évolution vers le haut (> 0) correspond à une stimulation du paramètre mesuré tandis que la décroissance vers le bas (< 0) indique une inhibition.

L'activité cytotoxique des différents composés identifiés et /ou isolés du *Justicia anselliana* sur les cellules de mammifères : J774 (macrophage de souris), WI-38 (fibroblastes embryonnaires humains de poumon), HeLa (cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus)

et Mel-43 (melanoma) est résumée dans le tableau 23 et prouve qu'aucun de ces composés n'est cytotoxique sur ces cellules testées ($IC_{50} > 100$).

Tableau 23: Activité Cytotoxique des composés du *Justicia anselliana*.

Nom des composés	$IC_{50}(\mu\text{g/ml})^a$			
	J774 ^b	HeLa ^c	WI-38 ^d	Mel-43 ^e
Lupéol	> 100	> 100	> 100	> 100
α -amyrine	> 100	> 100	> 100	> 100
Stigmastérol	> 100	> 100	> 100	> 100
campestérol	> 100	> 100	> 100	> 100
β -Sitostérol	> 100	> 100	> 100	> 100
hénéicosane	> 100	> 100	> 100	> 100
Rutine	> 100	> 100	> 100	> 100

^a IC_{50} (concentration diminuant de 50% le pourcentage de viabilité cellulaire);
^bmacrophage de souris; ^ccellules cancéreuses humaines du col de l'utérus;
^dfibroblastes embryonnaires humains de poumon; ^emelanoma.

IV-5.4. Conclusion

En dehors de la rutine qui n'a pas d'effet sur l'un des paramètres de germination du niébé (le taux de germination), tous les autres principes actifs isolés et identifiés dans le *Justicia anselliana* ont un effet allélopathique sur le taux de germination, l'élongation et le poids frais du niébé. Les effets d'inhibition des trois paramètres de germination se retrouvent avec les stérols et triterpènes du *Justicia anselliana*. Ces allélochimiques ne sont pas cytotoxiques sur les cellules de mammifères.

V. Développement et validation de méthodes de quantification

V. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES DE QUANTIFICATION

V.1. Introduction

Le postulat de Putnam relatif à l'établissement de l'existence de l'allélopathie au niveau d'une plante stipule qu'après avoir isolé et identifié les allélochimiques (étape 2) et montré leurs effets allélopathiques (étape 3), il faut franchir la dernière étape qui consiste à établir que la plante allélopathique émet les allélochimiques à une concentration capable de produire le phénomène observé (Putnam, 1985). Pour cela il faut d'abord quantifier les allélochimiques afin de vérifier qu'ils sont en quantité suffisante dans la plante allélopathique. Le but de cette partie est de déterminer la quantité des allélochimiques isolés et identifiés dans le *Justicia anselliana*. Il s'agira de quantifier par application des méthodes de quantification connues pour certains de ces allélochimiques et de développer et valider de nouvelles méthodes de quantification pour les autres.

V.2. Généralités

V.2.1. Objectif de la validation

Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. En d'autres termes, la validation a pour objectif de démontrer les performances de la technique de dosage et de prouver que les résultats obtenus sont fiables et, ce dans les limites bien définies.

V.2.2. Phase de validation

Il est communément admis que la mise en œuvre d'une procédure de dosage peut se décomposer en quatre phases successives :

- une phase de développement (mise au point de la méthode),
- une phase de prévalidation,
- une phase de validation,
- une phase d'application en routine.

V.2.2.1. Phase de prévalidation

Son objectif est de préparer tous les éléments qui sont nécessaires à la validation formelle de la technique. Elle doit permettre d'identifier la fonction de réponse comme courbe de calibration, de définir le seuil de détection, d'estimer les seuils de quantification, d'évaluer l'intervalle de dosage ainsi que le nombre des points de la gamme à calibration, de déterminer le rendement d'extraction (absolu de préférence) et de vérifier la sélectivité.

V.2.2.2. Phase de validation formelle

Son objectif est de démontrer la sélectivité, de valider le modèle de calibration qui sera utilisé en routine, de vérifier la linéarité, d'estimer l'exactitude, d'estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) et de valider le seuil de quantification. Elle vise à donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins connue dans les limites acceptables, en fonction de la finalité de la procédure.

V.2.3. Définition des critères de validation

Par souci de clarté, il est primordial de définir les critères de validation utilisés. En effet, selon l'organisme de normalisation, un critère se définit parfois différemment.

V.2.3.1. Spécificité et Sélectivité

La sélectivité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser et qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupe de fonction d'une ou de plusieurs substances dans l'échantillon. Dans le cadre des méthodes chromatographiques, il est préférable de parler de sélectivité (Vessman J., 1996).

V.2.3.2. Sensibilité

La sensibilité d'une procédure peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse d'analyse à la variation de la quantité d'analyte (NF FD V 01-000).

Une procédure est dite « sensible » si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation importante de la réponse.

Il convient d'éviter de définir, par extension, la sensibilité d'une méthode comme sa capacité à détecter de faibles concentrations.

V.2.3.3. Fonction de réponse (courbe de calibration)

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur d'un intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe de calibration » ou « courbe d'étalonnage ».

V.2.3.4. Limite de détection

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte pouvant être détectée dans un échantillon, mais non quantifiée comme valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

V.2.3.5. Récupération ou rendement

Le rendement d'extraction absolu peut être obtenu par le rapport des signaux mesurés, d'une part après traitement de l'échantillon chargé avec une quantité connue et d'autre part après injection directe dans le système analytique d'une solution de référence contenant une concentration équivalente de substance à examiner.

Le rendement d'extraction absolu est un critère important pour les procédures nécessitant une extraction préalable du principe actif.

V.2.3.6. Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites.

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire) et la reproductibilité (inter laboratoire).

* **Répétabilité** : Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

* **Fidélité intermédiaire** : Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.

* **Reproductibilité** : Conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

V.2.3.7. Justesse (Biais)

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur de référence acceptée (ex : standard international, standard d'une pharmacopée).

La mesure de la justesse est généralement exprimée en terme de biais ou de pourcentage de recouvrement (erreur systématique).

V.2.3.8. Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée. L'étroitesse de l'accord ainsi observé est la résultante de la somme des erreurs

systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

V.2.3.9. Limite de quantification

La limite de quantification est la petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions décrites avec une exactitude définie.

V.2.3.10. Intervalle de dosage

L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour lequel il a été démontré que la procédure est appropriée quant à la fidélité, l'exactitude et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite.

V.2.3.11. Linéarité

La linéarité d'une méthode analytique est son habilité dans un intervalle de dosage défini à obtenir directement des résultats proportionnels à la concentration (quantité) de l'analyte dans l'échantillon (Chapuzet, 1997 ; Hubert, 2003 ; FDA, 1995).

V.3. Développement et validation d'une méthode de quantification des stérols et triterpènes dans la partie aérienne de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders par chromatographie en phase gazeuse

V.3.1. Introduction

À notre connaissance, aucune méthode de quantification des ces stérols et triterpènes dans cette plante n'a été rapportée dans la littérature. Mais cette dernière fait état de la quantification de ces composés dans les huiles extraites des graines d'autres plantes (Sanda, 1997 ; Bryan, 2000 ; kpoviéssi, 2004). Nous avons développé dans cette partie une méthode de quantification des stérols et triterpènes par chromatographie gazeuse. La méthode a impliqué l'extraction au soxhlet suivie d'une purification par extraction en phase solide (SPE) qui a été optimisée pour éliminer des impuretés de l'extrait brut avant la quantification GC-FID des stérols et triterpènes. Cette méthode a non seulement permis de quantifier des stérols et triterpènes dans la partie aérienne de *Justicia anselliana* mais elle a été complètement validée pour être appliquée à la détermination quantitative de stérols et triterpènes dans différents échantillons de *Justicia anselliana*.

V.3.2. Matériel et méthodes

V.3.2.1. Produits Chimiques et réactifs.

Dichlorométhane (DCM), hexane, méthanol et acétate d'éthyle de grade HPLC sont obtenus chez Fisher scientific. Le triacontane est de Fluka AG, Buchs SG (Switzerland). Les stérols et triterpènes de référence sont obtenus de Extrasynthèse (GENAY France).

V.3.2.2. Matériel végétal.

La partie aérienne de *Justicia anselliana* a été collectée dans la vallée de l'Ouémé (Sud du Bénin). Un spécimen (n°: AA6295/UNB) a été déposé à l'Herbier National de l'Université d'Abomey - Calavi (République du Bénin).

V.3.2.3. Standard interne.

Dans le but d'éviter les erreurs dues aux injections manuelles, nous avons décidé d'utiliser un standard interne qui n'interfère pas avec les composés de l'extrait: nous avons choisi le triacontane (C₃₀) à la concentration de 0.1 mg/ml dans le dichlorométhane. Tout échantillon est dissous dans la même solution de standard interne avant son injection. Les facteurs de réponse sont calculés en thème de rapport de surfaces sous pics avec la formule suivante:

$$\frac{\text{Aire du pic du composé analysé}}{\text{Aire du pic de C}_{30}}$$

V.3.2.4. Extraction du matériel végétal

V.3.2.4.1. Méthode d'extraction

Le matériel végétal séché et pulvérisé (10g) a été extrait avec 400ml de dichlorométhane (DCM) dans le soxhlet pendant 8h. L'extrait a été séché sous pression réduite à 30°C. Cette procédure a été exécutée sur trois échantillons différents du même latex pour déterminer le taux de l'extraction. Le schéma de l'extraction est présenté dans la figure 37.

V.3.2.4.2. Temps optimal d'extraction.

Dans le but de déterminer le temps nécessaire pour obtenir le meilleur taux d'extraction des stérols et triterpènes, le pourcentage de ces composés extraits a été évalué à différents intervalles de temps d'extraction au soxhlet. Après chaque intervalle de temps testé (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8h), le solvant est renouvelé. Les solutions issues de l'extraction sont évaporées sous pression réduite à 30° C. Les extraits secs obtenus à différents

intervalles de temps d'extraction sont chacun dissous dans la même quantité (10 ml) de DCM+ C₃₀ et introduits dans le système de GC.

V.3.2.4.3. Récupération de l'extraction au soxhlet.

Le taux de récupération est déterminé comme suit : 10g de parties aériennes (S1) d'une part et 10g de parties aériennes additionnés de 1mg de lupéol ou stigmastérol (S2) d'autre part sont soumis à 8 heures d'extraction au soxhlet avec 400 ml de DCM. Ces solutions sont évaporées à sec et dissoutes dans 10 ml de DCM+C₃₀. Enfin, 1mg de lupéol ou stigmastérol est directement dissout dans 10 ml de DCM+C₃₀ pour préparer la troisième solution (S3). Pour chacune des trois solutions (S1), (S2) et (S3), 1µl est injecté chacun trois fois dans le GC. Le taux de récupération est calculé par la formule suivante :

$$\frac{S2 - S1}{S3} \times 100$$

S1, S2 et S3 sont les réponses respectives de (S1), (S2) et (S3).

V.3.2.5. Purification de l'extrait.

V.3.2.5.1. Méthode de purification

50 mg de l'extrait dichlorométhanique dissous dans 1ml de DCM sont appliqués sur une colonne SPE remplie de 1g de gel de la silice (spe Bakerbond Si, 1g, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA). La SPE est ensuite séchée sous vide pendant 2h à température ambiante puis éluée avec 5 ml de Hexane (Hex) (F1), suivi de 8 ml de Hexane-Acétate d'éthyle (EtOAc) (80-20)(F2) et finalement avec 10 ml de Méthanol (MeOH) (F3). La fraction (F2) contient les sterols et triterpènes purifiés. Cette opération est répétée trois fois sur le même extrait dichlorométhanique afin de déterminer le rendement. (F2) est évaporée à sec sous flux d'azote, à température ambiante. Toute la fraction F2 est dissoute dans 5 ml de DCM+C₃₀ avant injection dans le système chromatographique.

V.3.2.5.2. Récupération absolue de la purification par SPE.

50 mg de l'extrait dichlorométhanique sont soumis à la purification par SPE comme décrit précédemment. La fraction (F2) est dissoute dans 5 ml de DCM+C₃₀. (F2) et l'extrait dichlorométhanique sont injectés dans le GC. Le taux de recouvrement absolu de tous les stérols et triterpènes est déterminé par comparaison des rapports d'aire de chaque stérol ou triterpène dans (F2) à ceux des mêmes stérols ou triterpènes dans l'extrait dichlorométhanique (considéré comme à 100%) (Chapuzet, 1997; Hubert, 1999; Hubert, 2003; Block, 2005). Pour chaque composé, le rapport des aires dans les deux solutions est mesuré et le taux de récupération correspondant est calculé avec la formule suivante:

$$\frac{\text{Rapport d'aire de stérol ou triterpène dans (F2)}}{\text{Rapport d'aire de stérol ou triterpène dans l'extrait dichlorométhanique}} \times 100$$

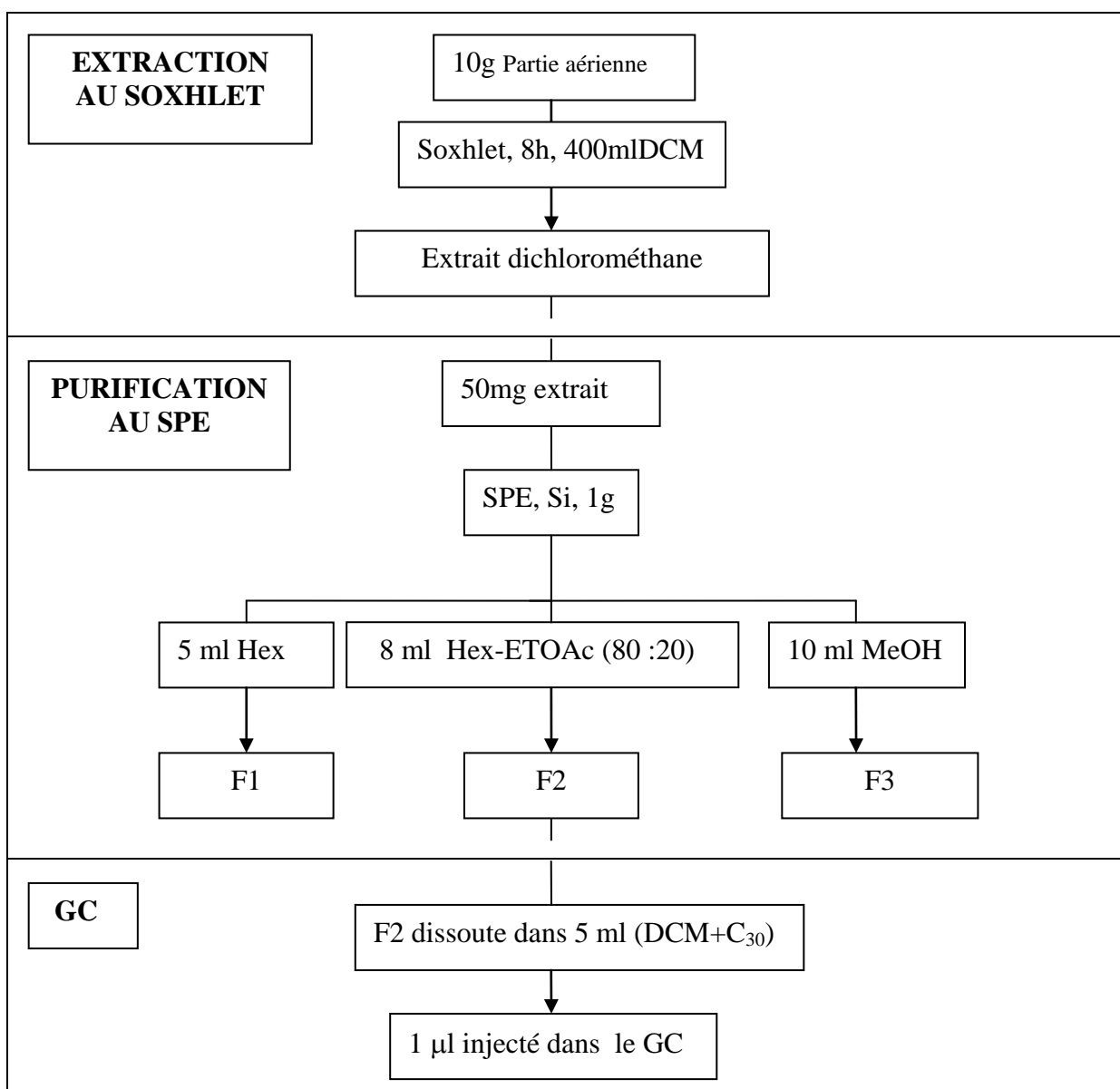


Figure 37. Schéma de préparation de l'échantillon à injection

V.3.2.6. Taux de récupération total

Le taux de récupération total est déterminé de la façon suivante : 10g de la partie aérienne (S1) et 10 g de la partie aérienne + 1 mg de chaque stérol et triterpène à quantifier (S2) sont soumis à 8 h d'extraction au soxhlet avec 400 ml de DCM. Ces solutions sont évaporées à sec et soumises par fraction de 50 mg à la purification au SPE comme décrit précédemment, pour donner les fractions F2(S1) et F2(S2) qui sont ensuite dissoutes dans 10 ml de DCM+C₃₀. Finalement, 1mg de chaque stérol et triterpène est directement dissous dans 10 ml de DCM+C₃₀ pour préparer les solutions (S3). 1µl des solutions

F2(S1), F2(S2) et S3 est injecté trois fois pour chacune au GC. Le taux de récupération total est calculé par la formule suivante:

$$\frac{F2(S2) - F2(S1)}{S3} \times 100$$

V.3.2.7. Analyse chromatographique

V.3.2.7.1. Analyse GC-FID.

L'analyse est réalisée sur un FOCUS GC (ThermoFinnigan, Strada Rivoltana-20090 Rodano (Milan)-Italy) équipé d'une colonne capillaire DB-XLB (J&W Scientific Column de Agilent Technologies, N° US1670726A, USA) de dimensions 15 m x 0.25 mm avec 0.25 µm de diamètre interne. Les échantillons sont injectés en mode splitless (volume injecté température à l'entrée: 300°C, débit du split: 10ml/min, temps du splitless: 0.80min). La température du four est programmée de la façon suivante: température initiale 200 °C suivie d'un gradient de 10 °C/min juste qu'à 320 °C puis d'un palier isotherme de 320 °C pendant 25min. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1.2 ml/min. La température du détecteur FID est de 320°C. Les données sont enregistrées et traitées avec le logiciel ChromCard.

V.3.2.7.2. Analyse GC-MS.

Dans le but de confirmer la spécificité et la sélectivité de la méthode GC, des analyses GC-EIMS ont été réalisées sur un TRACE GC 2000 séries (ThermoQuest, Rodano, Italy), équipé d'un autosampler AS2000 (ThermoQuest). Le système GC est couplé à un spectromètre de masse de type Trace MS (ThermoQuest) opérant en mode d'impact électronique. La même colonne capillaire (DB-XLB) est utilisée avec les mêmes conditions d'injection, de débit de l'hélium et de programmation de la température du four. La température de couplage du GC est de 320 °C. L'énergie des électrons est de 70 eV et la source des électrons est à 250 °C. Les données sont enregistrées et analysées avec le logiciel Xcalibur 1.1 (ThermoQuest). Les spectres de masse des pics dans la fraction

SPE (F2) et dans l'extrait dichlorométhanique sont analysés et comparés aux composés de référence.

V.3.2.7.3. Identification des pics.

Les stérols et triterpènes sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention chromatographiques et de leurs spectres de masse avec ceux des composés de référence.

V.3.2.8. Méthodes de quantification

V.3.2.8.1. Facteur de réponse.

Les facteurs de réponse de tous les stérols et triterpènes à quantifier sont évalués par injection au GC de la même concentration de chaque stérol ou triterpène (0.2 mg/ml dans DCM+ C₃₀). Les rapports des aires de tous les stérols et triterpènes sont comparés.

V.3.2.8.2. Méthode d'addition de standard.

Quatre différentes concentrations du lupéol et stigmastérol (5, 25, 100, 500 µg/ml; m = 4) sont additionnées à une solution de 2 mg/ml de la fraction (F2). Ces fractions additionnées de standard de même que les fractions pures (F2) sont utilisées pour déterminer la quantité de lupéol et stigmastérol dans F2 par la méthode d'addition de standard mais aussi pour tester un possible effet de matrice sur la quantification des stérols et triterpènes. Toutes ces solutions sont chacune injectées trois fois au GC (n = 3).

V.3.2.8.3. Méthode de calibration externe de courbe.

Une courbe de calibration externe est construite par injection à trois reprises (n = 3) de quatre différentes concentrations (5, 25, 100, 500 µg/ml dans DCM+ C₃₀) de lupéol et de stigmastérol (m = 4), d'abord dans le but d'estimer la quantité de lupéol et de stigmastérol dans l'extrait final. Dans les phases de validation et de prévalidation, cette opération est répétée pendant 3 différents jours (k = 3) afin de déterminer la précision intra et inter jour, la justesse et l'exactitude de la présente méthode. La courbe de calibration sera finalement utilisée dans les analyses de routine.

V.3.2.9 Analyse des données.

Les données à valider sont enregistrées et analysées par le logiciel e.noval v1.1a (Arlenda, Liège, Belgium).

V.3.3. Résultats et discussion

V.3.3.1. Extraction au soxhlet et purification par Extraction en Phase Solide (SPE).

10 g de la partie aérienne séchée et pulvérisée de *Justicia anselliana* donnent 346.35 ± 1.05 mg (n = 3) d'extrait brut dichlorométhanique et 50 mg de cet extrait purifié au SPE produit 12.68 ± 0.56 mg (n = 3) de fraction (F2).

La première étape dans le développement de la méthode de quantification de stérols et triterpènes dans la partie aérienne de *Justicia anselliana* a consisté en la détermination de la durée convenable pour l'extraction au soxhlet. Pour cela, le facteur de réponse de chaque stérol et triterpène dans l'extrait dichlorométhanique est évalué à différents temps d'extraction. Comme illustré sur la figure 2, un taux élevé de stérols et triterpènes est déjà extrait après une ½ heure d'extraction. Ce taux chute brusquement après 2 heures d'extraction avant de se stabiliser après 6 heures. Après 8 heures, l'extraction est complète et aucune différence significative entre 7 heures et 8 heures d'extraction n'est observée. Un temps d'extraction au soxhlet de 8 heures est finalement sélectionné dans le but de garantir une bonne reproductibilité du processus.

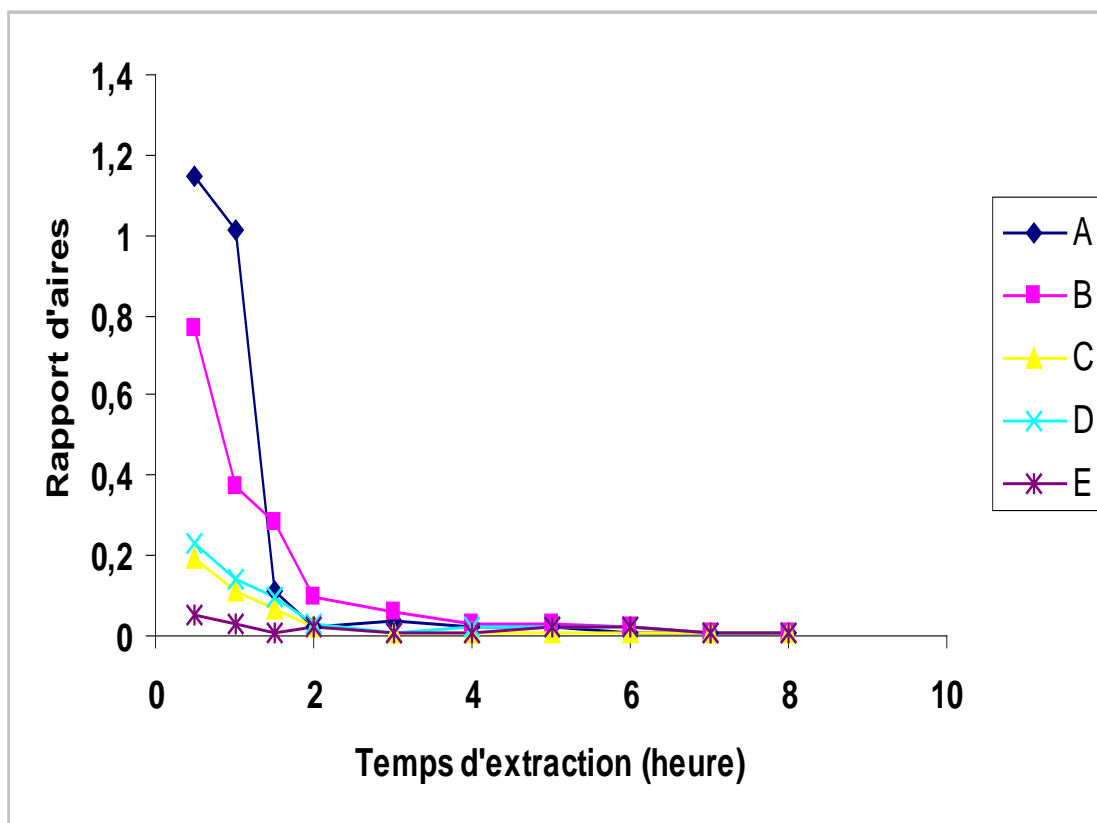


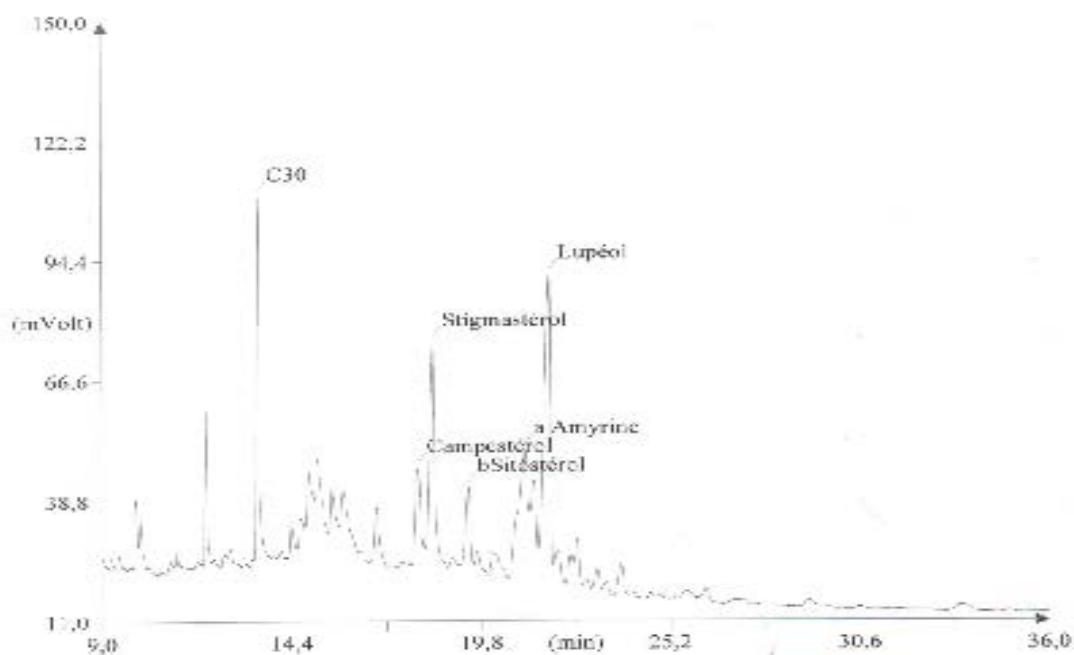
Figure 38. Facteur de réponse en fonction du temps d'extraction des stérols et triterpènes dans l'extrait dichlorométhanique. **A**=Lupéol; **B**=Stigmastérol; **C**=β-Sitostérol; **D**=Campestérol; **E**=α-Amyrine.

Comme présentés dans le Tableau 24, les taux moyens obtenus après 8 heures d'extraction pour le lupéol et le stigmastérol sont respectivement de $93.81 \pm 2.2\%$ ($n = 9$) et $96.49 \pm 2.0\%$ ($n = 9$). Comme nous le montrerons plus loin, le stigmastérol et le lupéol serviront respectivement de référence pour la quantification des autres stérols et triterpènes. Il n'est donc pas nécessaire de déterminer le taux de récupération de ces derniers.

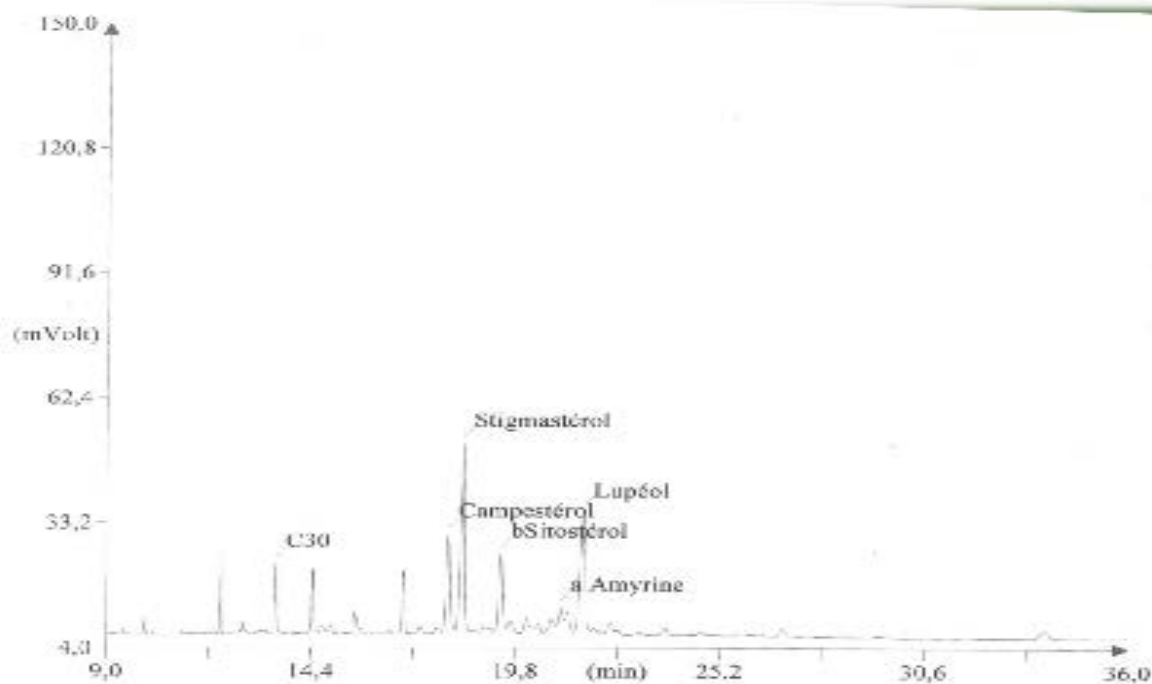
Tableau 24. Récupération de l'extraction et de la purification par SPE.

Composés	Taux de Récupération (%) (Nombre d'essais : n = 9)		
	Extraction au Soxhlet	Purification par SPE	Extraction suivie de purification
Triterpènes	Lupéol	93.81±2.2	90.28±3.7
	α-Amyrine		80.01±3.2
Stérols	Stigmastérol	96.49±2.0	91.64±3.4
	Campestérol		82.12±3.2
	β-Sitostérol		81.83±3.5

La deuxième étape de la méthode est la purification par SPE de l'extrait dichlorométhanique afin d'éliminer les composés à points d'ébullition élevés qui pourraient endommager la colonne du GC. La figure 39 montre les chromatogrammes de l'extrait et de la fraction F2 SPE. La comparaison des deux chromatogrammes prouve que la fraction (F2) contient les stérols et triterpènes purifiés. Comme le montre le tableau 24, de bons taux de récupération (> 80%) ont été obtenus pour les composés purifiés par SPE (Figure 40).



1



2

Figure 39. Chromatogrammes (GC-FID) des extraits dichlorométhane (1) et de la fraction SPE F2 (2) du *Justicia anselliana*. C₃₀ = standard interne.

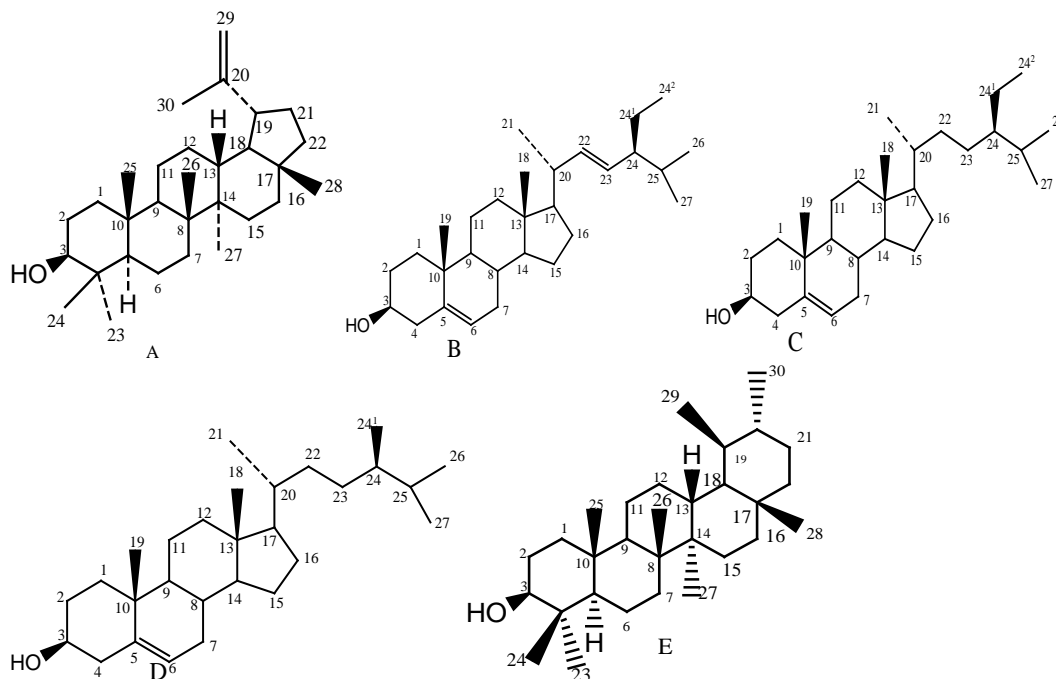


Figure 40. Structure des stérols (stigmastérol, campestérol, β -sitostérol) et triterpènes (lupéol, α -amyrine) quantifiés. A=Lupéol; B=Stigmastérol; C= β -Sitostérol; D=Campestérol; E= α -Amyrine

V.3.3.2. Validation de la Méthode

La validation comporte trois principales étapes: détermination de la quantité de stigmastérol (stérol) et de lupéol (triterpène) dans le matériel végétal, pré-validation, et validation ou étape formelle de validation.

V.3.3.2.1. Détermination de la quantité de lupéol et de stigmastérol contenus dans l'extrait dichlorométhanique.

Pour la quantification des stérols et triterpènes, des concentrations égales de chaque composé (0.2mg/ml) sont injectées au GC et leur facteur de réponse respectif est déterminé par détection FID. Comme présenté dans le tableau 25, aucune différence significative de facteurs de réponse n'est observée entre les stérols (0.55, 0.56 et 0.52) et entre les triterpènes (0.97 et 0.96); mais les facteurs de réponse des stérols sont très différents comparativement aux triterpènes. Par conséquent, le stigmastérol peut être utilisé comme référence pour la quantification d'autres stérols et le lupéol pour d'autres triterpènes.

Tableau 25: Comparaison des facteurs de réponse de s composés.

<i>Composés</i>	<i>Triterpènes</i>		<i>Stérols</i>		
	Lupéol	α -Amyrine	Stigmastérol	Campestérol	β -Sitostérol
Rapport d'aire (n = 3)	0.97	0.96	0.55	0.56	0.52
Ecart Type	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01

Deux différentes méthodes de quantification sont utilisées pour déterminer la quantité de lupéol et de stigmastérol dans l'extrait dichlorométhanique. Dans la première technique, un étalonnage externe de courbe de standard a été effectué en utilisant des quantités connues de produit à quatre différents niveaux de concentration allant de 5 à 500 $\mu\text{g/ml}$ (m = 4).

Les équations de régression de rapport d'aires y en fonction de la concentration x en $\mu\text{g/ml}$ du composé sont obtenues:

- pour le lupéol : $y = 0.0011x - 0.0005$ avec $R^2 = 0.9999$ (figure 41)
 - pour le stigmastérol : $y = 0.0005x + 0.0071$ avec $R^2 = 0.9998$ (figure 42).
- R^2 étant le coefficient de détermination.

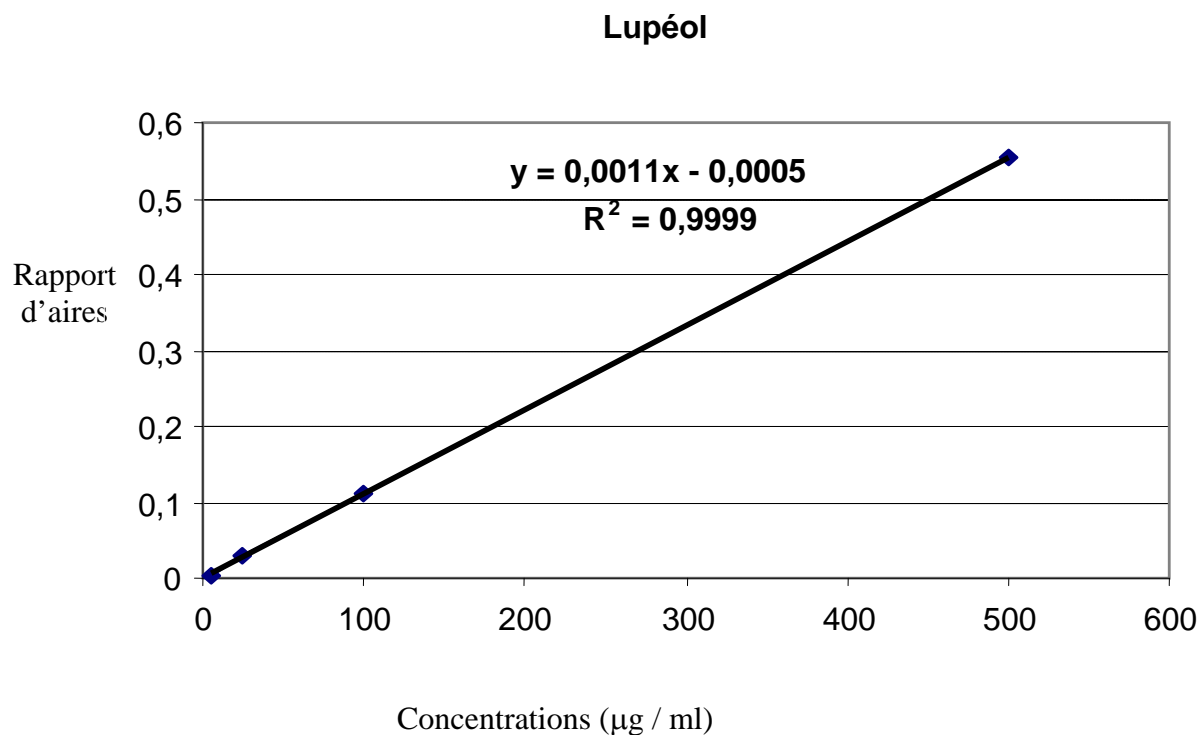


Figure 41: Modèle de régression linéaire de standard du lupéol par la méthode de l'étalonnage externe de courbe de standard.

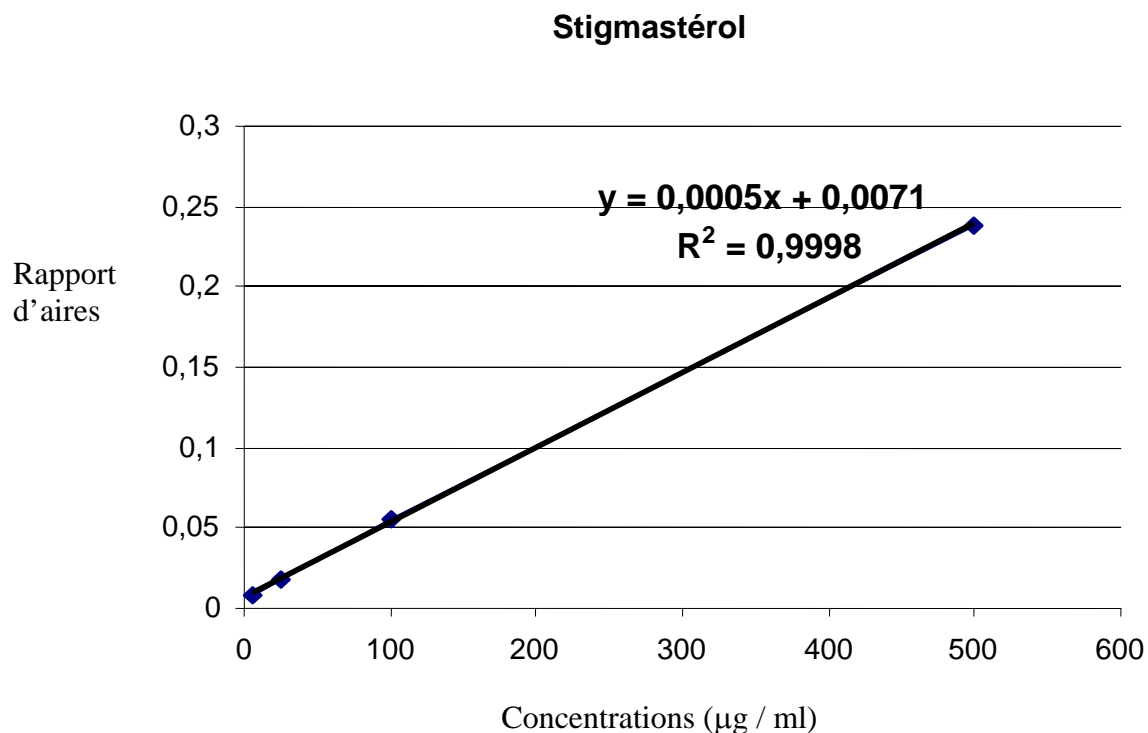


Figure 42: Modèle de régression linéaire de standard du stigmastérol par la méthode de l'étalonnage externe de courbe de standard.

L'utilisation de ces équations a permis d'obtenir dans l'extrait de plante étudié, des concentrations de $76.03 \pm 0.83 \mu\text{g/ml}$ pour le lupéol et de $77.80 \pm 3.24 \mu\text{g/ml}$ pour le stigmastérol. Pour confirmer ces résultats, la méthode d'addition de standard est utilisée (Miller, 2000). Dans cette méthode, quatre différents niveaux de concentration (5, 25, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$) pour le lupéol et le stigmastérol sont additionnés à l'extrait dichloromethanique pour obtenir les équations de régression suivantes:

- pour le lupéol : $y = 0.0011x + 0.0815$ ($R^2 = 0.9999$) (Figure 43)
- pour le stigmastérol $y = 0.0005 x + 0.0309$ ($R^2 = 0.9995$) (Figure 44).

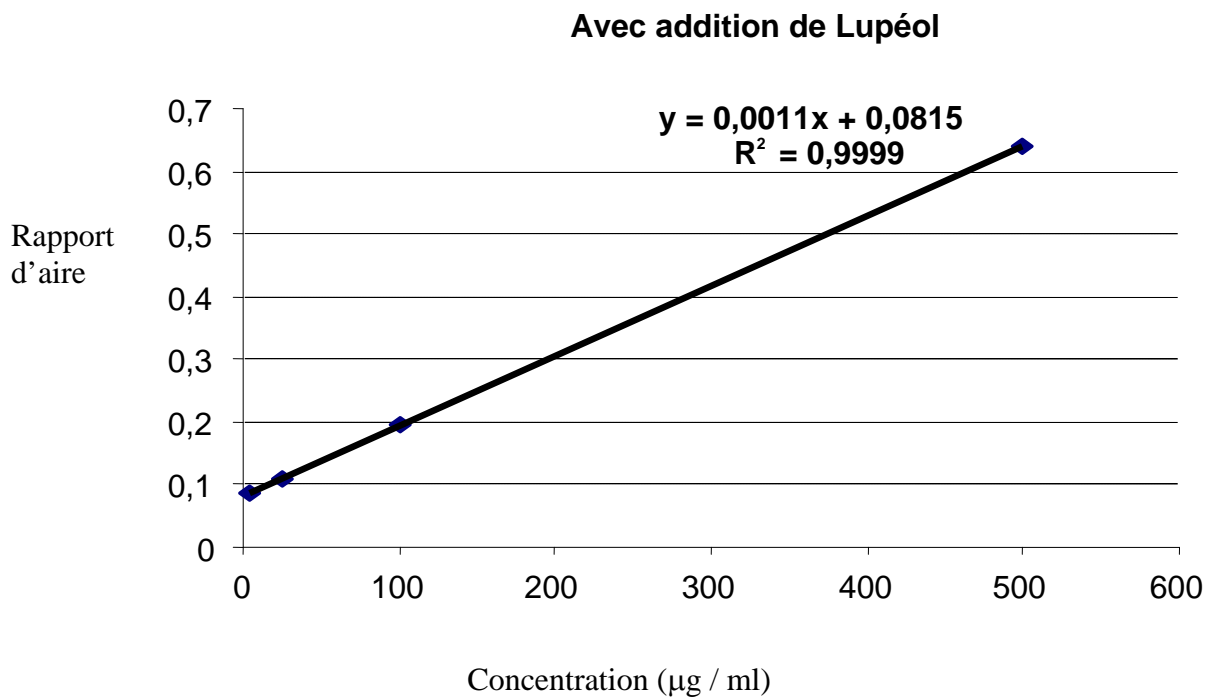


Figure 43: Modèle de régression linéaire de standard du lupéol par la méthode d'addition de standard.

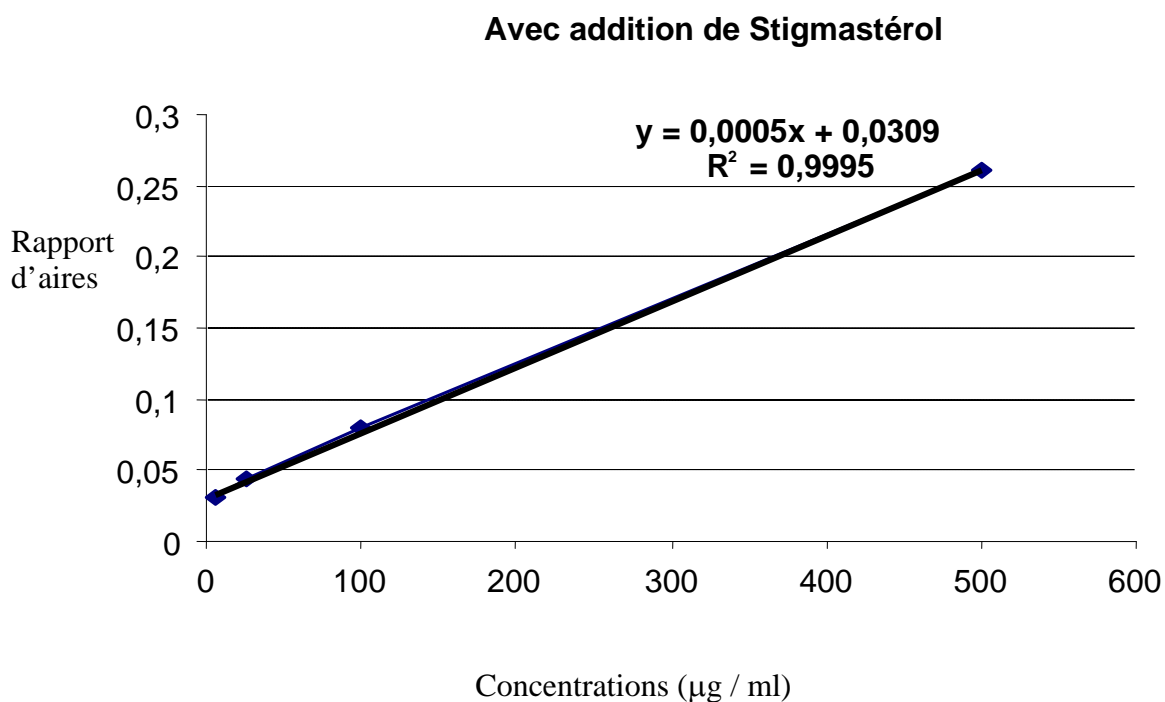
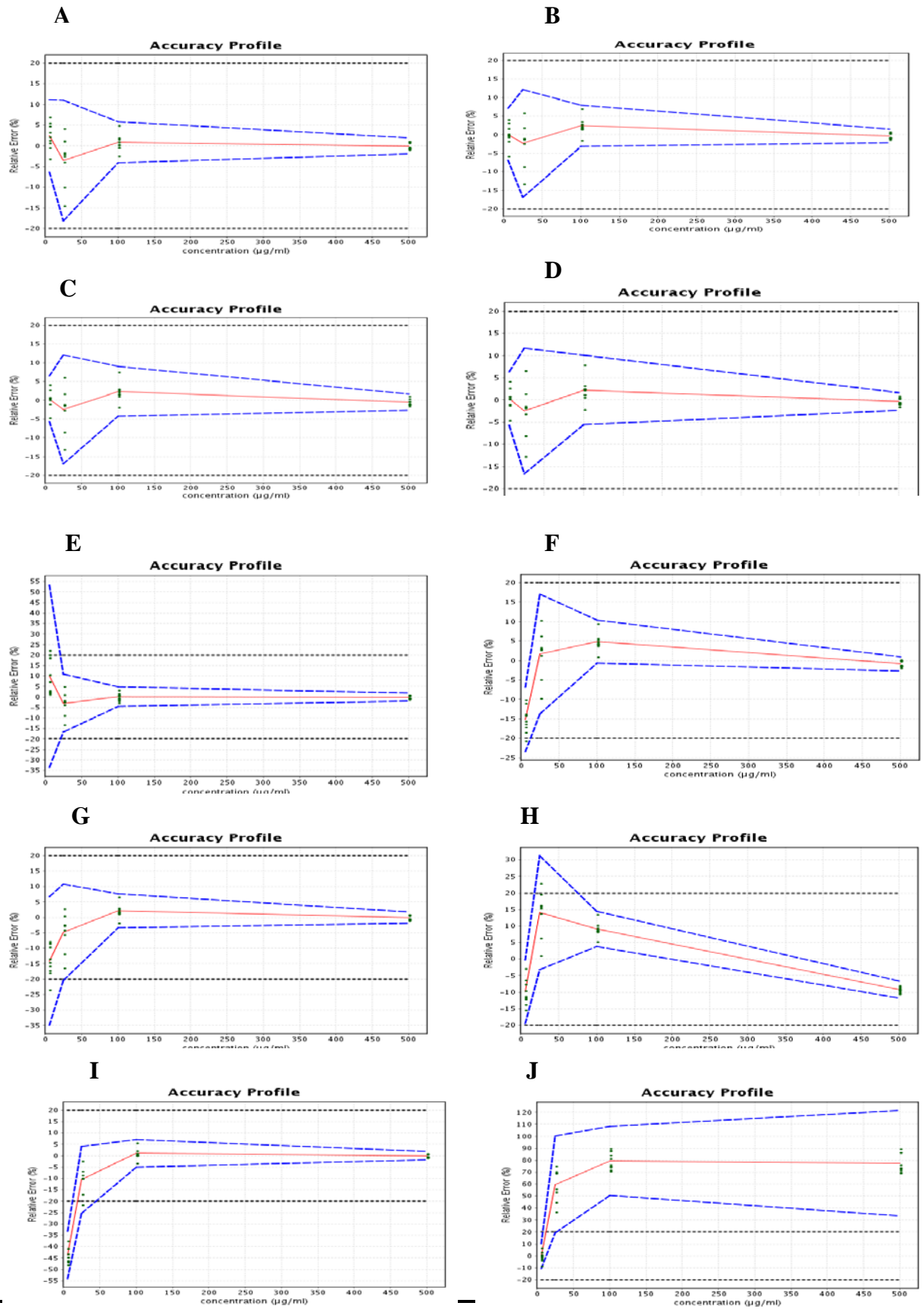


Figure 44: Modèle de régression linéaire de standard du stigmastérol par la méthode d'addition de standard.

Avec ces équations, les concentrations de 76.30 ± 1.10 $\mu\text{g/ml}$ pour le lupéol et de 76.20 ± 2.9 $\mu\text{g/ml}$ pour le stigmastérol sont obtenues dans l'extrait de plant injecté. La comparaison des concentrations calculées par les deux méthodes de quantification du lupéol (76.03 ± 0.83 $\mu\text{g/ml}$ et 76.30 ± 1.10 $\mu\text{g/ml}$) et du stigmastérol (77.80 ± 3.24 $\mu\text{g/ml}$ et 76.20 ± 2.9 $\mu\text{g/ml}$) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les concentrations ($p < 0.05$). De plus, les pentes des courbes d'étalonnage sont égales pour les deux méthodes (0.0011 pour le lupéol et 0.0005 pour le stigmastérol). Par conséquent, ces expériences préliminaires démontrent qu'une courbe d'étalonnage externe de lupéol ou stigmastérol peut être utilisée pour l'analyse en routine et aucun effet de matrice n'influence l'extrait au soxhlet (égalité des pentes).

V.3.3.2.2. Etape de prévalidation

Sur la base du protocole de prévalidation proposé par la Commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) (Chapuzet, 1997; Hubert, 1999; Hubert, 2003), les expériences effectuées dans cette étape permettent l'analyse de la fonction de réponse et la sélection du modèle de courbe d'étalonnage approprié pour l'étape de validation. Pour atteindre ce but, trois courbes d'étalonnage externe [k (nombre de jour d'analyses) = 3] sont construites dans l'intervalle de concentration de 5-500 $\mu\text{g/ml}$ [m (nombre de niveaux de concentration) = 4]. Chaque concentration est injectée trois fois ($n = 3$) par jour durant trois jours. Les profils d'exactitude obtenu par application de différents modèles de régression sont respectivement présentés sur les figures 45 (pour le lupéol) et 46 (pour le stigmastérol). La comparaison de ces profils permet de conclure que le modèle de régression linéaire pondérée est le plus convenable pour le lupéol et le modèle de régression quadratique pondérée pour le stigmastérol. Cependant, sur dix modèles utilisés, quatre profils sont dans les limites d'acceptation pour le lupéol [cf. Fig.45 (A), (B), (C) et (D)] pendant que pour les concentrations supérieures à 8.15 $\mu\text{g/ml}$, trois profils sont dans les limites d'acceptation pour le stigmastérol [cf. Fig.46 (A), (C) et (D)]. De l'analyse de ces profils d'exactitude, les modèles de régression linéaire pondérée et de régression quadratique pondérée bien connus sont respectivement choisis pour l'analyse quantitative du lupéol et du stigmastérol.



Identification et quantification d'allélochimiques de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders (Acanthaceae) et évaluation de leurs effets allélopathiques sur le niébé *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Figure 45. Profils d'exactitude (Accuracy profiles) des concentrations ($\mu\text{g/ml}$) du lupéol avec (A) régression quadratique pondérée " $1/X$ ", (B) régression linéaire pondérée " $1/X$ ", (C) régression linéaire pondérée " $1/X^2$ ", (D) régression quadratique pondérée " $1/X^2$ ", (E) régression quadratique, (F) régression linéaire après transformation par la racine carrée, (G) régression linéaire, (H) régression linéaire après transformation logarithmique, (I) régression linéaire à travers 0 utilisant seulement le plus haut niveau, (J) régression linéaire à travers 0 utilisant seulement le niveau 1. Relative bias (—), Limites d'acceptation (.....), Limits de tolérance au niveau Beta (- - - -), Concentrations relatives calculées en retour (■).

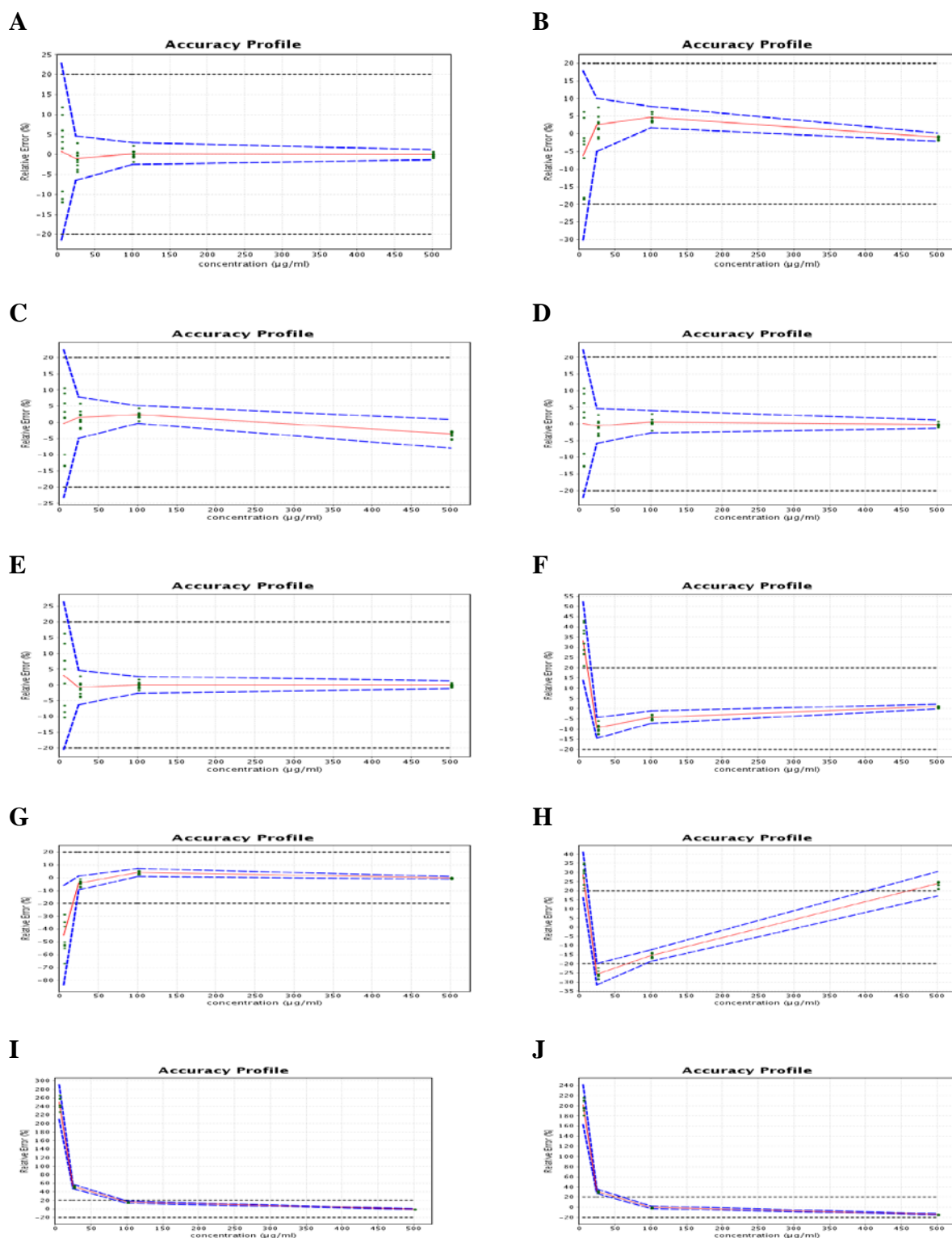


Figure 46. Profils d'exactitude (Accuracy profiles) des concentrations ($\mu\text{g/ml}$) du stigmasterol avec (A) régression quadratique pondérée " $1/X$ ", (B) régression linéaire pondérée " $1/X$ ", (C) régression linéaire pondérée " $1/X^2$ ", (D) régression quadratique pondérée " $1/X^2$ ", (E) régression quadratique, (F) régression linéaire après transformation

par la racine carrée, (G) régression linéaire, (H) régression linéaire après transformation logarithmique, (I) régression linéaire à travers 0 utilisant seulement le plus haut niveau, (J) régression linéaire à travers 0 utilisant seulement le niveau 1. Relative bias (—), Limites d'acceptation (•••••), Limits de tolérance au niveau Beta (— — — —), Concentrations relatives calculées en retour (•).

V.3.3.2.3. Etape de validation

Durant l'étape de validation, plusieurs critères ont été évalués comme: stabilité des stérol et triterpènes, sélectivité de la méthode, fonction de réponse, justesse, précision, exactitude, linéarité et limite de détection et de quantification.

* Stabilité

Pour l'étude de la stabilité des stérols et triterpènes, des stocks de solutions préparées dans du dichlorométhane sont conservées pendant 31 jours à 4°C et injectées au GC-MS dans le but de suivre la réponse de chaque composé et de détecter l'apparition de nouveaux pics. Aucune dégradation significative de stérols ou triterpènes n'est observée.

* Sélectivité

Afin de vérifier que la méthode peut être utilisée pour quantifier le lupéol et le stigmastérol avec d'autres stérols et triterpènes en présence d'autres composés dans la fraction (F2) et dans l'extrait dichlorométhanique, la sélectivité de la méthode analytique a été étudiée. Aucune source d'interférences endogènes n'est observée aux temps de rétention des analytes dans la fraction (F2)(SPE) (Fig.39).

* Fonction de réponse

Comme mentionné précédemment, pour la détermination de la fonction de réponse, une régression linéaire pondérée (pour le lupéol) et une régression quadratique pondérée (pour le stigmastérol) avec quatre niveaux de concentration (5, 25, 100, 500 µg/ml) sont employées (Tableau 26 et 27). Le coefficient de détermination (r^2) obtenu pour les droites de régression des deux produits démontre l'excellente relation entre le rapport d'aires de pics et la concentration.

* **Justesse**

Comme on peut le voir dans les Tableaux 26 et 27, la justesse est exprimée en termes de biais absolu (en $\mu\text{g/ml}$) ou de biais relatif (%) et a été répartie au moyen du standard de validation dans la matrice à quatre niveaux de concentration allant de 5 à 500 $\mu\text{g/ml}$ ($k = 3$, $n = 3$). Les valeurs moyennes sont très près des concentrations théoriques, illustrant ainsi la bonne justesse de la méthode.

Tableau 26. Résultats de validation de la méthode développée pour la quantification du lupéol

<i>Lupéol</i>			
Critère de validation			
Fonction de réponse ^a ($k = 3$, $m = 4$, $n = 3$) Facteur de pondération: $1/x$	Intervalle de dosage ($\mu\text{g/ml}$)	5-500	5-500
	Pente	1.118×10^{-3}	1.131×10^{-3}
	Interception	-2.590×10^{-3}	-2.562×10^{-3}
	R^2	0.9999	0.9997
			0.9999
Justesse ($k = 3$, $n = 3$)	Concentration	Biais absolu ($\mu\text{g/ml}$)	Biais relatif (%)
	5 $\mu\text{g/ml}$	5.373×10^{-3}	0.1075
	25 $\mu\text{g/ml}$	-0.6038	-2.415
	100 $\mu\text{g/ml}$	2.417	2.417
	500 $\mu\text{g/ml}$	-1.885	-0.3770
Fidélité ($k = 3$, $n = 3$)	Concentration	Répétabilité (CV%)	Fidélité intermédiaire (CV %)
	5 $\mu\text{g/ml}$	2.851	2.872
	25 $\mu\text{g/ml}$	5.951	5.951
	100 $\mu\text{g/ml}$	2.227	2.248
	500 $\mu\text{g/ml}$	0.7657	0.7657
Exactitude ($k = 3$, $n = 3$)	Concentration	Limite de tolérance attendue au niveau β ($\mu\text{g/ml}$)	
	5 $\mu\text{g/ml}$	4.653-5.358	
	25 $\mu\text{g/ml}$	20.76-28.04	
	100 $\mu\text{g/ml}$	96.9.0-107.9	
	500 $\mu\text{g/ml}$	488.7-507.5	
Linéarité ($k = 3$, $m = 4$, $n = 3$)	Intervalle de dosage ($\mu\text{g/ml}$)	5-500	
	Pente	0.9955	
	Interception	0.7227	
	R^2	0.9998	
Limite de détection	2.932 $\mu\text{g/ml}$		
Limite de quantification	5.000 $\mu\text{g/ml}$		

^a k = nombre de jours d'analyse ; m = nombre de niveaux de concentration; n = nombre de répétitions.

Tableau 27. Résultats de validation de la méthode développée pour la quantification du stigmastérol

<i>Stigmasterol</i>			
Critère de validation ^a			
Fonction de réponse ^a (k = 3, m = 4, n = 3)	Intervalle de dosage (µg/ml)	5-500	5-500
Facteur de pondération : 1/x	Pente	5.099 x 10 ⁻⁴	4.979 x 10 ⁻⁴
	Interception	5.518 x 10 ⁻³	5.998 x 10 ⁻³
	Terme quadratique	-8.676 x 10 ⁻⁸	-6.318 x 10 ⁻⁸
	R ²	0.9999	0.9999
Justesse (k = 3, n = 3)	Concentration	Biais absolu (µg/ml)	Biais relatif (%)
	5 µg/ml	3.606 x 10 ⁻²	0.7213
	25 µg/ml	-0.2389	-0.9557
	100 µg/ml	0.2435	0.2435
	500 µg/ml	-3.974 x 10 ⁻²	-7.948
Fidélité (k = 3, n = 3)	Concentration	Répétabilité (CV%)	Fidélité intermédiaire (CV%)
	5 µg/ml	9.056	2.274
	25 µg/ml	2.274	1.112
	100 µg/ml	1.112	0.5063
	500 µg/ml	0.5063	
Exactitude (k = 3, n = 3)	Concentration	Limite de tolérance attendue au niveau β (µg/ml)	
	5 µg/ml	4.928-6.144	
	25 µg/ml	23.37-26.15	
	100 µg/ml	97.52-103.0	
	500 µg/ml	493.8-506.2	
Linéarité (k = 3, m = 4, n = 3)	Intervalle de dosage (µg/ml)	5-500	
	Pente	1.0000	
	Interception	1.626 x 10 ⁻³	
	R ²	1.0000	
Limite de détection	0.4537 µg/ml		
Limite de quantification	8.148 µg/ml		

^a k = nombre de jours d'analyse; m = nombre de niveaux de concentration; n = nombre de répétitions.

*** Fidélité**

Pour chaque niveau de concentration du standard de validation, les variances de répétabilité et de fidélité intermédiaire de même que les coefficients de variation (CV) de la concentration estimée, sont enregistrés. Comme le montre les tableaux 26 et 27, les valeurs des coefficients de variation (CV) sont relativement faibles, inférieures à 5% sauf au niveau de la concentration de 25 µg/ml pour le lupéol (CV = 5.951%) et à la plus faible concentration de l'intervalle de dosage (5 µg/ml) pour le stigmastérol (CV = 9.056 %). Il faut noter que la variabilité est surtout due aux variations inter jours plutôt qu'aux variations intra jours, ce qui prouve la bonne fidélité de la méthode développée.

*** Exactitude**

L'exactitude de la méthode est évaluée. Les tableaux 26 et 27 montrent la plus faible et la plus forte limites de la zone dans laquelle la probabilité d'obtenir des mesures exactes est de 99% (β -Expectation tolerance limit) (Hubert P., 2003), exprimée en µg/ml et présentés comme une fonction des concentrations introduites. Tel qu'on peut le constater dans les résultats, la méthode proposée est exacte puisque les différentes limites du biais ne dépassent pas la limite d'acceptation (15%) pour chaque niveau de concentration pour le lupéol. Pour le stigmastérol la méthode est exacte pour tous les niveaux de concentration testés sauf pour le niveau le plus faible (5 µg/ml). Par conséquent l'intervalle dans lequel la méthode donne des mesures exactes est compris entre 8.148 µg/ml to 500 µg/ml pour le stigmastérol.

*** Linéarité**

Dans le but de démontrer la linéarité de la méthode, une droite de régression est établi avec les concentrations estimées ou calculées en retour pour toutes les séries (N = 36) prise comme une fonction des concentrations introduites en appliquant le modèle de régression linéaire basé sur la plus petite méthode des carrés. Les équations de régression suivantes ont été trouvées :

- pour le lupéol : $y = 0.9955 x + 0.7227$ (avec $R^2=0.9998$) (figure 47)

- pour le stigmastérol : $y = 1.000x + 1.626 \cdot 10^{-3}$ (avec $R^2= 1.0000$) (figure 48) ;

y = concentration calculée en retour (exprimées en $\mu\text{g/ml}$) et x = concentration introduite (exprimée en $\mu\text{g/ml}$).

A cause du logiciel les figures 46 et 47 ont donné les résultats de l'analyse en anglais.

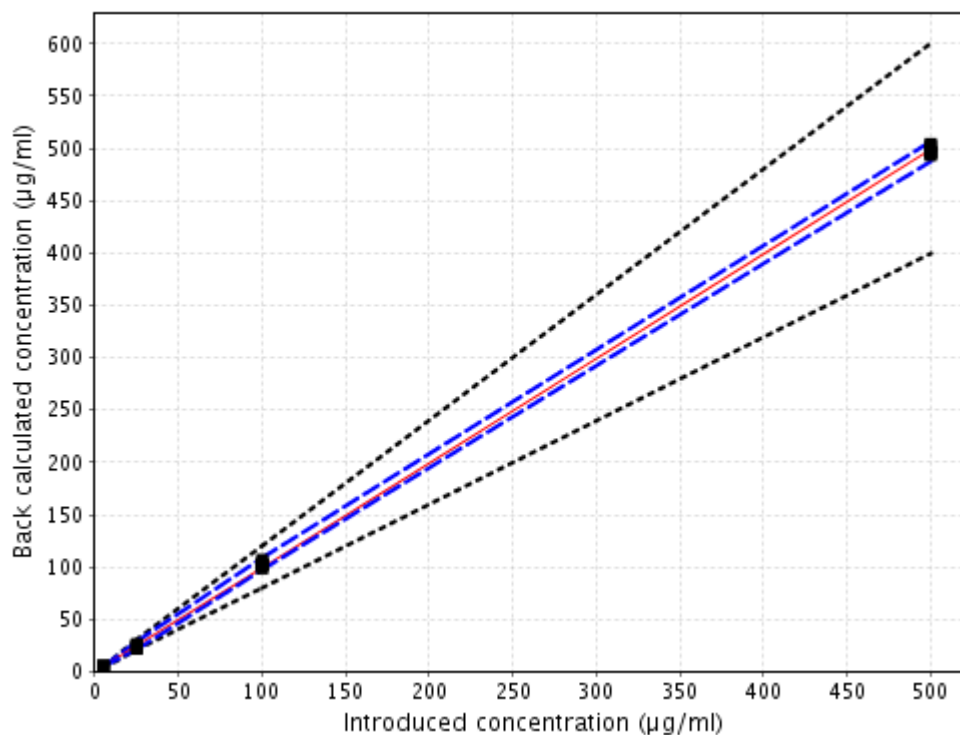


Figure 47 : Profil linéaire pour le lupéol.

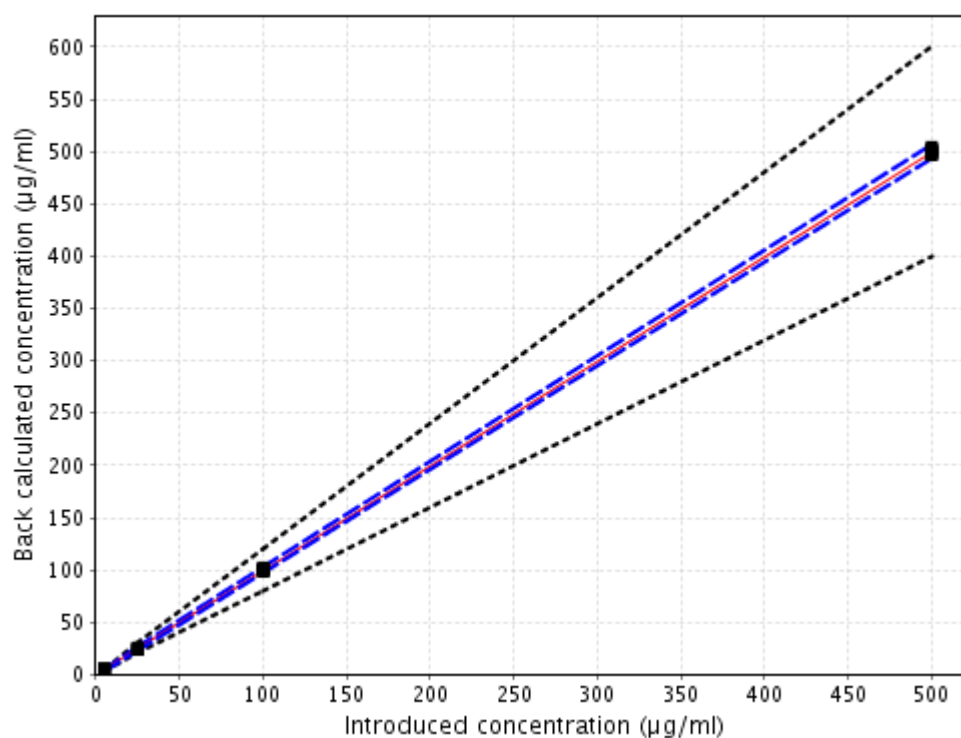


Figure 48 : Profil linéaire pour le stigmastérol.

*** Limite de détection et de quantification**

Enfin la limite de détection (LD) est estimée en utilisant le point d'interception principal du modèle d'étalonnage et de la variance résiduelle de la régression. [Miller, J.N. Miller, 2000]. Par application de cette méthode, la LD de la méthode développée est 2.932 µg/ml pour le lupéol et 0.4537 µg/ml pour le stigmastérol. Comme le profil d'exactitude est dans les limites d'acceptation, les limites de quantification (LQ) sont fixées à 5 µg/ml (i.e. le plus faible niveau de concentration utilisée) pour le lupéol (tableau 26) pendant qu'il a été déterminé que la plus petite concentration dans les limite d'acceptation pour le stigmastérol est 8.148 µg/ml (tableau 27).

V.3.4. Quantification des stérols et triterpènes

Les courbes d'étalonnage externe (5, 25, 100, 500 µg/ml) mentionnées précédemment sont utilisées pour la quantification des stérols et triterpènes, et les quantités aliquotes (1µl) de la fraction SPE F2 sont analysées trois fois (n = 3) au GC-FID. Aucune différence significative entre les facteurs de réponses des différents stérols d'une part et des différents triterpènes d'autres part n'est observée, mais les facteurs de réponse des

stérols sont différents de ceux des triterpènes, la quantité de stérols et triterpènes dans la partie aérienne du *Justicia anselliana* est calculée en utilisant les formules suivantes:

$$\text{Stérol ou Triterpène (mg/g partie aérienne séchée)} = \frac{C \times 5 \times 6.93}{10000 \times \frac{R}{100}}$$

Où

C est la concentration des triterpènes en µg/ml calculée avec l'équation du modèle de régression linéaire pondéré ou la concentration des stérols en µg/ml calculée avec l'équation du modèle de régression quadratique pondéré,

R est le taux de récupération totale (en pourcentage) des stérols et triterpènes correspondant (voire tableau 24) et

5 est le facteur de dilution car toute la fraction SPE F2 a été dissoute dans 5 ml de dichlorométhane.

6.93 est un facteur de dilution nécessaire car seuls 50 mg des 346.35 mg (Rendement d'extraction de 10 g de poudre) de l'extrait dichlorométhane sont déposés sur la colonne SPE.

Comme C est calculée en µg/ml, 10 000 sont le facteur de conversion de µg/10 g en mg/g.

Les résultats sont présentés dans le tableau 28 et montrent que la teneur des stérols et triterpènes dans l'ordre décroissant est : lupéol, campestérol, stigmastérol, β-stigmastérol, α-amyrine (figure 49).

Tableau 28. Quantité de stérols (stigmastérol, campestérol, β-sitostérol) et de triterpènes (lupéol, α-amyrine) dans la partie aérienne de *Justicia anselliana*.

		Quantité
Composés		(µg stérol ou triterpène/g partie aérienne séchée)
Triterpènes	Lupéol	292.44±1.75
	α-Amyrine	47.80±0.37
Stérols	Stigmastérol	206.06±1.33
	Campestérol	266.37±1.97
	β-Sitostérol	184.25±2.72

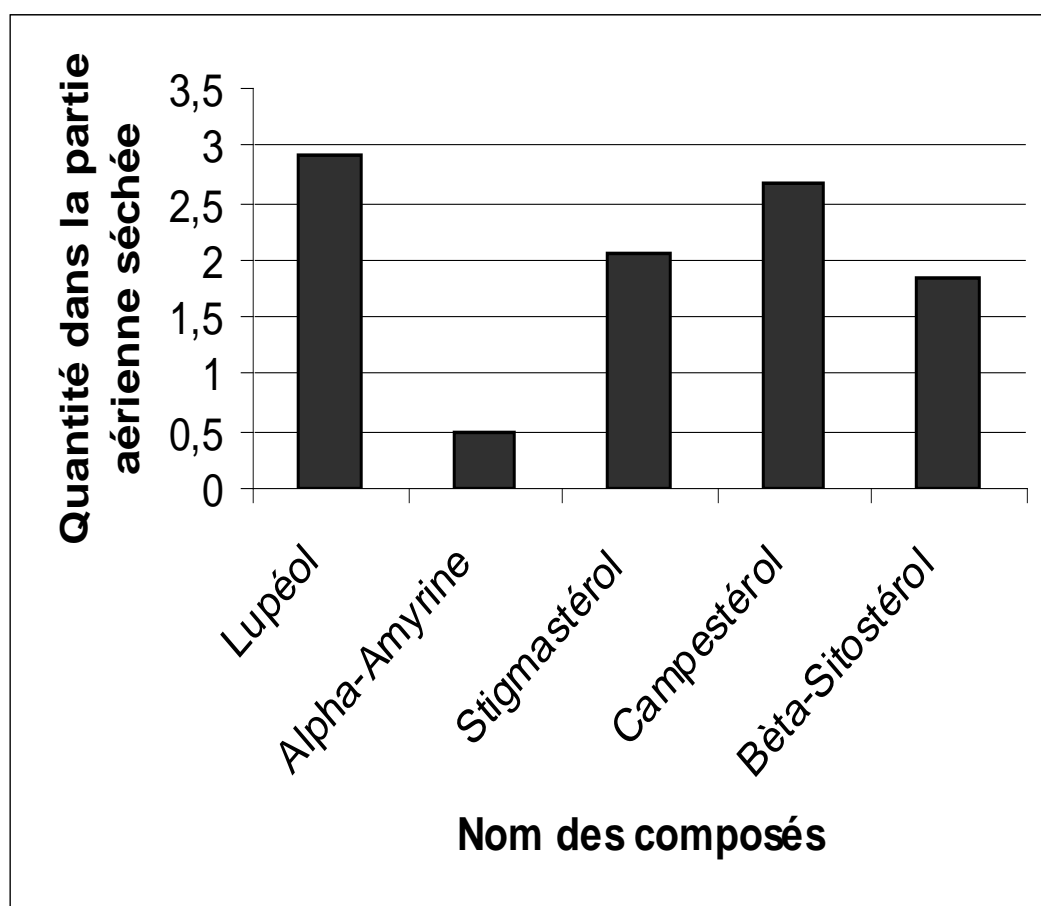


Figure 49 : Comparaison de la teneur en stérols (stigmastérol, campesterol, β -sitostérol) et triterpènes (lupéol, α -amyrine) dans la partie aérienne de *Justicia ancelliana*.

V.3.5. Conclusion

Une méthode exacte et sensible élaborée en combinant l'extraction au soxhlet, la purification par l'extraction en phase solide et la chromatographie gazeuse est décrite pour la détermination quantitative de deux triterpènes (lupéol et α -amyrine) et trois stérols (stigmastérol, campesterol, sitostérol) dans la partie aérienne de *Justicia ancelliana*. Cette méthode a montré que la partie aérienne de *Justicia ancelliana* contient 292.44 ± 1.75 $\mu\text{g/g}$ de lupéol, 47.80 ± 0.37 $\mu\text{g/g}$ de α -amyrine, 206.06 ± 1.33 $\mu\text{g/g}$ de stigmastérol, 266.37 ± 1.97 $\mu\text{g/g}$ de campesterol et 184.25 ± 2.72 $\mu\text{g/g}$ de β -sitostérol. C'est la première méthode qui décrit la quantification de stérols et triterpènes dans cet extrait brut. Elle a complètement été validée pour permettre de comparer la quantité de stérols et triterpènes dans d'autres échantillons de *Justicia ancelliana* et expliquer l'activité dû à ces composés.

Avec cette méthode quantitative, 1 g de *Justicia anselliana* contiennent 292.44 µg de lupéol, 266.37 µg de campestérol, 206.06 µg de stigmastérol, 184.25 µg de β-sitostérol et 47.8 µg de α-amyrine. La comparaison de ces résultats avec les résultats des tests allélopathiques à 200 µg/ml (section IV.5.2. figure 36) a montré que seuls le lupéol, le stigmastérol et le campestérol induisent réellement l'inhibition des paramètres de germination du niébé *Vigna unguiculata* (Figure 36). L' α-amyrine inhibe ces paramètres mais n'est pas suffisamment produit par la plante allélopathique ; alors que le β-sitostérol est produit en quantité suffisante mais son activité allélopathique n'est pas significative à cette dose.

V.4. Détermination de la teneur en tanins et en polyphénols totaux.

V.4.1. Introduction

Dans la bibliographie, les acides phénoliques ont des propriétés allélopathiques sur des semences de mono et dicotylédones (Mashkovska et al. 2004 ; Schulz et al., 1994). Le screening phytochimique a montré une présence abondante de tanins galliques et de tanins catéchiques seulement dans la partie aérienne de *Justicia anselliana* (tableau 12). Nous avons décidé dans une première étape de déterminer la teneur en tanins et en polyphénols totaux dans la partie aérienne et les racines de *Justicia anselliana*, afin de confirmer les résultats du criblage phytochimique ; et dans une deuxième étape, d'amorcer l'étude des effets allélopathiques dûs aux tanins de *Justicia anselliana*.

V.4.2. Matériel et Méthode

V.4.2.1. Quantification des tanins et polyphénols.

*** Extraction et dilution**

Toutes les opérations d'extraction et de dilution sont effectuées à l'abri de la lumière.

m_1 (g) (tableau 29) de plante pulvérisée (tableau 29) est introduit dans un ballon de 250 ml avec 150 ml d'eau Rectapur (R). Après un chauffage à reflux (100°C) au bain-marie pendant 30 min, le mélange est refroidi à l'eau courante puis transvasé dans une fiole jaugée de 250 ml. Le ballon est rincé et les eaux de rinçage introduites dans la fiole jaugée, puis le contenu complété à 250 ml avec de l'eau R. Après décantation, le liquide est filtré sur un papier filtre de 125 mm de diamètre. Les 50 premiers millilitres du filtra sont éliminés.

- **Polyphénols totaux**

Un prélèvement de 5 ml du filtrat est complété à 25 ml avec de l'eau R. A 2 ml de la solution ainsi préparée sont additionnés 1 ml de réactif phosphomolybdotungstique R et 10 mL d'eau R. Le mélange est ensuite complété à 25 ml avec une solution de carbonate de sodium R à 290 g/L. Son absorbance (A_1) est mesurée à la longueur d'onde de 760 nm après 30 min, avec l'eau R comme liquide de compensation.

- * **Polyphénols non absorbés par la poudre de peau.**

A 10 mL du filtrat sont ajoutés 0,10g de poudre de peau SCR. Après une forte agitation pendant 60 min, le mélange est filtré. 5 ml du filtrat sont complétés à 25 ml avec de l'eau R. A 2 ml de cette solution, sont ajoutés 1ml de réactif phosphomolybdotungstique R et 10 mL d'eau R. Le mélange est complété à 25 ml avec une solution de carbonate de sodium R à 290 g/l. Son absorbance (A_2) est mesurée à 760 nm après 30 min, avec l'eau R comme liquide de compensation.

- * **Témoin**

$m_2 = 50$ mg de pyrogallol R sont dissous immédiatement avant l'emploi, dans de l'eau R puis le mélange est complété à 100 ml avec de l'eau R. 5mL de cette solution sont complétés à 100 ml avec de l'eau R. A 2ml de cette solution, sont ajoutés 1ml de réactif phosphomolybdotungstique R et 10 ml d'eau R. Le mélange est complété à 25 ml avec une solution de carbonate de sodium R à 290 g/l. Son absorbance (A_3) est mesurée à 760 nm après 30 min, avec l'eau R comme liquide de compensation.

- ***Expressions**

- **Teneur pour cent en polyphénols totaux (PPT) exprimée en pyrogallol**

$$62.5 A_1 m_2 / A_3 m_1$$

- **Teneur pour cent en polyphénols non absorbés (PPNA) par la poudre de peau exprimée en pyrogallol**

$$62.5 A_2 m_2 / A_3 m_1$$

- **Teneur pour cent en tanins exprimée en pyrogallol**

$$62,5 (A_1 - A_2) m_2 / A_3 m_1$$

V.4.2.2. Extraction et Séparation des polyphénols du *Justicia ancelliana*.

* Extraction

La plante pulvérisée (10 g) est introduite dans un ballon de 250 ml avec 150 mL d'eau R. Après un chauffage (100°C) au bain-marie pendant 30 min, le mélange est refroidi à l'eau courante puis filtré sur un papier filtre de 125 mm de diamètre. Le filtrat est congelé, lyophilisé, pesé puis conservé à 5 -10 °C.

* Séparation des polyphénols par chromatographie liquide sous vide (CLV) sur Séphadex LH 20.

Pour le fractionnement de 100 mg d'extrait aqueux, 50g de Séphadex LH 20 sont utilisés. Le gel est trempé dans de l'éthanol pendant 24 heures et puis paqué dans une colonne (P2 ; B24). 400ml du mélange éthanol : eau 4 :1 sont passés à travers la colonne pour remplacer l'éthanol. L'extrait aqueux dissous dans 1.5 ml du même système de solvant est appliqué à la colonne qui est ensuite éluée avec 100ml d'éthanol, puis 50 ml du système acétone : eau 1 : 1.

L'éthanol contient la fraction sans polyphénols et le mélange acétone : eau la fraction polyphénolique. Chaque fraction est séché, pesé et conservé à 5 – 10 °C pour les tests allélopathiques.

V.4.2.3. Tests allélopathiques.

Les tests allélopathiques des fractions avec ou sans polyphénol sont réalisés suivant le même protocole que dans l'étape « IV.3.2.3. » des « Tests biologiques ».

V.4.3. Résultats et discussion

Les valeurs des absorbances mesurées sont présentées dans le tableau 29.

Tableau 29 : Absorbances mesurées à 760 nm

Paramètres mesurés	Partie aérienne		Racines	
m ₁	0.25g		1g	
m ₂	0.05g			
A ₁	0.321	0.307	0.226	0.205
A ₂	0.027		0.154	
A ₃	0.137			

A₁, A₂ et A₃ sont respectivement l'absorbance mesurée pour les solutions de polyphénols totaux, de polyphénols non absorbés par la poudre de peau et du témoin.

m₁ = masse de plante pulvérisée ; m₂ = masse de pyrogallol

V.4.3.1. Quantification des tanins et polyphénols.

La teneur en tanin, polyphénols totaux (PPT) et polyphénols non absorbés par la poudre de peau (PPNA) dans la partie aérienne et les racines de *Justicia anselliana* est résumée dans le tableau 30.

Tableau 30 : Pourcentage en tanins polyphénols totaux (PPT) et polyphénols non absorbés par la poudre de peau (PPNA) exprimé en pyrogallol dans la partie aérienne et les racines de *Justicia anselliana*.

<i>Justicia anselliana</i>	Pourcentage en tanins	Pourcentage en PPT	Pourcentage en PPNA
Partie aérienne	26.15 ± 0.64	28.65 ± 0.56	2.46 ± 0.26
Racine	1.40 ± 0.24	4.92 ± 0.32	3.51 ± 0.31

De l'analyse de ces résultats, il ressort que la partie aérienne est nettement plus riche en tanins et en polyphénols totaux (PPT) (26.149 ; 28.65 respectivement) que les racines (1.403 ; 4.92 respectivement) et que les racines contiennent un peu plus de polyphénols non retenus par la poudre de peau (PPNA) (figure 50). Mais la teneur en polyphénols non retenus par la poudre de peau est très faible dans les deux parties de la plante. Ces constats confirment les résultats obtenus par screening phytochimique.

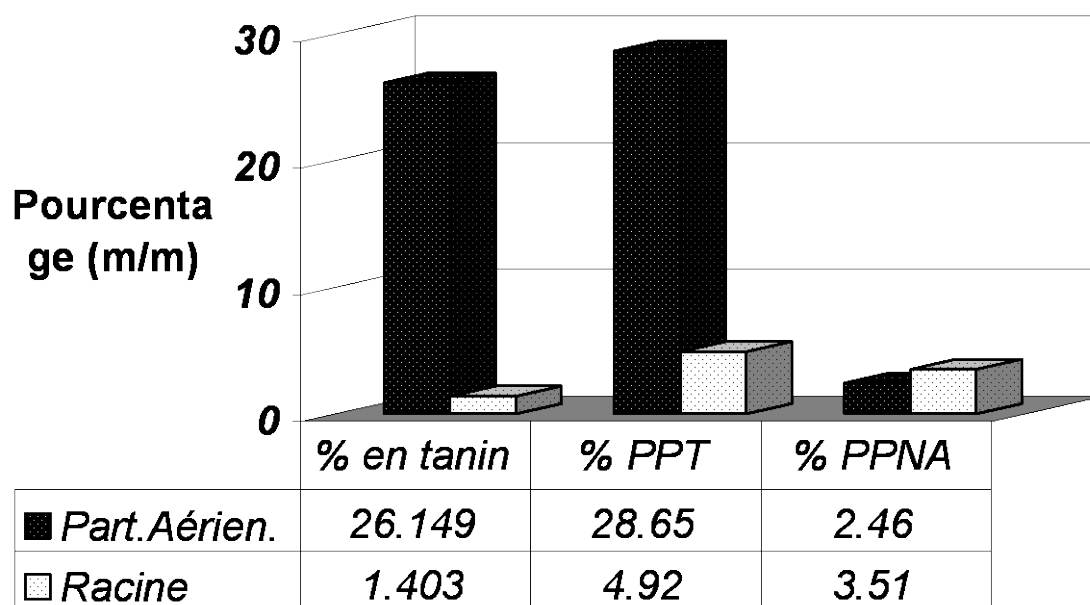


Figure 50 : Teneur en tanin, polyphénols totaux (PPT) et polyphénols non absorbés par la poudre de peau (PPNA) dans la partie aérienne et les racines de *Justicia ancelliana*.

V.4.3.2. Séparation et tests allélopathiques des tanins et polyphénols.

La partie aérienne de *Justicia ancelliana* a fourni deux fois plus d'extraits aqueux que ses racines (Tableau 31). Ces extraits (100 mg) ont été fractionnés par chromatographie liquide sous vide (CLV) sur Séphadex LH 20.

Tableau 31 : Masse d'extrait pour 10 g de poudre.

<i>Justicia anselliana</i>	Masse d'extrait pour 10 g de poudre
Partie aérienne	2.56 g
Racines	1.12 g

La masse des fractions avec et sans polyphénols obtenue par ce fractionnement est consignée dans le tableau 31.

Tableau 32 : Masses de fractions avec et sans polyphénols obtenues de 100 mg d'extrait.

<i>Justicia anselliana</i>	Fraction polyphénolique	Fraction sans polyphénol
Partie aérienne	26.75mg	41.70mg
Racines	21.01mg	57.12mg

Les tests allélopathiques ont montrés que les fractions aqueuses avec ou sans polyphénols sont toutes actives sur le niébé *Vigna unguiculata* (figure 51) mais leurs activités sont globalement plus faibles que celles des fractions étudiées (figure 30 ; section : IV.3.3.3. *Activité allélopathique des fractions*).

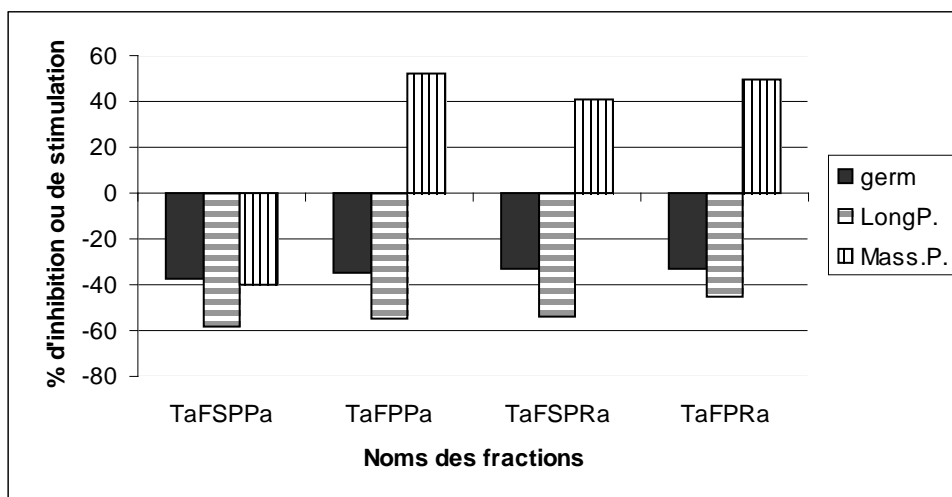


Figure 51 : Effets allélopathiques des fractions aqueuses. TaFSPPa = Fraction aqueuse sans polyphénols de la partie aérienne de *Justicia anselliana*. TaFPPa = Fraction aqueuse avec polyphénols de la partie aérienne. TaFSpra = Fraction aqueuse sans polyphénols des racines. TaFPra = Fraction aqueuse avec polyphénols des racines.

V.4.4. Conclusion

Le screening phytochimique a révélé la présence de tanins galliques et catéchiques essentiellement dans la partie aérienne de *Justicia anselliana*. Ces résultats ont été confirmés par la quantification des tanins du *Justicia anselliana* avec la méthode de la poudre de peau qui a permis de montrer que la partie aérienne de cette plante contient $26.15\% \pm 0.64\%$ de tanins et $28.65\% \pm 0.56\%$ de polyphénols totaux (PPT) au moment où ses racines contiennent seulement $1.40\% \pm 0.24\%$ et $4.92\% \pm 0.32\%$ respectivement. On note aussi une teneur très faible en polyphénols non retenus par la poudre de peau dans les deux parties de la plante ($2.46\% \pm 0.26\%$ dans sa partie aérienne et $3.51\% \pm 0.31\%$ dans ses racines). Les tests allélopathiques ont montré que les fractions aqueuses avec ou sans polyphénols sont toutes actives sur le niébé *Vigna unguiculata* mais leurs activités sont globalement plus faibles que celles de la fraction acétate d'éthyle étudiée. Il conviendra de poursuivre la purification des tanins afin d'approfondir leur étude.

VI Conclusion Générale et perspectives

VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.)Walp) est une plante légumineuse qui occupe une place importante dans l'alimentation au Bénin et dans plusieurs régions du monde. Il est cultivé dans toutes les zones tropicales, dans le bassin méditerranéen et aux Etats-Unis. Malheureusement sa culture au Sud du Bénin est perturbée par une plante allélopathique : le *Justicia anselliana*.

Le *Justicia anselliana* appartient à l'ordre des Personales, à la famille des Acanthacées, à la division des Lignosae et au genre *Justicia*.

L'allélopathie est le phénomène par lequel certaines adventices émettent dans leur entourage des substances chimiques qui ralentissent la croissance d'autres espèces ou inhibent le développement de celles-ci. La maîtrise des substances allélochimiques de *Justicia anselliana* peut conditionner le choix des moyens de protection du niébé.

Des études publiées sur le genre *Justicia* ont indiqué la présence de terpènes, de stérols, de flavonoïdes, de lignanes..... Mais aucun travail n'a été précédemment effectué sur la détermination de la composition chimique de *Justicia anselliana*.

Nous avons tout d'abord réalisé le criblage phytochimique de la plante qui a révélé la présence de flavonoïdes, de leucoanthocyanes et des huiles essentielles aussi bien dans la partie aérienne que dans les racines de la plante ; des tanins galliques et catéchiques dans sa partie aérienne avec des stérols et triterpènes, et des anthocyanes dans ses racines.

Ensuite une étude des composés volatils du *Justicia anselliana* a été entreprise, qui a permis de montrer la présence d'huiles essentielles. Ces huiles essentielles en faible quantité, contiennent en majorité des terpènes: le β -phellandrène et le δ -2-carène dans la partie aérienne; et dans la partie souterraine le δ -3-carène et l' α -phellandrène accompagnés d'un aldéhyde aromatique (le phényl acétaldéhyde) et d'une cétone aliphatique (la 6-méthyl hept-5-ène-2-one).

En dehors de l'eau florale qui n'a pas un effet remarquable sur la germination du niébé, toutes ces huiles de même que les composés carbonylés inhibent de façon significative la germination et les paramètres de croissance de la plantule du niébé. Ces produits ont un effet toxique sur sa croissance en hauteur. Cet effet se traduit par le ralentissement du développement des racines et un jaunissement des feuilles de niébé à partir de la deuxième semaine de traitement. On note également une spécificité de l'action des

allélochimiques volatils du *Justicia anselliana* en observant leurs influences sur les paramètres de germination du niébé comparativement au maïs et à l'arachide.

La partie suivante de ce travail a été consacrée à l'étude des composés moins volatils de *Justicia anselliana*. Après avoir montré que l'extrait éthanolique de la partie aérienne de cette plante est le plus concentré en allélochimiques, nous avons entrepris d'identifier et d'isoler les composés actifs de cet extrait. Pour cela, nous avons développé une méthode de fractionnement de l'extrait brut le plus actif par extractions liquide – liquide à température ambiante et au soxhlet, par chromatographie liquide sous vide (CLV), par chromatographie sur couche mince (CCM) préparative et par chromatographies liquide à moyenne pression (MPLC). On a ainsi obtenu les fractions actives sur le niébé et montré que les fractions allélopathiques n'étaient pas cytotoxiques sur les cellules de mammifères. L'analyse de ces fractions par chromatographie sur couche mince a conduit à des informations préliminaires sur leurs composés majoritaires. Certains des composés majoritaires de la fraction la plus active ont ensuite été isolés après une mise au point de techniques de séparations par chromatographies sur colonnes à moyenne pression (MPLC). Leurs structures ont été élucidées grâce à l'interprétation des données fournies par la spectrométrie de masse et la RMN et confirmées par analyse en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). D'autres allélochimiques de *Justicia anselliana* ont été identifiées par des méthodes analytiques de pointe comme la GC/MS.

Grâce à ces travaux nous avons pu finalement identifier pour la première fois dans le *Justicia anselliana* 12 molécules : l'acétate de β -sitostérol, le β -sitostérol, le campestérol, le stigmastérol, le phytol, le 9, 19-cyclolanostan-3-ol-24-méthylène, le 9,19-cyclolanost-24-èn-3-ol, le lupéol, l' α -amyrine, l'heneicosane, le palmitate d'éthyle et la rutine.

En dehors de la rutine qui n'a pas d'effet sur l'un des paramètres de germination du niébé (le taux de germination), tous les autres principes actifs isolés et / ou identifiés dans le *Justicia anselliana* et testés, ont un effet allélopathique (de stimulation ou d'inhibition) sur le taux de germination, l'élongation et le poids frais du niébé. Les effets d'inhibition des trois paramètres de germination se retrouvent avec les stérols et triterpènes du *Justicia anselliana* qui ne sont pas cytotoxiques sur les cellules de mammifères.

Cette étude phytochimique a conduit à l'isolement, l'identification et la détermination de structure des composés présents dans l'extrait éthanolique de *Justicia anselliana* et a

permis de réaliser des avancées importantes dans la connaissance phytochimique du *Justicia anselliana*. Nous avons ainsi montré que la partie aérienne de cette plante est riche en stérols et triterpènes. Ces molécules se retrouvent dans d'autres espèces de *Justicia* confirmant ainsi la chimiotaxonomie de ce genre.

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons développé une méthode exacte et sensible en combinant l'extraction au soxhlet, la purification par l'extraction en phase solide et la chromatographie gazeuse, pour la détermination quantitative de deux triterpènes (lupéol et α -amyrine) et trois stérols (stigmastérol, campestérol, sitostérol) dans la partie aérienne de *Justicia anselliana*. Nous avons à partir d'un stérol et d'un triterpène de référence, pu accéder aux quantités de stérol et triterpène contenues dans la partie aérienne de la plante : 292.44 ± 1.75 $\mu\text{g/g}$ de lupéol, 47.8 ± 0.37 $\mu\text{g/g}$ de α -amyrine, 206.06 ± 1.33 $\mu\text{g/g}$ de stigmastérol, 266.37 ± 1.97 $\mu\text{g/g}$ de campestérol et 184.25 ± 2.72 $\mu\text{g/g}$ de β -sitostérol. C'est la première méthode qui décrit la quantification de stérols et triterpènes dans la partie aérienne de cette plante. Elle a complètement été validée pour permettre de comparer la quantité de stérols et triterpènes dans d'autres échantillons de *Justicia anselliana* afin d'établir si ces allélochimiques sont émis à une concentration capable de produire le phénomène de dégradation de la plante.

Nous avons enfin quantifié les tanins du *Justicia anselliana* avec la méthode de la poudre de peau qui a permis de montrer que la partie aérienne de cette plante contient $26.15\% \pm 0.64\%$ de tanins et $28.65\% \pm 0.56\%$ de polyphénols totaux au moment où ces racines contiennent seulement $1.40\% \pm 0.24\%$ et $4.92\% \pm 0.32\%$ respectivement. On note aussi une teneur très faible en polyphénols non retenus par la poudre de peau dans les deux parties de la plante ($2.46\% \pm 0.26\%$ dans sa partie aérienne et $3.51\% \pm 0.31\%$ dans ses racines). Les tests allélopathiques ont montré que les fractions aqueuses avec ou sans polyphénols sont toutes actives sur le niébé *Vigna unguiculata* mais leurs activités restent globalement plus faibles que celles de la fraction la plus active de l'extrait éthanolique.

Au vu de ces résultats, des perspectives intéressantes offertes par ce travail seraient d'analyser d'autres échantillons de *Justicia anselliana* collectés à différentes périodes pour déterminer l'éventuelle variabilité des teneurs ; ceci dans le but d'identifier l'âge auquel la teneur des allélochimiques dans la plante allélopathique, devient nuisible pour le niébé et d'orienter quant au choix du moment de sarclage des champs du niébé afin de réduire l'effet allélopathique de *Justicia anselliana*. Il s'agira aussi de vérifier si les

composés identifiés pourraient avoir une importance dans d'autres propriétés pharmacologiques de la plante telles que le traitement de l'inflammation des testicules, des maladies cardiaques (Watt and Breyer –Brandwijk, 1962), du Kwashiorkor, de la Syphilis (Adjanooun et al., 1993) et des vers intestinaux (Neuwinger, 2000) et dans son effet conservateur sur la tomate et la gombo.

Il serait aussi intéressant de vérifier le mode d'action des composés actifs sur le *Vigna unguiculata* et d'identifier d'autres allélochimiques et principes actifs de la plante.

La possibilité d'utiliser le *Justicia anselliana* comme herbicide sur d'autres mauvaises herbes peut être explorée.

VII.

BIBLIOGRAPHIE

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Adams R.P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, USA (1995).
2. AFNOR, Recueil de Normes Françaises, Huiles Essentielles, Tome 1: Echantillonnage et méthodes d'analyse, NFT75-401, Paris, (2000) 207-218.
3. Ahanchede A., G. Gbehounou, K.D. Kossou, E. Yayi, E. Akpo Contribution à l'étude de la caractérisation du pouvoir allélopathique de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders: approche de bioessais utilisant des extraits obtenus à partir du matériel végétal séché. Annales de la FSA Volume 6, (2003). <http://www.annales-fsa.bj.refer.org>
4. Aho N. et K.D. Kossou, Précis d'agriculture tropicale. Bases et éléments d'application, Les éditions du Flamboyant, Cotonou, 1997, p.290-291.
5. Akobudu I.O. et J.A.Poku, Weed control in soybean in the tropics. In Singh S.R., Rachie K.O. et K.O. Daskiell (Eds) Soybean for the tropics: research, production and utilisation. John Wiley and Sons Ltd, Chichester. (1987) p: 69-77.
6. Akplogan G. Etude préliminaire des effets concurrentiels de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders., mauvaise herbe de la culture du niébé dans la vallée de l'Ouémé au Bénin. Mémoire d'Ingénieur Agronome. FSA/UNB, Abomey Calavi. (1999) 62p.
7. Akpo E. Contribution à l'étude de la caractérisation du pouvoir allélopathique de *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders., mauvaise herbe de la culture du niébé dans la vallée de l'Ouémé au Sud Bénin. Mémoire d'Ingénieur Agronome. FSA/UAC, Abomey Calavi. (2003) 77p.
8. Anaya A.L., Macías-Rubalcava M., Cruz-Ortega R., García-Santana C., Sánchez-Monterrubio P.N., Hernández-Bautista B., Rachel M. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry* (2005) 66 : 487-494.
9. Andres P.J., Carlos B., Hermelo L., Trujillo J. M. Justicidone, a novel p-quinone-lignan derivative from *Justicia hyssopifolia*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* (2004), 52(1), 130-131.

10. Asano J., Chiba K., Taba M., Yoshii T. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*. *Phytochemistry* (1996) 42(3): 713-717.
11. Baloy J., Le maïs : phases de germination, levée et implantation, 1985, p.13-14.
12. Berhaut J. Flore du Sénégal clairafrique. Dakar (1976) 485p.
13. Bernard Reversat F., Quelques observations sur l'effet allélopathique des Eucalyptus plantés au Congo. *Revue Scientifique panafricaine*, Vol 1,N°01, (1993) 4-23.
14. Berner D.K., Winshow A.E., Awad A.E., Cardwell K.F., Mohan Raj D.R. and Kim S.K. Striga Reseach Methods. Striga Research Group/PASCON/IITA. (1997) 81p.
15. Blundell M. Collins guides to the wild flowers of East Africa. Koon Wah Printing PTA, Singapore. (1987) 393p.
16. Block S., Brkic D., Hubert Ph. And Quetin-Leclercq J. A validated method for the quantification of pimarane and trachylobane diterpenes in the leaves of *Croton zanbesicus* by capillary gas chromatography. *Phytochemical analysus* (2005) 16, 342-348.
17. Brasseur T. Contibution à l'étude des flavonoïdes du *Strychnos variabilis*. (1998).
18. Brunel F.J.,Hiekpo P. et H. Scholz. Flore analytique du Togo. Phanerogame ed. Eschborn, Allemagne. (1984) 751p.
19. Bruneton J. In Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales. 2^{ème} édit. Techniques et Documentation-Lavoisier, Paris.(1993) 3 87-404.
20. Bruneton J. In Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales. Techniques et Documentation-Lavoisier, Paris.(1999).
21. Bryan Ham, Boyce Butler and Paul thionville. Evaluating the isolation and quantification of sterols in seed oils by solid-phase extraction and capillary gas-liquid chromatography. *LCGC* Vol. 18. N° 11. Novembre (2000) 1174-1182. www.chromatographyonline.com
22. Caussanel J.P. Kunesch G. Etude qualitative et quantitative des inhibiteurs de croissance présents dans les exsudats de racines du chénopode blanc (*Chenopodium album*) au début de sa floraison en culture hydroponique et sous conditions contrôlées. *INRA.Pflanzenphysiol. Bd.* (1979) 93: 229-243.

23. Chalwood B.V. Plant Cell and Molecular Sciences Group, division of Biosphere Sciences, Kings College London, UK. (1991).
24. Chapuzet E., Mercier N., Bervoas-Martin S., Boulanger B., Chevalier P., Chiap P., Grandjean D., Hubert Ph., Lagorce P., Lallier M., Laparra M.C., Laurentie M., Nivet J.C., Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : strategie de validation. STP Pharma Pratiques 7 (1997) 169-194.
25. Chavez R.S.C. and Frans R.E. Weed-specificity of allelopathic effects from mulched sunflower residues. Proceedings, Southern Weed Science Society, Arkansas, Fayetteville, AR72701. (1996).
26. Chen C., Hsin W., KO F., Huang Y., Ou J., Teng C. J. Nat. Prod. (1996) 59: 1149-1150.
27. Chien-Chih C., Wen-Chi H., Yu-Lin H. Six New Diarylbutane Lignans from *Justicia procumbens*. Journal of Natural Products (1998) 61(2): 227-229.
28. Chitra K.C., Reddy P.V.R., Pillai K.R., Subbaraju G.V. J. Appl. Zool. Res. (1995) 6:131- 132.
29. Clarke C.B., Dodda R., Subbaraju G. V., Ranganatha P *Justicia* lignans VI - Prostalidin D, a new arylnaphthalide lignan from *Justicia diffusa* var. *prostrata* Journal of Asian Natural Products Research (2000), 2(4), 289-300.
30. Clevenger J.F., Apparatus for the deterioration of volatile oil. Journal of American Pharmacy Association. (1928) 17, 346.
31. Coll J.C. and Bowden B.F. the application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. Journal of Natural Products. (1986) 49 (5): 934-6.
32. Connolly, J. D.; Hill, R. A. Triterpenoids, in Terpenoids. Charlwood B. V. and Banthorpe D.V., editors. London: Academic Press. 1991, 7: 331-59.
33. Cronquist A. Anbintegrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York. (1981) 945.
34. Della G. M., Mangoni L., Molinaro, A., Monaco P., Previtera L. Studies on aquatic plants. Part 14. (20S)- 4 α - Methyl-24-methylenecholest-7-en-3 α -ol, an allelopathic sterol from *Typha latifolia*. Phytochemistry (1990) 29(6) 1797-8.
35. Denoël A., cours de galénique. 1971

36. De Hoffmann E., Charrette J., Stroobant V. dans Spectrométrie de masse. Ed. Masson. 1994.
37. Dewick P.M. The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. Nat Prod Report (2002) 19: 125-132.
38. Dovlo F.E., Williams C.E., Zoka L. Cowpeas: Home Preparation and Use in West Africa. International Development Center, Ottawa, Canada. (1976).
39. Egounlety M., Aworh O.C. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tanins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). Journal of Food Engineering 56 (2003) 249-254.
40. Ehlers J.D. and Hall A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Field Crops Research 55(1997) 187-204.
41. Einhellig F.A. Allelopathy: current status and future goals. In: Inderjit, Dakshini K.M.M. and F.A. Einhellig (eds) Allelopathy: Organisms processes and applications. American Chemical Society, ACS symposium Series, Washington. (1995) 1-24.
42. Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. Trends Plant Sci., 2001, 6, 78-84.
43. Fisher A.J., Baker B.M., Greenberg J.P., Fall R. Enzymatic synthesis of methylbutenol from dimethylallyl diphosphate in needles of *Pinus sabiniana*. Arch. Biochem. Biophys. (2000) 383: 128-134.
44. Fischer N. H., Quijano L. Allelopathic agents from common weeds. *Amaranthus palmeri*, *Ambrosia artemisiifolia*, and related weeds. ACS Symposium Series, Chem. Allelopathy. (1985) 268: 133-47.
45. Fukamiya N., Lee K. J. Nat. Prod. (1986) 49: 348-350.
46. Ghosal S., Banerjee S., Frahm A.W. Chem. Ind. (London) (1979) 23: 854-855.
47. Glass A.D.M. Inhibition of phosphate uptake in barley roots by hydroxybenzoic acids. Phytochemistry (1975) 14: 2127-2130.
48. Gottumukkala V. R. S., Ranganatha P.K. Lignans from *Justicia tranquebariensis* Linn. f. Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry (1989), 28B(7), 558-61.

49. Green R.E. In pesticides in soil and Water. Wisconsin: Soil Science Society of America. Ad. W.D. Guenzi. (1974) 3-37.
50. Guigaz M. Memento de l'agronome. Eds de CIRAD-CRET Ministère des affaires étrangères. (2002) 869-872.
51. Heneberg D., Weimann B. and Jopperk W., Mass spectrometry library search system masslib, Version 7.4 (for Ultrix), Max-Plank-Institut für Kohlenforschung, mülheim/Rhur (1994). a) D. Heneberg, B. Weimann and W. Jopperk, MPI library of mass spectral data, Max-Plank-Institut für Kohlenforschung, mülheim/Rhur (1994). b) P.A. Leclercq and H.M. Snijders, EUT library of EI mass spectra, Eindhoven, University of Technology (1995).
52. Houghton PJ, Raman A. in Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. 1998, Chapman et Hall, London.
53. Hostettmann K., Marston A., and Hostettman M. Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation. Berlin: Springer-Verlag (1998).
54. Hubert Ph., Chiap P., Crommen J., Boulanger B., Chapuzet E., Mercier N., Bervoas-Martin S., Chevalier P., Grandjean D., Lagorce P., Lallier M., Laparra M.C., Laurentie M., Nivet J.C., The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis : from the Washington conference to the laboratory. Anal Chim. Acta 391 (1999) 135-148.
55. Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N. et al. Validation of quantitative analytical procedure, harmonization of approaches. STP Pharma Pratiques 13 (2003) 101-138.
56. Hutchinson F.R.S. The family of flowering plants. 3rd ed. Oxford of the clarendon Press. (1964) 968.
57. Hutchinson F.R.S. et Dalziel J.M. Flora of West tropical Africa. Witstable Litho, Pinters Ltd, Great Britain. (1963) 391-427.
58. Ikba, Z., hiradate S., Araya H., Fujii Y. Plant growth inhibitory activity of *Ophiopogon japonicus* ker – gawler and role of phenolic acids and their analogues: A comparative study. Plant Growth Regulation (2004) 43(3): 245-250.

59. Jakka K., Kovuru G., Dodda R., Subbaraju G. V. Juspurpurin, an Unusual Secolignan Glycoside from *Justicia purpurea*. *Journal of Natural Products* (2003), 66(8), 1113-1115.
60. Jefferson L.V., Pennacchio M. Allelopathic effects of foliage extracts from four Chenopodiaceae species on seed germination. *Journal of Arid Environments* (2003) 55: 275-285.
61. Kalita D., Choudhury H. and Dey S.C. Allelopathic effect of shoot and root extract of some weeds on growth of rice. *Geobios, Jodpur* (1998) 15 (4): 269-272.
62. Kato-Noguchi H. Assessment of allelopathic potential of shoot powder of lemon balm. *Scientia Horticulturae* (2003) 97 419-423.
63. Kesselmeier J, Staudt M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *J. Atm. Chem.* (1999) 33: 23–88.
64. Kil B.S. Allelopathic effects of five pine species in Korea, in *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins, and Insect Pheromones and allelomones* (eds C.H. Chou and G.R. Waller). Academia Sinica, Monograph Ser. No. 9. Acad. Sinica, Taipei, (1989) pp. 81-100.
65. Kolhi R.K. , Batish D. and Singh H.P. Allelopathy and its implications in agrosystems. *Journal of Crop Production* (1998) 1: 169-262.
66. Kong-Chuihua, Xu-Tao and Hu-Fei. Allelopathy of *Ageratum conizoides*: II. Releasing mode and activity of main allelochemicals. *Yingyong Shengtai Xuebao* (1998) 9(3): 257-260.
67. Kpoviéssi D.S.S., Accrombessi G.C., Kossouh C., Soumanou M.M., Moudachirou M. Propriétés physicochimiques et composition de l'huile non conventionnelle de pourghère (*Jatropha curcas*) de différentes régions du Bénin. *C.R.A.S.Chimie* 7 (2004) 1007-1012.
68. Lance C., Reboul V., De Raïssac M. et Marnatte P. Mise en évidence d'effets allélopathiques de *Calopogonium mucunoides* Desv. dans 10^{ème} Colloque International sur la Biologie des mauvaises herbes. Société Européenne de malherbologie, Dijon (France) (1996) 83-99.
69. Langyintuo A.S., Lowenberg-DeBoer J., Faye M., Lambert D., Ibro G., Moussa B., Kergna A., Kushwaha S., Musa S., Ntoukam G. Cowpea supply and demand in West and Central Africa. *Field Crops Research* 82 (2003) 215-231.

70. Lichtenhaler hk, zeidler j, schwender j, müller c, z. naturforsch., teil c (2000) 55 : 305.
71. Linear I.E. Toxic constituents of plant food stuffs. Academic press, New York. (1969).
72. Loreto F, Mannozi M, Maris C, Nascetti P, Ferranti F, Pasqualini S. Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in plants. *Plant Physiol.* (2001) 126, 1–8.
73. Lovett J.V., Levitt J., Duffield A.M. and Smith N.G. Allelopathy potential of *Datura stramonium* L. (Thorn apple). *Weed Research* (1981) 21: 165-170.
74. Macias F. A., Simonet A. M., Galindo J. C. G. Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic potential *Journal of Chemical Ecology* (1997) 23(7):1781-1803.
75. Macias F. A., Simonet A. M., Esteban M.D. *Phytochemistry* (1994) 38.
76. Macias F. A., Valera R.M., Torres A., Molinillo J.M.G. *Phytochemistry.* (1993) 24: 669- 674.
77. Macias F. A. Allelopathy in the search for natural herbicide models. *American Chemical Society.* (1995) 23: 311-329.
78. MacRae W.D., Towers G..H.N. *Phytochemistry.* (1984) 23: 1207-1220.
79. Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry.* (1994) 37(6): 1517-75.
80. Masada Y., *Analysis of essential oils gas chromatography and mass spectrometry*, Wiley, New-York (1967).
81. Mashkovska S. P., Golovko E. A. Allelopathic activity and biochemical composition of the root secretions from the introduced species of *Tagetes* L. *Nats. Bot. Sad im. M. M. Grishka, NAN Ukr., Kiev, Ukraine. Fiziologiya i Biokhimiya Kul'turnykh Rastanii* (2004) 36(4): 307-314.
82. Mclafferty F.W. and Stauffer D.B., *Mass Spectrometry Library Search System BenchTop/PBM, Version 3.0*, Palisade Co, Newfeld, NY (1993). Using BenchTop / PBM the following database was searched: F.W. Mclafferty and D.B. Stauffer, the Wiley NBS Registry of Mass Spectral Data, 5th Edition, J. Wiley and Son, NY (1991).

83. Miller, J.N. Miller, Statistics for analytical chemistry, 5th edn. Ellis Horwood: New York, (2000)
84. Mohan S.M.R., Geeta P., Devi P., Rakesh K. J., Chandra B. P. Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca* Biochemical Systematics and Ecology. (1998) 26 : 13 – 23.
85. Molisch H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie. Fischer, Jena. (1937)
86. Montgomery R.D. Observations on the cyanide content and toxicity. W. Int. Med. J. 1964. 13: 1-11.
87. Moral R.D. and Muller C.H., Fog drip: a mechanism of toxin transport from *Eucalyptus globulus*. Bull. Torrey Bot. Club, (1969) 96: 467- 475.
88. Moral R.D. and Muller C.H., The allelopathic effect of *Eucalyptus camaldulensis*. Amer. Midl. Natur. (1969) 83: 254-282.
89. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity essays. J. Immunolog. Meth. 1983, 65: 55-63.
90. Munakata K., Marumo S., Ohta K. , Chen Y. Tetrahedron Lett. (1965) 47: 4167-4170.
91. National Institute of Standards and Technology, PC Version of the NIST/EPA/NIH Mass spectral Database, Version 4.5. US Department of commerce, Gaithersburg, MD (1994).
92. Narwal S.S. Allelopathy: Future role in weed control. In: Allelopathy in Agriculture and Forestry. Eds., Narwal S.S. and P. Tauro (eds) Jodhpur. Scientific Publishers (1994) 245-272.
93. Narwal S.S. Suggested methodology for allelopathy laboratory bioassays. In: Narwal S.S. and P. Tauro (eds) Allelopathy: Field observations and methodology. Scientific Publishers Jodhpur. (1996) 255-265.
94. Neuwinger H.D. African tradition medicine: a dictionary of plant use and application. Stuttgart Medpharm Scientific Publishers. (2000) 284.
95. NF FD V 01-000. Analyse des produits agricoles et alimentaires, Terminologie.

96. Ng N.Q. and Padulosi S. Cowpea genepool distribution and crop improvement. In: eds. N. Q. Ng, P. Perrino, F. Attere and H. Zadan, Crop Genetic Resources of Africa, Vol. II, (1988) 161-174.
97. Numata M., Weed ecological approaches to allelopathy. In Biology and ecology of weeds, W Holzener and M. Numata (Eds.), DR W. Junk publishers, The Hague. (1982) 169-173.
98. Olapade A.A., Okafor G.I., Ozumba A.U., Olatunji O. Characterization of common Nigerian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) varieties. Journal of Food Engineering 55 (2002) 101-105.
99. Oliveria A. F. M., Xavier H. S., Silva N. H., Andrade L. H. C. Chromatographic screening of medicinal Acanthaceae: *Justicia pectoralis* Jacq. and *J. gendarussa* Burm. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (2000), 3(1), 37-41.
100. Oudhia P., Kolhe S.S., Tropathi R.S. Germination and seed vigour of mustard as affected by allelopathic potential *Blumea lacera* L. Agricultural Science Digest (1999) 18(3): 183-186.
101. Parvez, M.M.; Tomita-Yokotami, K.; Fujii, Y. ; Konishi, T.; Iwashina, T. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. Biochem. Syst. Ecol. (2004) 32: 631-635.
102. Pasquet R.S. et Fotso M. Répartition des cultivars de niébé *Vigna unguiculata* (L.) Walp du Cameroun: Influence du milieu et des facteurs humains. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée, nouvelle série. (1994) Vol. XXXVI (2) 93-143.
103. Pereira P.A.A., Del Peloso M.J., da Costa J.G.C., Ferreira C.M., Yokoyama L.P. Beans product: Perspectives for production, consumption and genetic improvement. Paper presented at the Cowpea Research National Meeting. Embrapa, rice and beans. Teresina, PLAUI, Brazil. (2001).
104. Peter, F.; Katalin, E. K. Gradient enhanced selective experiments in ¹H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmaterol, a phytosterol derivative. Steroids. (2004) 69: 43-50.
105. Platt B.S. Table of representative values of food commonly used in tropical countries. Medical Research Council Special Report. London, (1962) Series 20.

106. Projet NIEBE. Rapport d'enquête diagnostique sur les contraintes à la production du niébé effectuée à Dannou. CDD/CBDD/MPREPE, Bénin. (1998) 14p.
107. Putnam A.R., Weed allelopathy, In: Duke S. O. (Ed) Weed physiology: Reproduction and ecophysiology. CRC Press, Inc., Florida. (1985) 131-150.
108. Rachie K.O. and Roberts L. M. Grain legumes of the lowland tropics. *Advances in agronomy*. (1974) 26: 1-132.
109. Rachie K.O. and Silvestre P. Grain legumes of the lowland tropics. In: Leakey, C.L.A. and Wills, J.B. (eds). *Food crops of the lowland tropics*. Oxford university press. (1977).
110. Rajasekhar D., Vanisree M., Subbaraju G.V. Justicia lignans: part 4 - two new aryl-naphthalide lignans from *Justicia neesii* Ramamoorthy. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* (1999), 38B(6), 713-717.
111. Rangel A., Saraiva K., Schwengber P., Narciso M.S., Domont G.B., Ferreira S.T., Pedrossa C. Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Food Chemistry* 87 (2004) 491-499.
112. Rao C.B.S. in *Chemistry of Lignans*, Andhra University Press, Visachapatnam. (1978).
113. Rawat M.S.M., Geeta P., Devi P., Jochi R.K., Pande C.B., Plant G. and Prasad D. Plant growth inhibitors (proanthocyanidins) from *Prunus ameniaca*. *Biochemical and systematics and Ecology* (1998) 26: 13-23.
114. Rice E.L. , allelopathy, Academic Press, New York. (1974) 353p.
115. Rice E.L. , allelopathy, Academic Press, New York. (1984) 422p.
116. Rice E.L. Allelopathic effect on nitrogen cycle. In: Rizvi S.J. and Rizvi V. (eds) *Allelopathy: Basic and applied aspects*. Chapman and Hall Publishers, London. (1992) 31-58.
117. Rizvi S.J.H., Haque H., Singh V.K., Rizvi V. A discipline called allelopathy. In: Rizvi S.J. et Rizvi V. (eds) *Allelopathy: Basic and applied aspects*. Chapman and Hall Publishers, London. (1992) 1-10.
118. Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.*, 1999, 16, 565-574.

119. Rouessac F, Rouessac A, Ourisson G dans *Analyse Chimique : Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes*. 1998. Ed. Dunod.
120. Sadler Research Laboratories, The Sadler standard gas chromatography retention index library, Bio-Rad Laboratories, Philadelphia (1986).
121. Salituro G.M. and Bufresne C. Isolation by lowpressure column chromatography, in *Natural products isolation*, Cannell R.J.P., editor. Vol.4. Totowa, New Jersey: Humana Press. (1998) 111-40.
122. Sanda K., Kpegba K., Bouchra Ounm Benjell L., Delmas M. J. Soc. Ouest-Afr. Chim. 3 (1997)1.
123. Sandra P. and Bicchi C., *Capillary gas chromatography in essential oil analysis*, Hüthig, Heidelberg (1987).
124. SAS / STAT User's Guide. SAS Institute, Inc.1990. SAS Institute. Vol. 2, Version 6, 4th ed. SAS Inst., Inc., Cary, NC. 951- 958(1990).
125. Saxena, V. K.; Sosanna, A. β -Sitosterol-3-O- β -D-xylopyranoside from the flowers of *Tridax procumbens* Linn. J. Chem. Sci. 2005, 117(3): 263-266.
126. Schuhr CA, Hect S, Kis K, Eisenreich W, Wungsintaweekul J, Bacher A, Rohdich F. Studies on the non-mevalonate pathway-preparation and properties of isotope-labeled 2C- methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. Eur. J. Org. Chem., 2001, 3221-3226.
127. Schulz M., Friebe A., Kueck P., Seipel M., Schnabl H. Allelopathic effects of living quack grass (*Agropyron repens* L.). Identification of inhibitory allelochemicals exuded from rhizome borne roots. *Angewandte Botanik* (1994) 68(5/6): 195-200.
128. Shiow-Hwa D., Yi-Chen L., Mei-Lin T., Tsao, Lo-Ti T., Horng-Huey K., Mei-Ing C., Jeng- Chang L., Jih-Pyang W., Shen-Jeu W., Chun-Nan L. Potent cytotoxic lignans from *Justicia procumbens* and their effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in mouse macrophages. *Journal of Natural Products* (2002), 65(3), 379-381.
129. Silverstein RM, Bassler GC, Morill TC dans *Spectrometric identification of organic compounds*. 5th edition. 1991. John Wiley INC.
130. Singh A. K., Das Bagchi G., Singh S., Dutt Dwivedi P., Gupta A.K., Khanuja S.P.S. Use of phyllocladanediterpenoids for plant growth promotion and

- alleviation of growth retardant allelochemicals. (Council of Scientific and Industrial Research, India). U.S. (2004) 8 pp.
131. Singh H. P., Batish D.R., Kaur S., Ramezani H., Kohli R. K. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis* Annals of Applied Biology (2002), 141(2) 111-116.
132. Singh H.A., Batish D.R., Pandhher J.K., Kohli R.K. Assessment of allelopathic properties of *Parthenium Hysterophorus* residues. Agriculture, Ecosystems and Environment (2003) 95: 537-541.
133. Singaas EL, Lerdau M, Winter K, Sharkey TD. Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. Plant Physiol. (1997) 115: 1413–1420.
134. Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. Principles and procedures of statistics, 2nd ed. McGraw-Hill, New York. (1980).
135. Stevigny, C.; Block, S.; De Pauw-Gillet, M.C.; de Hoffmann, E.; Llabrès, G.; Adjakidjé V. ; Quetin-Leclercq, J. Cytotoxic Aporphine Alkaloids from *Cassytha filiformis*. Planta Med. 2002, 68: 1042-1044.
136. Stewart W.D. Nitrogen fixation in plants. Oxford University Press. London and New York. (1966).
137. Subbaraju, G. V., Kavitha J., Rajasekhar D., Jimenez J. I. Jusbetonin, the First Indolo[3,2- b]quinoline Alkaloid Glycoside, from *Justicia betonica*. Journal of Natural Products (2004), 67(3), 461-462.
138. Subbaraju G. V., Kumar, K. K.K., Raju B. L., Pillai K. R., Reddy M. C. Justiciresinol, anew furanoid lignan from *Justicia glauca*. Journal of Natural Products (1991) 54(6): 1639-41.
139. Togbé C.O. Analyse de l'infestation parcellaire des champs de niébé par la mauvaise herbe *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders., dans la vallée de l'Ouémé au Sud du Bénin. FSA/UNB, Abomey Calavi. (2000) 86p.
140. Ventura M.M. and Filho J.K. A trypsin and chemotrypsin inhibitor from black-eyed Pea (*Vigna sinensis*). Anals. Acad. Bres. Scienc. (1967) 38: 553-66.
141. Vessman J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry, J. Pharm. Biomed. Anal., (1996), 14, 867-869.

142. Virtanen A.I., Erkama J. And Linkola H. On the relation between nitrogen fixation and leghemoglobin content of leguminous root nodules. II. Acta Cem. Scand., (1947) 1: 861-870.
143. Wagner H, Hörhammer L, Kiraly IC. *Flavon-C-glykoside in Croton zambezicus*. Phytochem, (1970) 9, 897.
144. Waller G. R. et M. C. Feng, Chemical analysis of allelopathic compounds. In: Narwal S.S. et P. Tauro (Eds) Allelopathy: Field observations and methodology. Scientific Publishers, Jodpur. (1996) 149-166.
145. Wang T.S.C., Cheng S.Y. and Tung H. Soil phenolic acids as plant growth inhibitors. Soil Science (1967) 104: 138-144.
146. Watt J.M., Breyer-brandwijk M.G. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, 2nd eds. Livingstone: London, 1962.
147. Webster G.R., Khan S.U. and Moore A.W. Poor growth of Alfaalfa on some Alberta soils. Agronomy Journal (1967) 59: 37-41.
148. Weston L.A. Utilisation of allelopathy for weed management in agroecosystems. Agronomy Journal (1996) 88(6): 860-866.
149. Wolfertz M, Sharkey TD, Boland W, Kühnemann F, Yeh S, Weise SE. Biochemical regulation of isoprene emission. Plant, Cell Environment. (2003) 26, 8, 1357.
150. Wood R.K.S., Ballio A. and Graniti A. Phytotoxins in plant disease. Eds., Academic Press: New York. (1972).
151. Wu H., Pratley J., Lemerle and Haig T. Crop cultivars with allelopathic capacity. Weed research (1999) 39(3): 171-180.
152. Yue, A.; Hiroshige, H.; Koh, S.; Hirota, K.; Kounio, I.; Takashi, K. Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumen (*Gossampinus malabarica* L. Merr) in human promyelotic leukaemia HL-60 cells. Oncology Rep. 2004, 11: 289-292.

VIII.

ANNEXE