

EFFETS DE DIFFÉRENTES FUMURES SUR LA CROISSANCE DE *ARTEMISIA ANNUA* L. (ASTERACEAE) ET QUANTIFICATION DE SA TENEUR EN ARTÉMISININE.

HOUHOUME GANSE S.h.^A, DJEGO J. G.^{b *}, GBAGUIDI F.^a, AVODE A.^d, AMINOUT.^c, NAPPORNT.^d, MOUDACHIROU M.^a, LECLERCQ J. Q.^f

RÉSUMÉ

Artemisia annua est une plante d'origine chinoise, riche en artémisinine, réputée efficace contre le paludisme. En vue de sa domiciliation et la production des formes galéniques au Bénin, la dynamique de croissance, la production de biomasse feuille et la teneur en artémisinine en fonction de quatre substrats (sable, urée, bouse de vache et crotte de porc) ont été déterminées. Le dispositif expérimental utilisé est le bloc de Fisher à quatre répétitions. Hauteur, diamètre au collet, nombre et longueur des feuilles et teneur en artémisinine ont été les variables mesurées. La biomasse et la hauteur moyennes obtenues avec la bouse de vache sont respectivement de $78,13 \pm 0,98$ g/plant et de $33,8 \pm 0,60$ cm ; avec la crotte de porc, de $86,75 \pm 02,50$ g/plant et de $32,5 \pm 0,95$ cm ; avec la fumure minérale, de $32,87 \pm 0,45$ g/plant et de $26,1 \pm 0,87$ cm et avec le témoin, de $18,25 \pm 0,82$ g/plant et de $25,2 \pm 0,51$ cm. Une analyse de variance a indiqué au seuil de 5%, que les fumures organiques (bouse de vache et crotte de porc) sont meilleures à celle minérale, du point de vue croissance et production de biomasse feuille. La teneur en artémisinine quantifiée sans pré-dérivatisation par RMN 1H, avant, pendant et après floraison a montré une forte variation du taux d'artémisinine au cours du stade physiologique de la plante, ainsi qu'une teneur élevée pendant la floraison. Le test d'homogénéité des variances a dégagé au seuil de 5%, une corrélation positive entre la teneur en artémisinine et les substrats urée et bouse de vache. Ces derniers peuvent donc être privilégiés pour la culture de l'espèce.

Mots clés : *Artemisia annua*, artémisinine, biomasse, fumures, plantation, Résonance Magnétique Nucléaire Proton (RMN ¹H)

ABSTRACT

Effects of different manures on the *Artemisia annua* L (Asteraceae) growth and quantification of its content of artémisinine.

Artemisia annua is a plant of Chinese origin, rich in artémisinine, considered effective against malaria. For its domiciliation and the production of the pharmaceutical forms to Benign, the dynamics of growth, the production of biomass breaks into leaf and the content of artémisinine according to four substratums (sand, urea, dung of cow and droppings of pig) were given. The experimental device used is the block of Fisher with four repetitions. Height, collar diameter, number and length of the sheets and content of artémisinine were L variable are measured. The biomass and the height averages obtained with the dung of cow are respectively of **78,13 ± 0,98 g/plant** and **33,8 ± 0,60 cm**; with the droppings of pig, **86,75 ± 02,50 g/plant** and **32,5 ± 0,95 cm**; with the mineral manure, of **32,87 ± 0,45 g/plant** and of **26,1 ± 0,87 cm** and with the witness, of **18,25 ± 0,82 g/plant** and of **25,2 ± 0,51 cm**. A variance analysis indicated to the threshold of 5%, that the organic manures (dung of cow and droppings of pig) are better with C it mineral, from the point of view growth and production of biomass breaks into leaf. The content of artémisinine quantified without shunt pre-conneted by NMR 1H, front, during and after flowering showed a strong variation of the rate of artémisinine during the physiological stage of the plant, as well as a content raised during flowering. The test of homogeneity of the variances released with the threshold of 5%, a positive correlation between the content of artémisinine and the substrates urea and dung of cow. The latter can thus be privileged for the culture of the species.

Key words: *Artemisia annua*, artémisinine, biomass, manures, plantation, Magnetic Resonance Nuclear Proton (NMR ¹H)

^aLaboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey Calavi, Bénin. 01 BP 06 Cotonou

^bLaboratoire d'Ecologie Appliquée. Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey Calavi Bénin.

^dInstitut de Chimie des Milieux et des Matériaux de l'Université de Poitiers. UMR CNRS 6514 avenue du Recteur Pineau F-86022 Poitiers.

^cLaboratoire d'Expertise et de Recherche en Chimie de l'Environnement et de l'Eau, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey Calavi, Bénin. 01 BP 526 Cotonou

^fLaboratoire de Pharmacognosie, Unité CHAM, Département de Pharmacie, Université Catholique de Louvain UCL 7230 Av. E. Mounier .72.1200 Bruxelles, **Email :** gdjego@yahoo.fr

1. INTRODUCTION

La malaria est un grave problème de santé publique en Afrique Sub-saharienne. Une estimation révèle que 300 à 500 millions de personnes sont atteintes tous les ans de la malaria. Les efforts déployés pour lutter contre le paludisme étant contrariés par l'apparition et la propagation de résistances à la plupart des molécules présentes sur le marché (chloroquine, quinine, fansidar,

etc...), il en résulte une proportion importante de décès dans les pays en de développement (OMS, 2003; Towie, 2006). Pendant longtemps, les programmes de gestion de la malaria dans les pays endémiques se sont fondés sur des traitements monothérapeutiques. Cependant, sur la base de l'évidence de l'efficacité, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recommandé l'application des thérapies de combinaisons contenant les dérivés de l'artémisinine (médicaments ACT : *Artemisinin-based Combination*

Therapy) (OMS, 2003). Elles sont à ce jour considérées comme les plus efficaces contre le paludisme.

L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique extraite des feuilles de la plante chinoise Qin hao (*Artemisia annua* L.). Espèce de la famille des Asteraceae, la plante est employée en médecine chinoise depuis plus de 1500 ans. Ses feuilles, ses fleurs et ses petites tiges contiennent de l'artémisinine qui est le principe actif (Hsu, 2006).

Pour rendre les dérivés de l'artémisinine plus disponibles dans les pays en développement, une technique facile d'extraction de l'artémisinine et de synthèse de certains de ses dérivés (artésunate et artéméther) a été optimisée. Cette approche rend possible l'extraction de la majorité (98 %) de l'artémisinine contenue dans la drogue végétale brute (Chekem et al., 2008).

L'OMS en 2001 déclarait que cette plante était « le plus grand espoir mondial de fournir un traitement au paludisme ». De ce fait, plusieurs programmes de développement et de santé publique dont le but est de faire reculer le paludisme œuvrent pour réduire d'au moins 20 %, le taux de mortalité dû au paludisme par l'utilisation d'*Artemisia annua*. C'est le cas du programme "Projet Interuniversitaire de l'Université Catholique de Louvain" qui expérimente au Bénin, la culture d'*Artemisia annua* en vue d'une production sur place de formes galéniques appropriées accessibles et à moindre coût aux populations locales. Compte tenu de son efficacité sur le germe de *Plasmodium* d'une part et son avantage économique pour les populations des pays en développement d'autre part, la domestication de la plante constitue une priorité.

Or, la bonne maîtrise de la production de cette plante passe par la fertilisation des sols. Il s'agit d'une plante qui nécessite une grande quantité de nutriments. Ces nutriments peuvent facilement être mis à disposition par l'utilisation d'engrais inorganiques. Cependant, il y a de nombreuses conséquences liées à leur utilisation. Au nombre de celles-ci, le lessivage, la dégradation des sols et la pollution de l'eau souterraine peuvent être cités (Ullah et al., 2008). C'est pourquoi la fumure organique dont l'application fournit des éléments nutritifs aux plantes et améliore la structure du sol est de plus en plus promue (Ullah et al., 2008). Il a été rapporté que l'application de la fumure organique, comparée à la fumure inorganique, augmente significativement le rendement dans la production d'aubergines par exemple (Ullah et al., 2008). Il subsiste alors une question essentielle. Qu'il soit minéral ou organique, quelle pourrait être l'influence du type de fumure sur la productivité d'*Artemisia annua* d'une part, et sur sa teneur en artémisinine d'autre part ?

Cette étude vise donc à :

- analyser l'influence des fumures organique et minérale sur la croissance d'*Artemisia annua* acclimaté au Bénin et sur sa teneur en artémisinine quantifiée sans pré-dérivatisation par RMN ¹H.
- identifier le meilleur substrat puis le stade physiologique de la plante correspondant à une teneur optimale en principe actif.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Milieu d'étude

La culture d'*Artemisia annua* L. anamed a été effectuée sur la ferme d'application, d'expérimentation et de production de la Faculté des Sciences Agronomiques (FSA) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). La ferme est dans la commune d'Abomey-Calavi du département de l'Atlantique. Elle est comprise entre 6°19'20" et 6°42'51" de latitude Nord et entre 2°11'45" et 2°25'15" de Longitude Est. Le climat de la localité est de type guinéen caractérisé par deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches. La pluviométrie moyenne annuelle est de 1200 mm et la température moyenne annuelle de 28°C. L'éclairement du site à midi en temps ensoleillé est de l'ordre de 70.000 lux (Gbaguidi, 1990). Le sol servant de support à notre expérimentation est un sol « faiblement ferrallitique modal » légèrement tronqué évoluant sur des sédiments argilo-sableux du Continental Terminal et communément appelé « Terre de Barre » (Volkoff et al., 1968). Sa texture présente une prédominance de sable grossier (58 %) et de sable fin (24 %). Les pourcentages d'argile (10,5 %) et de limon fin (7,75 %) sont faibles. Ce sol présente une déficience en azote (0,073 %). Son pH est faiblement acide (pH eau = 6,76 et pH kcl = 6,43). Le taux de phosphore assimilable est considérable (124,69 ppm).

2.2. Matériel

Le matériel d'étude est de trois types :

- la semence d'*Artemisia annua*. Elle est issue d'une variété améliorée (hybride) d'*Artemisia annua* mis au point par le Centre International de Recherche en Agroforesterie (ICRAF) à partir des graines fournies par l'Action Médecine Naturelle (anamed) basée en Allemagne. Cette variété a la capacité de s'adapter à de nombreux types de sols et se montre peu sensible aux attaques parasitaires et aux maladies.
- les substrats sont de quatre types (sol ferrallitique, urée, bouse de vache et crotte de porc sèches) mis dans les sachets de polyéthylène, les pots plastiques et dans des trous sur le site d'expérimentation. L'urée (fumure minérale) a été achetée dans le commerce tandis que la bouse de vache et la crotte de porc (fumures organiques) sèches ont été prélevées sur la ferme de la Faculté des Sciences Agronomique (FSA).
- Les feuilles d'*Artemisia annua* pour la mesure de la biomasse feuille et la quantification de l'artémisinine ont été sériées en 4 lots suivant les 4 types de substrats (sol ferrallitique, urée, bouse de vache et crotte de porc sèches).

2.3. Méthodes

2.3.1. Culture, technique de récolte, séchage et de conservation des feuilles d'*A. annua*

Après germination des graines d'*Artemisia annua* dans les germoirs traditionnels, le bloc de Fisher (Figures 3 et 4) est le dispositif expérimental adopté pour sa culture. Quatre types de traitement ont été utilisés avec quatre répétitions. Cinq plants ont été retenus par traitement. Les

différents traitements sont :

- T1 : témoin (sol ferrallitique) ;
- T2 : sol ferrallitique + urée ;
- T3: sol ferrallitique + bouse de vache ;
- T4 : sol ferrallitique + crotte de porc.

Ainsi, quatre-vingt sachets de polyéthylène et quatre-vingt pots plastiques ont reçu les quatre différents traitements (Sounon *et al.*, 2009). Deux plants ont été choisis au hasard par traitement pour les quatre répétitions. Ainsi trente deux plants en sachets de polyéthylène et trente deux plants en pots plastiques ont permis de faire les mesures des paramètres biologiques tels que la hauteur, le diamètre au collet, le nombre de feuilles et la longueur des feuilles. Après la transplantation des plantules dans les pots plastiques, elles sont suivies jusqu'à la production de biomasse feuille. Lorsqu'elles ont atteint environ 10 cm de hauteur, les plantules transplantées dans les sachets de polyéthylène, ont été plantées au champ dans 4 types de parcelles préalablement traitées suivant les substrats relatifs aux traitements considérés (Figure 1) où elles ont été suivies jusqu'à la production de biomasse feuille.

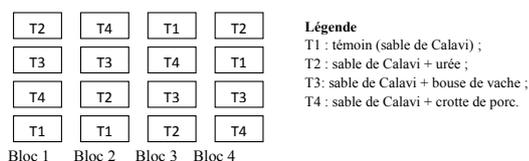


Figure 1 : Dispositif expérimental utilisé pour le test des plants en pots plastiques

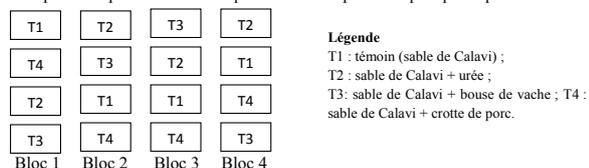


Figure 2 : Dispositif expérimental utilisé pour le test des plants en plantation

Le calendrier de culture et de récolte d'*A. annua* s'étend de décembre à mai et se réalise en quatre stades nécessitant chacun une préparation minutieuse suivie d'un entretien (désherbage et arrosage). Il s'agit de :

- stade pré-pépinière : en décembre qui est un mois où il fait un peu frais (24°C). Cette fraîcheur favorise la levée de dormance des graines.
- stade pépinière : quatre à six semaines de mi-décembre à mi-janvier, période de transplantation des plants.
- stade plantation : huit à dix semaines entre janvier et avril, période qui coïncide avec la saison des pluies ; c'est le moment propice pour la plantation.

La phase récolte peut démarrer fin mars-début avril, voire mai. La technique de récolte a consisté à récupérer les feuilles sur les tiges feuillées en terre, en glissant la main du haut vers le bas le long de la tige. La récolte, le séchage et la production de forme galénique (sachets d'infusion) peuvent se faire en cette période. Deux types de séchage sont considérés. Il s'agit du séchage à l'étuve à 40°C durant trois jours et du séchage à l'air libre à l'ombre à une température de moins de 35°C durant trois semaines. La plante séchée a été ensuite soigneusement réduite en poudre par un broyeur et stockée à température ambiante, soit 27°C en moyenne (European Pharmacopeia, 2004).

Les variables mesurées sont la hauteur des plants, le diamètre au collet, le nombre de feuilles portées par chaque plant, la longueur des feuilles, la biomasse et la teneur en principes actifs.

2.3.2. Quantification de la teneur en artémisinine

L'appareil utilisé est un Spectromètre RMN Bruker 400MHz fonctionnant en mode pulsé.

Le solvant utilisé tout au long de cette étude, est du CDCl₃ contenant 0,1% de tétraméthylsilane (TMS) (CH₃)₄Si. Une masse de 1 g de poudre de feuilles a été macérée dans 20 mL d'acétone, sous agitation magnétique constante pendant 24 h.

Deux pincées de charbon végétal actif ont été ajoutées au filtrat pour éliminer la chlorophylle puis le mélange a été filtré. Il a été ensuite évaporé avec un évaporateur rotatif sous pression réduite puis avec une pompe à palette utilisant un piège à diazote liquide. Le résidu est repris par 1 mL de CDCl₃. On prélève 700 µL de la solution d'extrait auquel on ajoute 100 µL de solution d'étalon interne, le 1,4-dichlorobenzène, de concentration 13,33 mg/mL.

Les déplacements chimiques (δ) ont été donnés par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ou déterminés à partir du déplacement chimique du solvant non deutérié présent à l'état de trace (CHCl₃ dans le CDCl₃). (Houéhoumè Gansè, 2012 ; Liu *et al.*, 2010; Castilho P. *et al.*, 2008).

2.3.3. Traitement des données

Les résultats obtenus ont été traités par le logiciel SPSS version 17.0. Les tests de Pearson (1%), Cochran, etc., ont été utilisés. Toutes courbes ont été tracées avec le logiciel EXCEL (Feinberg, 1996).

Les moyennes et coefficients de variation de chaque variable de croissance mesurée (hauteur, diamètre au collet, nombre de feuilles, longueur des feuilles, et biomasse) ont été calculés en fonction du temps pour chaque type de substrat.

Une analyse de la variance, modèle mixte, a été ensuite effectuée pour comparer les deux substrats. Le Test de Pearson (1%) a été utilisé pour comparer les quatre substrats et noter la relation entre ceux-ci et les variables de croissance d'*Artemisia annua*.

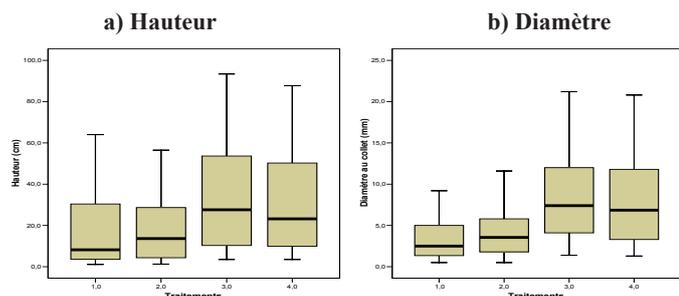
3. RÉSULTATS

3.1. Influence du substrat sur la dynamique de croissance d'*A. annua* sur terre ferme

3.1.1. Croissance en hauteur et en diamètre des plants d'*A. annua*.

Les hauteurs moyennes les plus importantes (33,80 ± 0,60) cm et (32,5 ± 0,95) cm, les diamètres moyens les plus importants (8,50 ± 0,70) mm et (8,10 ± 0,90) ont été obtenus respectivement avec les traitements 3 (bouse de

vache) et 4 (crotte de porc). La plus importante croissance a été obtenue avec la bouse de vache (Figure 3).

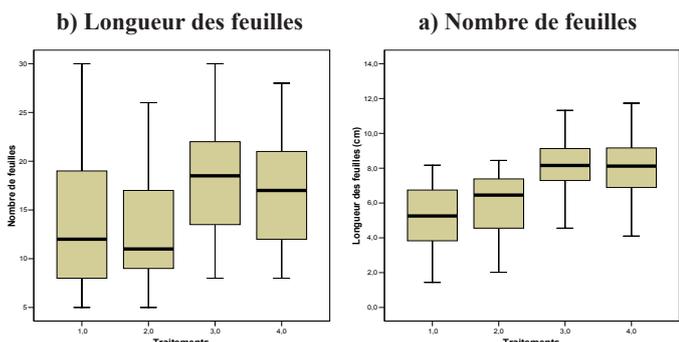


Légende : 1 : témoin ; 2 : urée ; 3 : bouse de vache ; 4 : crotte de porc.

Figure 3 : Hauteurs et diamètres des plants d'Artemisia annua en fonction des traitements

3.1.2. Croissance en nombre et en longueur des feuilles en fonction des substrats

L'analyse comparative de la croissance en nombre et en longueur des feuilles des plants d'Artemisia annua en fonction des fumures organiques et minérale (Figure 4) indique que le plus grand nombre de feuilles (18 ± 2 et 16 ± 1) et les plus grandes longueurs foliaires ($8,12 \pm 0,50$ cm et $(7,90 \pm 0,80)$) sont obtenus respectivement avec la bouse de vache (traitement 3) et la crotte de porc (traitement 4).



Légende : 1 : témoin ; 2 : urée ; 3 : bouse de vache ; 4 : crotte de porc.

Figure 4 : Nombre et en longueur des feuilles en fonction des traitements

L'analyse de comparaison de l'influence du substrat sur la croissance d'Artemisia annua sur terre ferme indique que les paramètres de croissance mesurés (hauteur, diamètre, nombre et longueur des feuilles) sont significatifs au seuil de 5 % (Tableau 1) et déterminent la croissance chez A. annua.

L'analyse des moyennes et coefficients de variation des paramètres de production selon le type de séchage (Tableau II) permet de constater qu'il n'existe pas de différence significative entre le poids sec de la biomasse totale sèche obtenus après séchage à l'air libre et à l'étuve. Le type de séchage n'a donc pas d'effet sur le poids sec des feuilles, tige et racine des plants d'A. annua.

3.1.3. Biomasse-feuille produite en fonction des substrats

L'analyse comparative de la biomasse feuille des plants d'Artemisia annua en fonction des fumures organiques et minérale (Figure 5) indique que les plus importantes biomasses feuilles sont obtenues avec la crotte de porc ($86,75 \pm 2,50$)g et la bouse de vache ($78,13 \pm 0,98$)

Tableau I: Analyse de variance des données obtenues sur terre ferme
Légende : H : hauteur; Dc : diamètre au collet; Nf : nombre de feuille; Lmf : longueur des feuilles.

		Somme des carrés	Moyenne des carrés	Fréquence	Significativité
H (cm)	Entre groupes	11031,485	3677,162	7,564	0,000
	A l'intérieur des groupes	92848,981	486,120		
	Total	103880,466			
Dc (mm)	Entre groupes	950,311	316,770	16,979	0,000
	A l'intérieur des groupes	3563,435	18,657		
	Total	4513,745			
N f	Entre groupes	948,027	316,009	8,819	0,000
	A l'intérieur des groupes	6844,311	35,834		
	Total	7792,338			
Lmf	Entre groupes	317,351	105,784	33,054	0,000
	A l'intérieur des groupes	611,268	3,200		
	Total	928,619			

Tableau II: Moyenne (m) et coefficient de variation (cv) des paramètres de production par plant selon le type de séchage.

Légende : m : moyenne ; cv : coefficient de variation ; PSFeuil : poids sec feuilles ; PSTige : poids sec tige ; PSrac : poids sec racine ; Biom Ts : biomasse totale sèche

Variable	Etuve 40°C		Air libre	
	m	cv	m	cv
PSFeuille (g)	4,7a	67,6	4,5a	69,0
PSTige (g)	1,7a	75,2	1,6a	79,0
PSracine (g)	1,8a	103,8	1,7a	85,2
BiomTs (g)	8,2a	70,2	7,8a	70,2

Pour chaque paramètre, les chiffres de même lettre ne sont pas significativement différents.

g. Les faibles biomasses sont données par le témoin ($18,25 \pm 1,75$)g et l'urée ($32,87 \pm 0,86$)g.

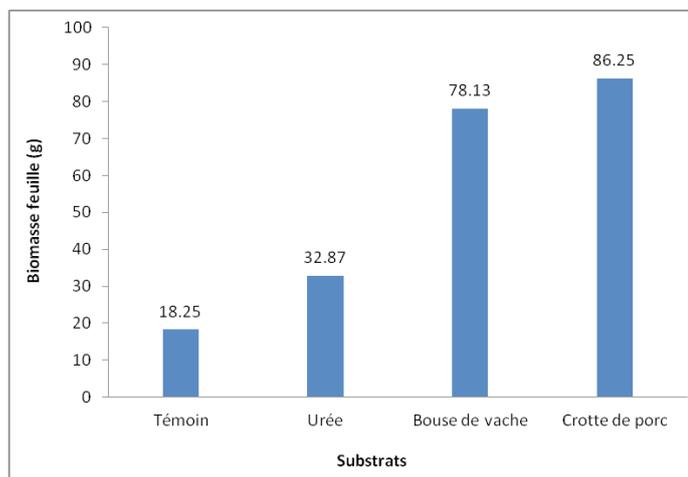


Figure 5 : Biomasse feuille en fonction des substrats

3.2. Dosage par RMN

3.2.1. Spectre RMN de l'artémisinine

La figure 6 montre une partie du spectre de l'artémisinine dans les conditions opératoires. Les autres protons résonnant à champ plus fort. L'étalon interne résonne sous forme de singulet à 7,27 ppm dans une zone sans interférence. Le pic du CHCl_3 apparait aussi sous forme de singulet à 7,26 ppm.

Conditions expérimentales : diamètre extérieur du tube

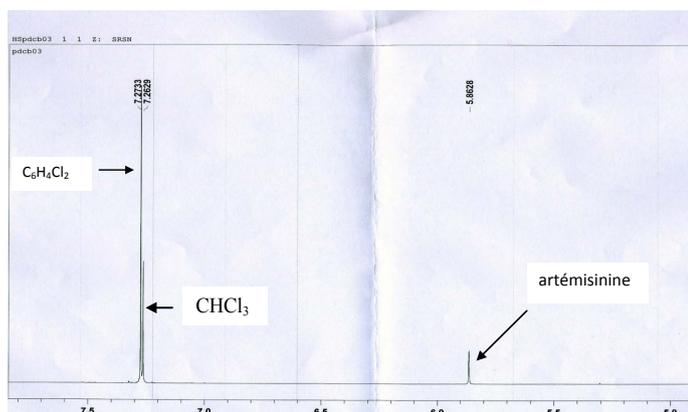


Figure 6 : Spectre RMN de l'artémisinine.

5 mm, fréquence de l'appareil 400 MHz. Paramètres d'acquisition standard : impulsion (p1) 12,2 μs , nombre de FID (ns) 16, domaine de balayage (swh) 4807 Hz, durée de l'acquisition (aq) 3,4079 s, temps de relaxation entre deux impulsions 1,0000 s, température 295,2 K

Le proton porté par le carbone en position 12 (Figure 7) résonne sous forme de singulet à 5,86 ppm. Le déblindage de ce proton s'explique par la présence de deux atomes d'oxygène portés par ce même carbone (C-12), ainsi que par la présence d'un groupement carbonyle (lactone) géométriquement proche. Les atomes d'oxygène de la fonction peroxyde apportent probablement aussi leur contribution. Des couplages de spin avec d'autres protons ne sont pas observés car il n'y a pas d'autre proton sur le C-12 ni sur les atomes de carbone ou oxygène adjacents.

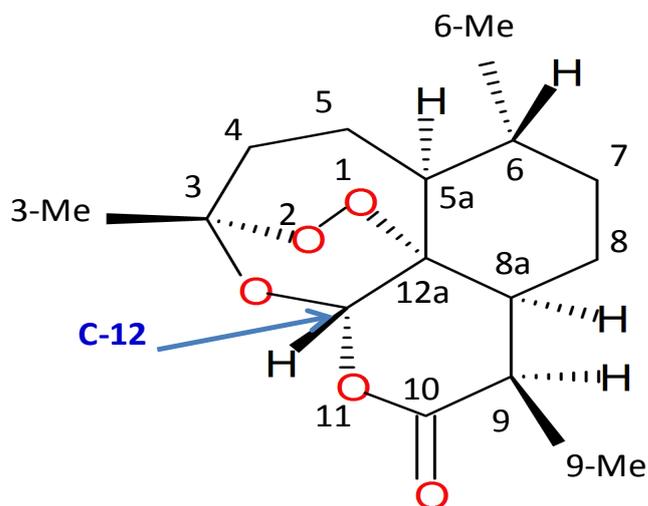


Figure 7 : Structure chimique de l'artémisinine mettant en évidence le carbone C-12

3.2.2. Identification de l'artémisinine dans un extrait

La figure 8 représente le spectre RMN proton de la poudre de feuilles d'*A. annua* cultivée avec l'urée. L'identification de l'artémisinine et d'autres composés a été faite par comparaison des spectres de RMN du ^1H respectifs de l'artémisinine et d'un échantillon à 400MHz

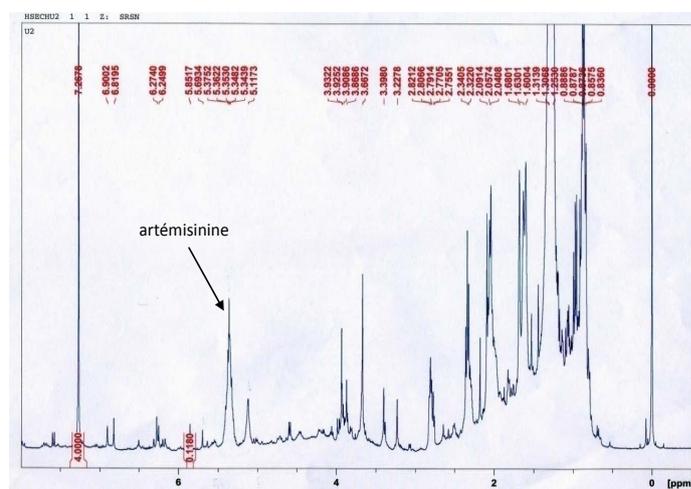


Figure 8 : Spectre du RMN du ^1H (pendant floraison) d'un échantillon cultivé avec de l'urée.

dans CDCl_3 ; le signal à $\delta = 5,86$ ppm a été utilisé.

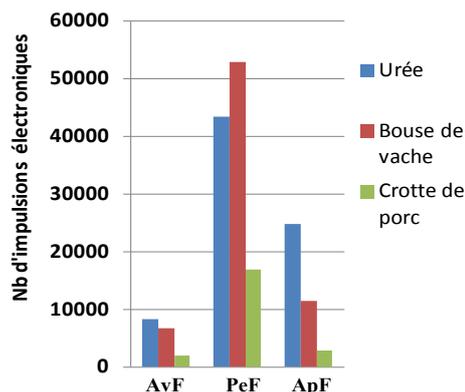
Conditions expérimentales : diamètre extérieur du tube 5 mm, fréquence de l'appareil 400 MHz. Paramètres d'acquisition standard : impulsion 12,2 μs , nombre de FID (ns) 16, domaine de balayage (swh) 4807 Hz, durée de l'acquisition (aq) 3,4079 s, temps de relaxation entre deux impulsions (d1) 1,0000 s, température 295,2 K

3.2.3. Quantification de l'artémisinine dans la plante par RMN : Influence des substrats

Afin de mieux apprécier l'efficacité des substrats, les divers résultats sont rassemblés dans le tableau III.

	Intensité (abs)		
	Avant floraison	Pendant floraison	Après floraison
rée	8382,28	43398,41	24810,19
Bouse de vache	6649,86	52827,50	11525,98
Crotte de porc	1998,66	16960,86	2814,59

Tableau III : Intensité (abs) au cours du stade physiologique de la plante
La figure 9 met en évidence le nombre d'impulsion en fonction du stade physiologique de la plante.



Légende : AvF : Avant Floraison, PeF : Pendant Floraison, ApF : Après Floraison

Figure 9 : Nombre d'impulsion en fonction du stade physiologique de la plante

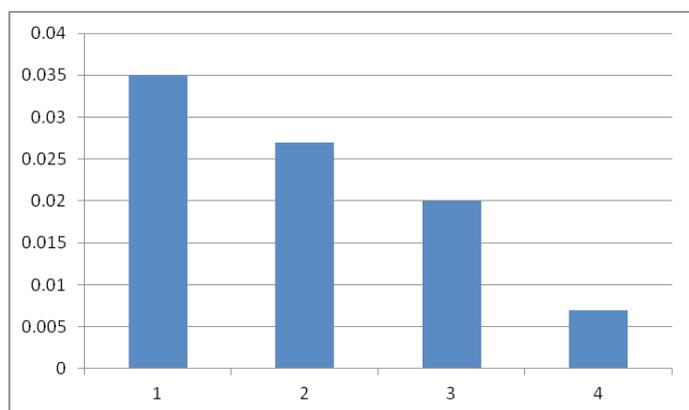


Figure 10 : Concentration en artémisinine dans les extraits secs pendant la floraison

4. DISCUSSIONS

4.1. Substrats et croissance d'*A. annua*

Les plantules cultivées sur terre ferme ont montré une bonne croissance. Certains plants ont atteint une hauteur maximale de 1,60 m ; mais des auteurs comme Hans (2005) et Barrié (2006) ont eu des valeurs plus élevées, respectivement de 2,50 m et 3 m. Les conditions climatiques (la pluviométrie moyenne annuelle est de 1200 mm et la température moyenne annuelle de 28°C) et le substrat non identiques justifieraient cette différence de la croissance en hauteur chez *A. annua*.

L'analyse des paramètres de croissance chez *A. annua* a révélé que sur terre ferme, la hauteur et le

diamètre au collet ont un effet significatif ($p = 0,002$) sur la croissance et qu'il existe un lien entre ces paramètres de croissance et la production de biomasse feuille. Les sols enrichis avec la crotte de porc et la bouse de vache ont présenté de bons résultats en ce qui concerne la croissance et le rendement en biomasse feuille comparativement au témoin et au sol enrichi à l'urée. Ce fait s'explique par les propriétés physico-chimiques de ces deux fumures organiques. En effet, ces dernières contiennent de l'humus qui d'une part, forme un complexe argilo-humique favorable à une bonne porosité du sol et d'autre part est riche en éléments nutritifs tels que l'azote, le phosphore, le potassium, le fer, le zinc etc..., indispensables à la croissance de la plante. Le témoin est pauvre en substances nutritives. Les faibles valeurs induites par l'urée est le fait d'un lessivage prononcé dû à l'absence de colloïdes d'une part et la vulnérabilité de certains plants due aux attaques des ravageurs dont les criquets notamment. Ainsi, les fumures organiques induisent des propriétés biologiques et physico-chimiques favorables à une croissance optimale d'*A. annua* sur terre ferme (Kogblévi, 1983).

Les cycles végétatifs d'*A. annua* en pots plastiques et sur terre ferme sont respectivement de 93 jours et de 103 jours. Certains plants sont rentrés en floraison précoce au bout de 70 jours dans les pots plastiques et 80 jours sur la terre ferme. Le développement d'*Artemisia annua* est sensible aux variables environnementales (pluviosité, humidité, insolation, température, substrat, etc.). Le déficit hydrique conduit à une floraison précoce, ce qui pourrait réduire le rendement en biomasse chez *A. annua*. Le rendement en biomasse feuille a présenté une différence significative entre les types de substrat. Des substrats de bonne capacité de rétention d'eau, facilement utilisable par les plants en culture sont en mesure de produire 150 kg de feuilles sèches par hectare sur terre ferme (Sounon et al., 2009).

4.2. Teneur en artémisinine d'*A. annua*

La méthode RMN ¹H développée et validée a permis de déterminer la teneur en artémisinine avant, pendant et après floraison dans les extraits secs et dans la poudre de plant.

Les teneurs obtenues avec le témoin (sans engrais ni fumure) sont les moins élevées car les pots témoins renferment moins de substances nutritives. La teneur moyenne en artémisinine est élevée dans le cas de l'urée et de la bouse de vache (apport azoté élevé). Elle reste élevée dans les plantes pendant la floraison quel que soit le substrat utilisé. Ces résultats d'analyses montrent une forte variation du taux d'artémisinine au cours du stade physiologique de la plante ainsi qu'une teneur élevée pendant la floraison : l'urée et la bouse de vache peuvent être privilégiées lors de l'enrichissement du sol. D'autres études (Castilho, 2008 ; Celeghini et al., 2006) ont montré que la teneur en artémisinine est maximale dans les feuilles au début du bourgeonnement floral et baisse fortement et rapidement lors de la floraison. Il est donc conseillé de

récolter toutes les feuilles d'une plante dès qu'apparaissent les premiers bourgeons floraux.

5. CONCLUSION

Les conditions optimales de production d'*A. annua* sont de préférence sur terre ferme, un sol ferrallitique avec apport de fumures organiques (bouse de vache, crotte de porc). Ceci assurerait une importante biomasse foliaire (150 Kg/ha). Au vue de cette opportunité liée à la production d'*A. annua*, dont la drogue végétale (feuille) renferme d'importantes teneurs en artemisinine pendant la floraison, il est important de promouvoir sa culture à grande échelle en la vulgarisant en milieu paysan pour maximiser sa production. Ceci, afin de limiter la mortalité et la morbidité liées à cette maladie parasitaire fréquente en Afrique et notamment au Bénin. Cependant, les analyses par la méthode de RMN proton ont montré que les plus fortes quantités d'artémisinine ont été obtenues avec la fumure minérale (urée). Une combinaison des fumures minérale et organique serait indiquée pour l'obtention de meilleur rendement en biomasse feuille et en artemisinine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ankli A., Widmer., Reich E., Handloser D., Steiner M., 2007.** Quantitative HPTLC analysis of artemisinin in dried leafs of *Artemisia annua*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologie*, **15**: 2209.
- Barrié P., 2006.** L'*Artemisia annua* ou comment lutter contre le paludisme. <http://www.acp-paludisme.com>. Consulté le 08/11/2012.
- Castilho P.C., Sandra C.G., Ana I.R., 2008.** Quantification of Artemisinin in *Artemisia annua* Extracts by ¹H-NMR. *Phytochemistry Analysis* **19**: 329-334.
- Celeghini R.M.S., Silva A.P., Sousa I.M.O., Foglio M.A., 2006.** Evaluation of *Artemisia annua* L. clean-up methods for artemisinin quantification by HPLC. *Revista Brasilia de Plantas Medicinai*, **8** : 119-122.
- Christen P., Veuthey J.L., 2001.** News trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, **8**, 1827-1839.
- European Pharmacopeia, 2004.** European Council, Strasbourg fourth ed. p. 3911.
- Feinberg M., 1996.** La validation des méthodes d'analyse : une approche chimométrique de l'assurance qualité au laboratoire. Paris, FRA : Masson, 397 p.
- Ferreira J.F.S., and Gonzales J.M., 2008.** Analysis of underivatized artemisinin and related sesquiterpene lactones by HPLC with ultraviolet detection. *Phytochemistry Analysis*, **20**: 91-97.
- Gabriels M., Plaizier-Vercammen J., 2004.** Development of reversed-phase thin-layer Chromatographic method for artemisinin and its derivatives. *Journal of Chromatography Science.*, **42**: 341-347.
- Gaudin M., Simonnet X., 2002.** Dosage de l'artémisinine par Chromatographie sur couche mince (CCM) ; validation de protocole. *Revue Suisse de Viticulture*, *d'Arboriculture et d'Horticulture* **34**: 205-208.
- Gbaguidi B., 1990.** Effet de quelques niveaux d'ombrage sur différents stades de développement d'*Imperata cylindrica* (L.) Beauv. Thèse pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome. UAC / FSA, Bénin. 155p.
- Hans M.H., Konda K.M., Innocent B., 2005.** La Médecine Naturelle Tropicale. Traitements (Anamed), Allemagne pp 21-40.
- Houéhoumè Gansè H., 2012.** Développement et validation de méthodes séparatives et spectrométrique comparées: application au dosage de l'artémisinine dans *Artemisia annua* L. acclimaté au Bénin, Thèse unique pour l'obtention du diplôme de Doctorat, Université d'Abomey-Calavi, 189p.
- Hsu E., 2006.** The history of qing hao in the Chinese material medica. *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **100**: 505 -508.
- Kogblévi A., 1983.** L'engrais organique : un engrais naturel, efficace et très bon marché, Cotonou, 30p.
- Liu N.Q., Choi Y.H., Verpoorte R., and Kooy F.V.D., 2010.** Comparative Quantitative Analysis of Artemisinin by Chromatography and q NMR. *Phytochemistry Analysis*. DOI:10.1002/pca.1217.
- Marchese J.A., Rehder V.L.G., Sartoratto A., 2001.** Quantification of artemisinin in *Artemisia annua* L. A comparison of thin-layer Chromatography with densitometric detection and high performance liquid chromatography with UV detection. *Revista Brasilia de Plantas Medicinai*, **4**: 81-87.
- OMS, 2003.** La charge du paludisme en Afrique. Le rapport du paludisme en Afrique, OMS/ UNICEF, Genève pp.17-27.
- Qian G.P., Yang Y.W., Ren Q.L., 2005.** Determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. By reversed phase HPLC. *Journal of Liquid Chromatography. & Related Technologie*, **28**: 705-712.
- Sounon M., Glèlè Kakai R., Avakoudjo J., Assogbadjo A.E, Sinsin B., 2009.** Tests de germination et de croissance de *Artemisia annua* L. anamed sur différents substrats au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **3**, 337-346.
- Towie N., 2006.** Malaria breakthrough raises spectre of drug resistance. *Nature*. **440** (7086): 852-3.
- Ullah I.M., Rahman M., Ashraf and Zafar Y. 2008.** Genotypic variation for drought tolerance in cotton (*G. hirsutum* L.): Leaf gas exchange and productivity. *Flora*, **2**: 105-115.
- Volkoff B. Verney R., 1968.** Etude de l'érosion sur terre de barre. Erosion sous culture du maïs: Maïs avec fumure minérale. ORSTOM, centre de Cotonou. 21p.
- Zhao S.S., Zeng M.Y., 1985.** Spekmetrische Hochdruck-Chromatograishe (HPLC) Untersuchungen zur Analytik von Qinghaosu. *Planta Medica*. **51**: 233-237.

*Auteur Correspondant : **Julien DJEGO**; Tél : (00229) 95 16 57 19 Fax : 21 30 30 84 ;