

Université de Montréal

Méthodologie analytique pour la récupération de substances allélopathiques
à partir d'échantillons naturels

par
Erick Tessier
Département de Chimie
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en chimie

Septembre 1998

© Erick Tessier, 1998



2000 11 11

QD

3

454

1998

V.024

Université de Montréal

Méthodologie analytique pour la détermination de substances électroactives
à partir d'échantillons naturels

par

Erck Tessier

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en chimie



Septembre 1998

© Erck Tessier, 1998

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Méthodologie analytique pour la récupération de substances alléopathiques
à partir d'échantillons naturels

présenté par:

Erick Tessier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Marius D'Amboise	président-rapporteur
Dr. Michel J. Bertrand	directeur de recherche
Dr. Michel Lafleur	membre du jury

mémoire accepté le: 22 octobre 1998

SOMMAIRE

Les espèces végétales ne sont pas toutes compatibles avec les domaines récréatifs ou industriels et nuisent à leur bon fonctionnement. Un contrôle de la végétation incompatible est effectué afin de remédier à la situation. De nos jours, les techniques les plus répandues pour le contrôle de la végétation sont l'éradication manuelle et l'utilisation de phytocides chimiques. Ces deux techniques sont coûteuses et néfastes pour l'environnement. Par contre, un procédé naturel est en développement pour le contrôle de la végétation. Selon plusieurs chercheurs, la végétation peut être contrôlée à l'aide de l'allélopathie. L'allélopathie est un moyen de protection et de sélection naturelle des plantes. Ce procédé fait appel aux substances chimiques, libérées par les plantes, qui influencent le développement et la croissance des végétaux de leur environnement. L'isolation et l'identification de ces substances permettraient l'élaboration d'herbicides naturels.

Le développement des méthodes pour l'échantillonnage et l'isolation des substances allélopathiques pose un grand défi. La présente étude fait partie d'un ensemble d'études visant le développement d'herbicides naturels basé sur les phénomènes allélopathiques. Dans le cadre de la présente étude, une procédure de récolte d'échantillons pouvant contenir des substances allélopathiques est étudiée et évaluée. La méthode d'échantillonnage doit récolter les eaux de percolation de la terre entourant la plante. Pour ce faire, un dispositif contenant la terre et la plante est mis sur pied et utilisé pour la récolte des échantillons. De plus, des méthodes analytiques pour le traitement des échantillons recueillis par les méthodes d'échantillonnage sont développées. Ces méthodes analytiques doivent pouvoir traiter les échantillons recueillis à l'aide de toutes les procédures d'échantillonnage développées dans les différentes études. Premièrement, une méthode de récupération des substances allélopathiques à partir d'échantillon aqueux est

développée. Cette méthode doit pouvoir préconcentrer les composés à potentiel allélopathique provenant de plusieurs familles chimiques. Deuxièmement, une procédure de fractionnement chimique des échantillons pouvant diviser les composés allélopathiques en plusieurs fractions est développée. Un fractionnement chimique permet de réduire la complexité des analyses à effectuer sur les échantillons. Ces deux méthodes sont développées à l'aide d'extractions liquide-liquide ou d'extractions sur phase solide. La quantification des extractions est effectuée par chromatographie liquide à haute performance et par chromatographie en phase gazeuse.

La méthode de récupération et la méthode de fractionnement chimique des échantillons permettent une récupération quantitative des composés étudiés lors de l'analyse d'échantillons enrichis. Par contre, l'évaluation de la procédure d'échantillonnage et l'analyse des échantillons recueillis ont montré la faible concentration des substances allélopathiques dans les eaux de percolation. La concentration des substances est sous les limites de détection des méthodes d'analyses à cause de la grande capacité de rétention de la terre dans le montage expérimental.

La polyvalence de la méthode de récupération et de la méthode de fractionnement chimique des échantillons permettra le traitement des échantillons issus de toutes les procédures d'échantillonnage. De plus, les résultats obtenus de l'évaluation de la procédure d'échantillonnage des eaux de percolation de terre montrent la nécessité de réorienter l'approche analytique pour l'échantillonnage des substances allélopathiques. Des méthodes alternatives d'échantillonnage pourront être développées afin d'augmenter le niveau de concentration des composés.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	i
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	ix
REMERCIEMENTS	xi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 Contrôle de la végétation par l'allélopathie.....	1
1.2 Objectifs de l'étude.....	3
CHAPITRE 2: L'ALLÉLOPATHIE	5
2.1 Généralités.....	5
2.2 Modes de libération et d'absorption des substances allélopathiques.	6
2.3 Modes d'action des substances allélopathiques.....	8
2.4 Familles chimiques et composés à potentiel allélopathique	9
2.5 Méthodes d'analyse des substances allélopathiques.....	13
2.6 Méthodes analytiques pour l'échantillonnage, la récupération des substances allélopathiques	14
2.7. Identification de la végétation incompatible avec le réseau de distribution d'électricité d'Hydro-Québec	16
2.8 Stratégie analytique globale	17
2.9 Approche de l'étude	21
2.9.1 Identification de la végétation à potentiel allélopathique.....	21

2.9.1.1	Liste des composés chimiques retenus	22
2.9.2	Approche analytique pour l'échantillonnage, la récupération et le fractionnement chimique des substances allélopathiques.....	26
2.9.2.1	Développement et l'évaluation d'un système de collecte des eaux de percolation de sol en milieu contrôlé.....	27
2.9.2.2	Préconcentration d'échantillons aqueux et le fractionnement chimique des échantillons recueillis lors de l'échantillonnage	28
CHAPITRE 3: PARTIE EXPÉRIMENTALE		30
3.1	Instrumentation.....	30
3.1.1	Chromatographie en phase gazeuse.....	30
3.1.2	Chromatographie liquide.....	31
3.2	Composés chimiques et solvants.....	33
CHAPITRE 4: MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES		34
4.1	Introduction.....	34
4.2	Dérivation pour chromatographie en phase gazeuse.....	34
4.3	Phase mobile pour la chromatographie en phase liquide.....	36
4.4	Limites de détection	36
4.5	Linéarité.....	38
CHAPITRE 5: RÉCUPÉRATION DE COMPOSÉS À POTENTIEL ALLÉLOPATHIQUE À PARTIR D'ÉCHANTILLONS AQUEUX.....		44
5.1	Introduction.....	44
5.2	Mode d'utilisation des cartouches d'extraction	45
5.3	Choix de la phase stationnaire	47
5.3.1	Phase non-polaire.....	49
5.3.1.1	Effet du pH sur le recouvrement des substances allélopathiques.....	49
5.3.1.2	Évaluation des phases non-polaires.....	52

5.3.2	Phase polaire.....	55
5.3.3	Phase échangeuse d'ions.....	56
5.4	Procédure de désorption chimique des échantillons.....	58
5.4.1	Phases non polaires C18.....	58
5.4.2	Phases échangeuses d'ions.....	62
5.5	Optimisation de la méthode de récupération.....	64
5.6	Conclusion.....	66
CHAPITRE 6: FRACTIONNEMENT CHIMIQUE.....		67
6.1	Introduction.....	67
6.2	Fractionnement chimique par extraction liquide-liquide.....	69
6.2.1	Choix des solvants d'extraction.....	70
6.2.1.1	Optimisation des conditions d'extraction.....	70
6.2.2	Optimisation du schéma d'extraction liquide-liquide.....	76
6.3	Fractionnement chimique par extraction solide-liquide.....	82
6.4	Choix de la méthode de fractionnement chimique.....	88
6.5	Conclusion.....	89
CHAPITRE 7: ÉCHANTILLONNAGE.....		91
7.1	Introduction.....	91
7.2	Montage.....	92
7.3	Protocole d'échantillonnage.....	96
7.4	Analyse des échantillons.....	97
7.5	Conclusion.....	102
CHAPITRE 8: ÉVALUATION DE LA PROCÉDURE DE RÉCUPÉRATION DE LA PROCÉDURE D'ÉCHANTILLONNAGE.....		104
8.1	Introduction.....	104
8.2	Reproduction du système d'échantillonnage.....	105
8.3	Simulation de la procédure d'échantillonnage.....	107

8.3.1	Préparation de l'échantillon.....	107
8.3.2	Analyse des eaux de ruissellement du montage expérimental	109
8.3.3	Méthode d'extraction des composés retenus dans la terre.....	111
8.3.3.1	Choix du solvant d'extraction.....	113
8.3.3.2	Évaluation des taux de recouvrement pour l'extraction d'échantillons de terre.....	116
8.3.4	Extraction des échantillons de terre issus de la simulation de la procédure d'échantillonnage	117
8.4	Conclusion.....	121
CHAPITRE 9 : CONCLUSION		122
BIBLIOGRAPHIE		125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Liste des composés chimiques sélectionnés	23
Tableau 2:	Conditions d'utilisation du chromatographe en phase gazeuse...	31
Tableau 3:	Conditions d'utilisation du chromatographe LC-410 pour	32
Tableau 4:	Conditions d'utilisation du chromatographe LC-410 pour l'optimisation des extraits de terre	32
Tableau 5:	Limites de détection observées pour le détecteur FID.....	37
Tableau 6:	Limites de détection observées pour le détecteur UV.....	37
Tableau 7:	Phases stationnaires disponibles pour la récupération d'échantillons en milieu aqueux	48
Tableau 8 :	pKa des familles de composés du tableau 1	51
Tableau 9:	Influence du pH sur le taux de recouvrement de composés tirés du tableau 1 avec des cartouches adsorbantes contenant 400 mg de phase stationnaire non-polaire C18.....	52
Tableau 10:	Pourcentages de recouvrement de substances à caractère basique et neutre sur cartouches d'extraction non-polaires obtenu à pH 10.....	53
Tableau 11:	Pourcentages de recouvrement de substances à caractère acide sur cartouches non-polaires obtenu à pH 2.....	54
Tableau 12 :	Pourcentages de recouvrement de substances à caractère acide sur une cartouche échangeuse d'ions avec une phase aqueuse à pH 9	57
Tableau 13:	Pourcentages de recouvrement de la méthode de récupération des substances à potentiel allélopathique.	65
Tableau 14 :	Taux de recouvrement des composés extraits à pH12 (F 1) et des composés extraits à pH 2 (F 2) avec du dichlorométhane	72
Tableau 15 :	Taux de recouvrement des composés extraits à pH12 (F 1) avec du dichlorométhane et des composés extraits à pH 2 (F 2) avec du dichlorométhane/acétate d'éthyle (50 :50, V :V).....	76

Tableau 16: Taux de recouvrement des composés des fractions à caractère acide lors de l'extraction liquide-liquide avec 50/50 dichlorométhane/acétate d'éthyle	80
Tableau 17 : Taux de recouvrement des composés des fractions à caractère neutre et basique lors de l'extraction liquide-liquide au dichlorométhane.	81
Tableau 18 : Taux de recouvrements obtenus lors d'extractions sur phase solide pour les composés des fractions F1 et F2 du schéma d'extraction.	86
Tableau 19 : Taux de recouvrement obtenus lors d'extractions sur phase solide pour les composés des fractions F3 et F4 du schéma d'extraction.	88
Tableau 20: Substances sélectionnées pour l'enrichissement des sols	108
Tableau 21: Taux de recouvrement observés pour des substances à potentiel allélopathique enrichies dans un échantillon de terre suite à une extraction au soxhlet avec une combinaison d'acétone et de dichlorométhane.....	116
Tableau 22: Pourcentage des substances retenues dans le sol après un arrosage équivalent à trois volumes d'élution de l'échantillon de terre	118

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Exemples de composés à potentiel allélopathique	12
Figure 2:	Schéma de la stratégie analytique.....	20
Figure 3:	Structure du MSTFA.....	35
Figure 4:	Linéarité du détecteur FID	38
Figure 5:	Linéarité du détecteur UV-Visible	39
Figure 6 :	Chromatogramme obtenu par GC-FID à la suite d'une injection d'un mélange de composés tirés du tableau 1 avec les conditions d'utilisation décrites dans le tableau 2.....	40
Figure 7 :	Chromatogramme obtenu par GC-FID à la suite d'une injection d'un mélange de composés tirés du tableau 1 avec les conditions d'utilisation décrites dans le tableau 2.....	41
Figure 8 :	Chromatogramme obtenu par HPLC-UV à la suite d'une injection d'un mélange de composés à potentiel allélopathique avec les conditions d'utilisation décrites dans le tableau 3.	42
Figure 9 :	Chromatogramme obtenu par HPLC-UV à la suite d'une injection d'un mélange de composés tiré du tableau 1 avec les conditions d'utilisation décrites dans le tableau 4.....	43
Figure 10:	Structure des cartouches Sep-Pak™ de Waters.	47
Figure 11:	Désorption de la fraction à caractère acide par différents solvants organiques:.....	60
Figure 12:	Désorption de la fraction à caractère neutre et basique par différents solvants organiques	61
Figure 13:	Étude du volume de méthanol/HCl (90 :10, V :V) requis pour éluer les acides des cartouches adsorbantes échangeuses d'anions	63
Figure 14:	Influence de l'ajout d'acétate d'éthyle au dichlorométhane sur l'extraction liquide-liquide d'une phase aqueuse à pH 2.	74

Figure 15:	Influence de l'ajout d'acétate d'éthyle au dichlorométhane sur l'extraction liquide-liquide d'une phase aqueuse à pH 12.	75
Figure 16:	Schéma de fractionnement liquide-liquide des échantillons.	79
Figure 17:	Schéma de fractionnement par extraction sur phase solide.	85
Figure 18:	Montage expérimental pour la récupération des eaux de percolation dans les expériences effectuées sous conditions contrôlées.	94
Figure 19:	Système d'interface de récupération des eaux de percolation pour isoler les éluats récupérés de l'air ambiant.	95
Figure 20:	Chromatogrammes en phase liquide de la fraction à caractère neutre et basique.	100
Figure 21:	Chromatogrammes en phase liquide de la fraction à caractère acide.	101
Figure 22:	Montage pour la simulation de la récupération des substances allélopathiques.	106
Figure 23:	Chromatogrammes en phase liquide représentant l'analyse des eaux de percolation de la simulation du modèle expérimental.	110
Figure 24:	Aire des substances allélopathiques obtenue selon le solvant d'extraction utilisé pour des échantillons de terre enrichie.	115
Figure 25:	Chromatogrammes en phase liquide représentant des extraits d'échantillons de terre pour la fraction à caractère neutre et basique.	119
Figure 26:	Chromatogrammes en phase liquide représentant des extraits d'échantillons de terre pour la fraction à caractère acide.	120

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé à compléter mes études de deuxième cycle. Le Dr. Michel Bertrand qui m'a accueilli dans son équipe de recherche et qui m'a soutenu afin de mettre à terme mes travaux.

Je remercie également Alain Carrier qui grâce à son aide et ses encouragements m'a permis de terminer cet ouvrage. Je désire aussi remercier les autres membres de l'équipe de recherche du Dr. Bertrand de même que le personnel enseignant qui m'ont aidé de près ou de loin.

Finalement, je remercie spécialement mes parents, mon frère, ma sœur et mes amis qui ont été présents durant mes études.

À mes parents,

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Contrôle de la végétation par l'allélopathie

Le contrôle de la végétation est une préoccupation constante pour de nombreux secteurs de l'industrie. L'agriculture, l'horticulture et la sylviculture ont recouru au contrôle de la végétation pour des raisons de productivité et de maximisation de l'espace de culture^{1,2}. De plus, certains domaines récréatifs et industriels nécessitent un espace d'opération qui ne peut s'accommoder de toutes les espèces végétales.

La gestion des ressources végétales dans le réseau de transport d'électricité d'Hydro-Québec est un exemple des problèmes actuels de gestion des ressources végétales. Le chemin emprunté par les lignes de transport parcourt des zones boisées et nécessite un contrôle de la végétation.

Différentes approches peuvent être utilisées dans le but de contrôler la végétation incompatible:

1. Les procédés physiques simples tels que l'éradication manuelle.
2. Les procédés chimiques comme l'utilisation de phytocides chimiques.
3. Une approche biologique par l'utilisation d'herbicides naturels.

La première approche mentionnée, les procédés physiques simples, est coûteuse et provisoire. La procédure doit être répétée après chaque repousse. La deuxième approche, l'utilisation de phytocides chimiques, est

plus simple et plus rapide pour le contrôle des repousses mais son effet sur l'environnement est néfaste. Les substances actives des phytocides n'agissent pas que sur la végétation nuisible et s'accumulent dans l'environnement et dans la chaîne trophique. Ils sont certes efficaces pour réduire la diversité écologique, mais peuvent aussi atteindre des systèmes non visés, les altérer et même contribuer à leur destruction^{3,4}. Dans le contexte actuel où les pressions environnementales s'intensifient, il devient impératif de réduire l'utilisation de phytocides chimiques et de trouver des alternatives à leur utilisation pour le contrôle de la végétation. Ces alternatives devront se fonder dans une approche biologique compatible avec l'environnement.

L'allélopathie peut s'avérer un choix logique pour le contrôle de la végétation. L'allélopathie étudie l'effet agoniste et antagoniste des composés sécrétés par les plantes sur les espèces vivantes dans leur environnement. Les effets allélopathiques peuvent nuire de différentes façons au développement de la végétation. Par exemple, la juglone émise par le noyer empêche la croissance des tomates et des pommes de terre de son entourage^{1,2,5}.

Un herbicide naturel développé à l'aide de l'allélopathie est le but de nombreuses recherches. Par exemple, dans les réseaux de transport d'électricité d'Hydro-Québec, les espèces arborescentes nuisibles pourraient être remplacées par des arbustes ayant des effets allélopathiques sur les repousses d'arbres. Cette situation représente bien un cas où un procédé écologique, simple et peu coûteux comme l'allélopathie peut être utilisé. C'est dans cette optique que Hydro-Québec a confié à notre laboratoire de recherche plusieurs études reliées à l'allélopathie. Parmi celles-ci se retrouve la présente étude : Méthode analytique pour la récupération de substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillons naturels.

1.2 Objectifs de l'étude

Le premier objectif de l'étude est le développement d'une méthode analytique pour la récupération de composés à potentiel allélopathique extraits à partir d'échantillons aqueux. La méthode analytique devra offrir la possibilité de concentrer les échantillons afin de faciliter les analyses par chromatographie en phase gazeuse et en phase liquide.

L'identité de tous les composés à potentiel allélopathique n'est pas connue. Par contre, des composés à potentiel allélopathique répertoriés dans d'autres études appartiennent à différentes familles chimiques^{1,2}. Ces composés peuvent avoir un caractère acide, basique, neutre et même amphotère. Dans cette optique, la méthode analytique développée devra permettre la récupération quantitative d'une diversité de composés.

La méthode devra aussi permettre d'effectuer un fractionnement chimique des composés. La réduction du nombre de composés par fraction facilitera le profilage chromatographique. Le fractionnement chimique permettra aussi d'effectuer des tests d'activités biologiques sur chacune des fractions, de cibler les fractions avec une activité allélopathique et de limiter les recherches des composés à potentiel allélopathique sur les fractions actives. De plus, la préparation de l'échantillon devra permettre une analyse chromatographique en phase gazeuse ou liquide selon la nature des composés à analyser.

Les composés à potentiel allélopathiques proviennent d'une multitude de sources. Ils proviennent des feuilles, des racines, des tiges, des eaux de percolation et même du sol entourant la plante^{1,2}. De ce fait, la méthode analytique ne devra pas se limiter à la présente étude mais pouvoir être utilisée dans les études subséquentes. Dans ce contexte, la procédure devra prévoir la préparation des échantillons obtenus suite à une extraction par un

solvant organique afin de permettre leur introduction dans la méthodologie analytique.

Dans un deuxième temps, la méthode analytique sera utilisée pour l'analyse des eaux de percolation du sol entourant la plante, le *Kalmia Angustifolia*. Pour ce faire, une méthode d'échantillonnage des eaux de percolation de sol sera mise sur pied. Cette méthode devra permettre la récupération des eaux de percolation du sol de la plante issues des eaux d'arrosage. La méthode développée devra assurer la conservation de l'intégrité chimique des échantillons tout au long du procédé. Ces échantillons aqueux seront traités afin de vérifier la présence de composés à potentiel allélopathique.

Finalement, une évaluation de la capacité de récupération de la procédure d'échantillonnage sera effectuée. Un modèle à petite échelle du système d'échantillonnage sera développé. Un bilan de matière entre les substances recueillies dans les eaux de percolation et celles demeurées dans le sol déterminera l'efficacité de la procédure d'échantillonnage.

CHAPITRE 2

L'ALLÉLOPATHIE

2.1 Généralités

L'allélopathie est un terme qui a été introduit par Molish en 1937¹. Du grec *allêlon* signifiant "l'un l'autre" et *pathos* "maladie", ce terme est utilisé pour identifier l'ensemble des interactions biochimiques entre les plantes et les micro-organismes de leur environnement⁵. Les composés chimiques produits et émis par les plantes sont responsables des effets allélopathiques. Un certain nombre de ces composés libérés possèdent une activité biologique. L'activité biologique a pour effet d'influencer la croissance et le développement des plantes, et ce, à différents niveaux. Il est à noter que l'effet des composés allélopathiques peut être stimulateur ou inhibiteur de croissance et de développement^{1,5}.

L'allélopathie est un moyen de protection et de sélection naturelle pour les espèces végétales envers leur environnement immédiat. Ainsi, ce phénomène s'ajoute aux modes de compétition traditionnels qui impliquent les plantes dans la lutte pour la lumière, l'espace et les éléments nutritifs nécessaires à la croissance et au développement.^{1,5}

Un contrôle des phénomènes allélopathiques pourrait être favorable pour des fins économique, industrielle et même récréative. L'agriculture et la sylviculture seraient les premières bénéficiaires d'un tel avancement de la science. De cette nouvelle technologie naîtraient des solutions simples, peu coûteuses et écologiques pour le contrôle de la végétation. C'est suite à la

réalisation de ces nombreuses possibilités que l'intérêt de la recherche n'a sans cesse augmenté afin d'identifier les composés allélopathiques et de comprendre les paramètres responsables des phénomènes allélopathiques.

Malgré l'intérêt récent apporté à ce domaine, les phénomènes allélopathiques sont observés depuis de nombreuses années. Théophrastus (300 av. J.C)¹ avait remarqué que le pois chiche diminuait la valeur nutritive des sols. De Candolle (1812)¹ croyait que les manques de nutriments dans les sols pourraient provenir des exsudats racinaires des plantes de culture. Il suggéra une rotation des cultures afin d'alléger ce problème¹.

Il aura tout de même fallu attendre Molish, en 1937, pour donner un nom à cette science et encore près de vingt ans pour instaurer une terminologie afin d'identifier les composés chimiques responsables des effets allélopathiques. Il est à noter que le producteur et le récepteur des composés ne sont pas nécessairement des plantes puisque les micro-organismes du milieu jouent un rôle très important dans les échanges allélopathiques. Les substances allélopathiques ont principalement des effets unidirectionnels. Par contre, il est possible de rencontrer une substance pouvant agir sur deux types de récepteur. Par exemple, une substance allélopathique émise par une plante peut agir sur une autre plante et sur un micro-organisme simultanément^{1,5}.

2.2 Modes de libération et d'absorption des substances allélopathiques.

Les phénomènes allélopathiques sont causés par le transfert de composés allélopathiques d'un producteur à un récepteur. Les modes de libération chez les plantes ont été observés et certaines évidences indiquent que l'émission des substances dans l'environnement se fait par volatilisation, exsudation racinaire, lessivage par la pluie et par décomposition de résidus de plantes sur

le sol^{1,2,5}. L'absorption des substances par la plante se fait par contact direct des substances avec la plante, par voie humide (eau absorbée par la plante), par voie aérienne (mécanisme de respiration) ou par l'intermédiaire de parasites.^{1,5}

De nombreux auteurs ont étudié l'effet des substances volatiles sur la croissance et le développement des autres plantes^{1,2,5-11}. Par exemple, Elmer a démontré que les substances volatiles émises par les pommes et les poires empêchent la pousse des germes de pommes de terre¹. Ces substances sont émises dans l'atmosphère et peuvent être absorbées directement par le récepteur. Elles peuvent, de plus, être adsorbées par le sol et entrer en contact avec la plante par voie humide^{1,2,5}. Les substances volatiles les plus actives sont principalement composées de terpènes simples et ont été répertoriées dans les régions les plus arides¹.

Les substances peu volatiles produites par les plantes peuvent se retrouver sur le sol à la suite d'un lessivage de la plante par la pluie^{12,13,14}. Ces substances réunissent généralement des composés phénoliques et des coumarines. Ces composés sont par la suite absorbés par les plantes avoisinantes par contact direct ou par voie humide⁵.

Les exsudats racinaires sont définis comme étant des substances libérées dans les sols par des racines intactes et en santé⁵. Ces substances, bien qu'é émises en faibles quantités, sont très actives et jouent un rôle très important^{1,15,16}. Par contre, leur étude est très difficile puisqu'on doit contrôler l'influence des racines mortes, de la terre et des micro-organismes. La culture des racines dans un environnement artificiel est fréquemment utilisée pour contourner ces inconvénients. Des systèmes de récupération d'eau de percolation se sont aussi montrés particulièrement efficaces pour ce genre d'étude². Parmi les substances détectées, on retrouve principalement des

dérivés d'acides phénoliques et cinnamiques^{1,17,18}. Le récepteur capte ces substances par voie humide avec ses racines.

La décomposition de résidus est le mode de libération de substances allélopathiques le plus prolifique^{1,5}. Par contre, l'étude des substances émises par ce mode de libération est ardue. Il est très difficile de déterminer avec exactitude l'origine des substances retrouvées dans les analyses. En fait, le sol qui supporte les résidus est un milieu très dynamique et les substances qui s'y retrouvent sont sujettes à la destruction, l'adsorption, l'inactivation et la transformation par les micro-organismes présents dans la terre. De plus, le sol accueille les substances émises par les autres modes de libération, ce qui apporte un élément supplémentaire à contrôler. Les principales substances répertoriées pour ce mode de libération sont des alcools et des acides phénoliques^{19,20}.

2.3 Modes d'action des substances allélopathiques

La croissance et le développement des plantes sont influencés par l'absorption de substances allélopathiques. Les agents inhibiteurs ont un effet sur les mécanismes de développement de la plante.

Les revues de Rice¹ et de Mandava⁵ sur les phénomènes allélopathiques traitent de l'influence des différents agents allélopathiques sur la croissance des plantes. Cette influence se caractérise par une diminution de la division cellulaire, de l'efficacité des hormones végétales, des fonctions enzymatiques et de la synthèse organique de plusieurs substances nécessaires au développement de la plante. A ces problèmes s'ajoute une réduction de l'efficacité des échanges gazeux qui se traduit par une baisse de l'efficacité de la photosynthèse et de la respiration. De plus, les substances allélopathiques limitent l'apport des minéraux essentiels à la nutrition et au développement

des plantes. Donc, les substances allélopathiques produites nuisent au développement des plantes avoisinantes en les attaquant sur tous les fronts.

Il est à noter par contre, que plusieurs facteurs extérieurs influencent la quantité et l'efficacité des substances allélopathiques. En effet, toujours selon Rice et Mandava, l'intensité de la lumière, la longueur des journées, la présence de certains minéraux, l'eau et la température sont tous des facteurs qui affectent la production des substances allélopathiques.

2.4 Familles chimiques et composés à potentiel allélopathique

Il est impossible de donner une liste exhaustive de l'ensemble des composés chimiques, susceptibles d'effets allélopathiques, répertoriés à ce jour. Seuls les composés les plus cités seront discutés. Par contre, l'ensemble des familles chimiques auxquelles les différents produits appartiennent sera énuméré.

La majorité des substances allélopathiques sont des composés secondaires, c'est-à-dire des composés qui n'ont aucun rôle important dans le métabolisme des organismes. Ces composés apparaissent sporadiquement et sont des dérivés d'acétate, de carbohydrates, de lipides et d'acides aminés²¹. Ces substances appartiennent à des familles très variées. Whittaker et Fenny²¹ les classent parmi les phénols, les acides phénoliques, les flavonoïdes et autres composés aromatiques contenant les terpènes, les stéroïdes, les alcaloïdes et les cyanures organiques.

Rice¹ de son côté, est plus spécifique dans l'attribution des familles pour les différents composés. Il a dressé une liste de 15 familles, dont une appelée "divers" qui permet d'inclure toutes nouvelles substances ne se rattachant pas aux 14 autres. Cette liste de familles se dresse comme suit: (A) les dérivés

d'acide cinnamique, (B) les coumarines, (C) les phénols simples et dérivés d'acide benzoïque, (D) les flavonoïdes, (E) les tannins, (F) les terpénoïdes et stéroïdes, (G) les acides organiques solubles dans l'eau, les alcools à longue chaîne aliphatique, les aldéhydes aliphatiques et les cétones, (H) les lactones insaturées, (I) les acides gras à longue chaîne, (J) les quinones et ses dérivés, (K) les acides aminés et les polypeptides, (L) les alcaloïdes et cyanohydrins, (M) les glucosides, (N) les purines et nucléosides.

À la vue de cette liste, on peut conclure que les substances susceptibles d'offrir des effets allélopathiques sont très variées. Elles peuvent être de simple gaz, des composés aliphatiques ou des composés complexes avec plusieurs cycles aromatiques. Par contre, l'ensemble des familles n'est pas considéré d'égale importance. Rice¹ et Mandava⁵ citent la famille des phénols et dérivés d'acide benzoïque, la famille de l'acide cinnamique et ses dérivés et finalement la famille des coumarines, des terpénoïdes et des flavonoïdes comme étant les plus importantes.

Parmi la famille des phénols et des dérivés d'acide benzoïque on retrouve le phénol, l'acide p-coumarique, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide vanillique dans un grand nombre d'études^{1,2}. Ces substances sont émises par exsudation racinaire, lessivage de la plante et décomposition de résidus².

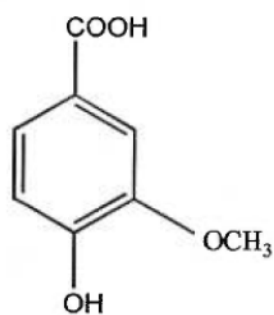
Les composés de la famille de l'acide cinnamique et ses dérivés ont été identifiés principalement dans les sols. Parmi ceux-ci, l'acide trans-cinnamique, l'acide ferrulique et l'acide caféïque sont les plus communs¹.

Pour la famille des coumarines, le mode d'émission le plus connu est l'exsudation racinaire. Parmi ces composés, on retrouve la coumarine et l'esculine. Ces composés ont des effets allélopathiques sur la germination de plusieurs plantes^{1,5}.

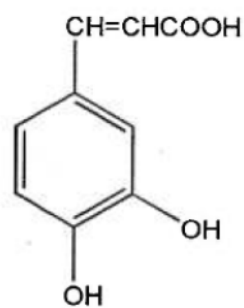
Chez les terpènes, famille de composés généralement émis par volatilisation, on retrouve le 1,8 cinéole et le camphène comme étant les substances les plus rapportées^{1,5,7}.

Du côté de la famille des flavonoïdes, on retrouve la rutine et la quercertine produites lors de la décomposition de résidus^{1,5}.

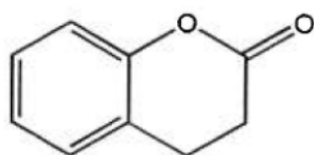
Les substances énumérées dans cette section sont reconnues pour avoir des effets allélopathiques. L'étude de ces effets allélopathiques est très complexe. Il faut contrôler un ensemble de paramètres, sans oublier les effets de synergie et de combinaison. De plus, la variation de concentration des composés peut provoquer des effets inattendus. Par exemple, l'acide ferrulique et l'acide p-coumarique ont des effets de stimulant sur la croissance à faible concentration. Par contre, l'effet inverse est observé pour ces composés à haute concentration⁵. Quelques exemples de structures de composés sont illustrés à la figure 1.



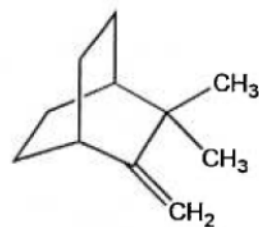
acide vanillique



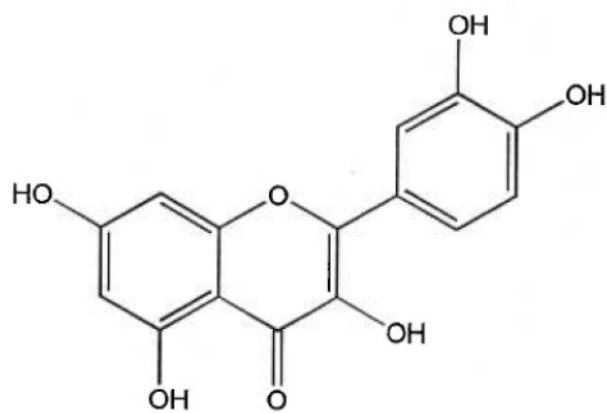
acide caféïque



coumarine



camphène



quercertine

Figure 1 : Exemples de composés à potentiel allélopathiques

2.5 Méthodes d'analyse des substances allélopathiques

Historiquement, les premières méthodes analytiques pour la détection et l'identification des substances allélopathiques étaient basées sur la chromatographie sur papier ou sur couche mince^{1,5}. Ces méthodes ont été délaissées à la fin des années 60 dû à leur faible performance, à la durée et à la complexité des manipulations pour obtenir les résultats escomptés.

Les techniques de chromatographie gazeuse (CG) et liquide (CL), plus performantes et perfectionnées, ont remplacé la chromatographie sur couche mince et sur papier au cours des années 70. Ces techniques offrent entre autres une meilleure sensibilité, une meilleure sélectivité et une meilleure efficacité. A l'aide de ces techniques, de nombreuses analyses ont été exécutées sur des composés appartenant aux familles à potentiel allélopathique^{1,5,22-28}. Les modes de détection utilisés en CG sont le détecteur à ionisation à la flamme (FID) et le détecteur azote phosphore (NPD). Le mode de détection utilisé en CL est le détecteur UV-Visible.

La chromatographie gazeuse, comparativement à la chromatographie liquide, est limitée à l'analyse de produits stables à haute température. Même avec l'utilisation de procédés de dérivation comme la méthylation, l'acétylation ou la silylation, la gamme de produits que l'on peut analyser en chromatographie en phase gazeuse est réduite. De plus, les étapes de dérivation augmentent le temps de préparation des échantillons. En échange, la grande sensibilité de ses détecteurs offre des limites de détection très basses, difficiles à atteindre en chromatographie liquide².

Au début des années 80, les techniques d'analyses s'améliorent et la spectrométrie de masse est utilisée avec la chromatographie gazeuse et liquide^{2,29-33}. L'avènement de la spectrométrie de masse ajoute alors une dimension aux techniques d'analyses. Elle offre une plus grande spécificité et

une meilleure information sur la structure des molécules analysées. La combinaison de l'information obtenue par le spectromètre de masse avec les informations obtenues chromatographiquement a permis une identification beaucoup plus facile des composés allélopathiques.

2.6 Méthodes analytiques pour l'échantillonnage, la récupération des substances allélopathiques

Avant d'effectuer l'analyse et l'identification de composés par chromatographie gazeuse ou liquide, l'échantillon doit être traité pour que les composés à potentiel allélopathique soient isolés de la matrice naturelle. Les composés sont produits par les plantes et émis dans l'environnement. L'isolation des substances allélopathiques du milieu naturel peut se faire selon deux approches. La première est l'extraction directe de chaque partie des plantes, des sols et des eaux de percolation^{1,2,5}. La seconde est l'élaboration de systèmes permettant la récolte de substances allélopathiques.

Parmi les différentes techniques disponibles pour la première approche, on retrouve le broyage et l'agitation dans l'eau froide ou bouillante, le trempage dans différents solvants et les extractions à l'aide d'un soxhlet^{2,5,23,24,29,31}. Toutes ces méthodes d'extractions de plantes semblent efficaces mais demandent beaucoup de travail et d'analyses. De plus, on doit combiner tous les résultats pour avoir une vue d'ensemble des composés à potentiel allélopathique sécrétés par une plante.

Des alternatives aux extractions ont été proposées. Par exemple, Clayton et Lamberton² ont utilisé un système à l'intérieur duquel les racines des plantes sont suspendues dans un pot. Les vapeurs générées par les arrosages avec une solution nutritive conservent les racines en bon état. Cette "boîte à vapeur" a permis de récolter et d'étudier les exsudats racinaires de certaines

plantes². Par contre, les substances recueillies ne s'appliquent qu'à la récupération de substances reliées à un mode d'émission spécifique, l'exsudation racinaire. De plus, dans ces conditions, les substances émises peuvent différer des substances produites dans le milieu naturel de la plante². Il subsiste donc toujours un doute, malgré l'information obtenue, sur l'exactitude des résultats.

Un deuxième système de récolte de substances allélopathiques est le système d'extraction en continu proposé par Tang². Les plantes poussent dans un environnement artificiel composé de sable et de roches. Une solution nutritive circule en continu et traverse au passage un tube de résine adsorbante de type XAD-4. Ce système permet l'analyse de la majorité des substances allélopathiques obtenues suite à l'exsudation racinaire, puisque celles-ci sont hydrophobes ou partiellement hydrophobes, ce qui convient parfaitement au type de résine utilisée². Les substances émises par volatilisation et décomposition de résidus peuvent aussi être analysées. Les substances ou les débris de la plante peuvent atteindre le sol. Ces substances sont entraînées par la solution nutritive et adsorbées par la résine XAD-4. Par contre, le mode d'émission par lessivage n'est pas considéré de même que les effets allélopathiques causés par les micro-organismes. Ceux-ci peuvent influencer l'activité des substances. Certaines substances allélopathiques au contact du milieu naturel sont neutralisées. Inversement, l'interaction entre les micro-organismes et d'autres substances peuvent produire des effets allélopathiques^{1,7}. Donc, même si les substances sont actives hors du milieu naturel, rien ne vient confirmer leur activité en milieu naturel.

De plus, des études menées par Junk² ont démontré que les substances acides sont difficilement retenues en milieu neutre sur une résine adsorbante de type XAD-4. Dans ce cas-ci, l'effet est légèrement atténué par la présence d'ions à l'intérieur de la solution nutritive et par la circulation en continu de

cette même solution². Par contre, les substances allélopathiques les plus fréquemment rapportées dans la littérature appartiennent aux familles des acides phénoliques et cinnamiques^{1,5}.

L'isolation des composés à potentiel allélopathique des solvants d'extraction doit être effectuée à la suite du traitement de l'échantillon naturel. Les principales techniques utilisées pour isoler les substances allélopathiques sont l'évaporation directe des solvants^{22,25}, l'extraction liquide-liquide^{2,29,31} et l'extraction solide-liquide^{2,23,27}. L'évaporation directe des solvants est la solution la plus simple, la moins coûteuse, la plus rapide et la plus utilisée. Par contre, les extractions à la suite du traitement de l'échantillon, offrent l'avantage de pouvoir fractionner les composés obtenus et de réduire la complexité des analyses subséquentes². Malgré cela, l'utilisation d'une extraction, suite au traitement de l'échantillon naturel, n'est utilisée que pour isoler les substances d'une matrice aqueuse ou difficile à évaporer. Les principaux solvants utilisés pour les extractions liquide-liquide sont le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle^{1,2,5,31}. La principale cartouche utilisée pour les extractions solide-liquide contient une phase stationnaire de type octadécyl^{2,27,33}.

2.7. Identification de la végétation incompatible avec le réseau de distribution d'électricité d'Hydro-Québec

La végétation incompatible est la communauté arborescente, qui de par sa taille, entrave le bon fonctionnement et altère la qualité du réseau de distribution d'électricité d'Hydro-Québec. Cette communauté est composée d'espèces intolérantes à l'ombre qui cherche à s'étendre dans les milieux ouverts, c'est-à-dire l'emprise du réseau de distribution d'électricité.

Une étude, effectuée par le groupe de recherche Haut Saint-Laurent écologie et aménagement de l'Université de Montréal (GRHSLEA)³⁴, dresse une liste des espèces végétales bordant la ligne de transport d'électricité. L'état actuel de la végétation qui borde l'emprise est boisé à plus de 50 %. Cette ligne est donc soumise à une pression constante de reforestation à cause des grandes surfaces forestières adjacentes. Parmi les espèces arborescentes nuisibles, on retrouve principalement des peupleraies, des cédraies, des érablières, des pinèdes et des ormaies.

2.8 Stratégie analytique globale

Afin d'atteindre les objectifs fixés pour les différents projets de recherche sur l'allélopathie, une stratégie analytique globale a été élaborée. Cette stratégie devait tenir compte des exigences d'Hydro-Québec et de tous les intervenants affiliés à ce projet.

L'étude des phénomènes allélopathique avec des espèces végétales, nécessite l'apport de plusieurs disciplines. Pour cette raison, la présente étude s'effectue en collaboration avec le Groupe de Recherche Haut Saint-Laurent Écologie et Aménagement (GRHSLEA) et avec l'Institut de Recherche en Biologie Végétale de l'Université de Montréal (IRBV) pour l'identification et l'étude de comportement des espèces végétales. La combinaison de l'ensemble des résultats obtenus des différentes études devrait permettre à Hydro-Québec de mettre sur pied une approche écologique et peu coûteuse pour la gestion de ses ressources végétales sous les lignes de transport d'électricité. Les études effectuées par l'IRBV, le GRHSLEA et par notre groupe de recherche peuvent se visualiser avec la figure 2.

Cette figure schématise l'ensemble des travaux effectués par chacune des parties concernées, afin de bien comprendre la stratégie analytique globale.

Chaque section correspond à une étape dans le développement de la méthode analytique globale.

La première étape illustrée sur cette figure est la revue de la littérature. Cette revue est effectuée afin d'identifier les composés chimiques à potentiel allélopathique et les espèces végétales offrant un potentiel allélopathique. Ces recherches permettent d'évaluer les effets des substances allélopathiques dans les lignes de transport d'électricité, de cibler les familles de composés allélopathiques et les espèces végétales potentielles.

La deuxième étape consiste au développement d'outils analytiques. Ces outils analytiques sont utilisés pour l'identification et la caractérisation des substances allélopathiques. Cette étape permet de développer un outil analytique permettant d'analyser une vaste gamme de composés avec une limite de détection difficile à égaler par les autres techniques d'analyse.

La troisième étape est la procédure d'échantillonnage de substances allélopathiques. Cette procédure permet de récolter des échantillons contenant des composés à potentiel allélopathique. Tel que discuté dans la section 2.6, l'échantillonnage peut se faire par extractions directes ou par l'élaboration de système de récolte. Les systèmes de récolte doivent être conçus à partir de systèmes contrôlés afin de conserver l'intégrité chimique et biochimique des échantillons.

La quatrième étape est consacrée au traitement des échantillons. Les échantillons récoltés sont préconcentrés à cause des faibles teneurs attendues des substances allélopathiques. Par la suite, l'échantillon est soumis à un fractionnement chimique de façon à faciliter les analyses subséquentes.

La cinquième étape est le profilage chromatographique et les tests d'activité biologique. Une empreinte chromatographique est effectuée pour chaque fraction obtenue de la procédure de fractionnement chimique. De plus, des tests d'activité biologique sont effectués sur ces fractions. L'empreinte chromatographique permet un travail d'identification des composés à potentiel allélopathique plus rapide et les tests d'activités biologiques identifient les fractions actives sur lesquelles notre attention doit être portée.

L'étape finale est l'identification des composés à potentiel allélopathique à l'aide des outils analytiques préalablement développés.

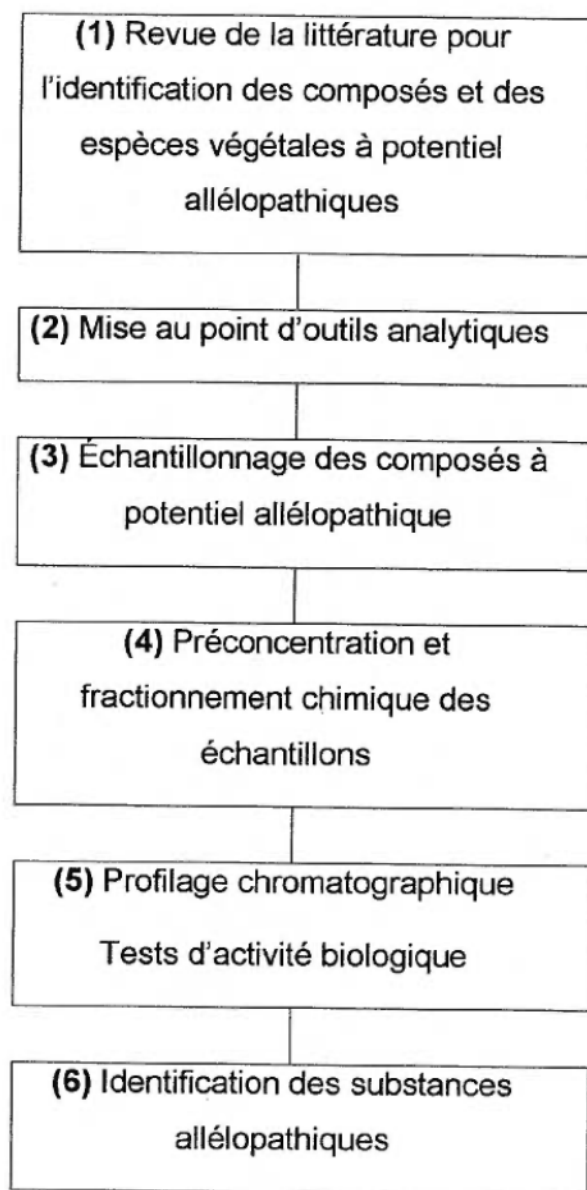


Figure 2: Schéma de la stratégie analytique

2.9 Approche de l'étude

La présente étude se situe au niveau des étapes 1, 3 et 4 de la stratégie analytique globale. Le travail au niveau de la première étape de la stratégie analytique globale est limité. Il consiste à effectuer le choix des composés à potentiel allélopathique et le choix de l'espèce végétale pour étudier les composés allélopathiques. Ces choix sont effectués en se basant sur l'étude des composés et des espèces végétales à potentiel allélopathique réalisée par l'IRBV et le GRHSLEA. Le travail à effectuer au niveau de la troisième étape de la stratégie analytique globale contient deux objectifs. Ces objectifs sont le développement et l'évaluation d'un système de collecte des eaux de percolation de sol en milieu contrôlé. Finalement, le travail à effectuer pour la quatrième étape de la stratégie analytique globale est aussi composé de deux objectifs. Ces objectifs sont la préconcentration d'échantillons aqueux et le fractionnement chimique des échantillons recueillis lors de l'échantillonnage. Les prochaines sections résument les différentes étapes de l'approche analytique spécifique à la présente étude.

2.9.1 Identification de la végétation à potentiel allélopathique

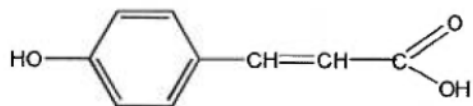
Les espèces végétales choisies en collaboration avec le GRHSLEA devaient répondre à de nombreux critères. Elles devaient, non pas seulement émettre des substances allélopathiques, mais aussi offrir un potentiel de blocage successional. La forme biologique, la densité maximale au sol et la reproduction végétative sont les critères les plus importants à respecter. Il est donc primordial d'avoir des arbustes avec une grande capacité reproductrice et occupant le maximum d'espace au sol. Les autres critères sont l'amplitude écologique, la croissance annuelle, le potentiel allélopathique et la capacité de ralentir la croissance des autres espèces ligneuses par compétition naturelle.

Selon ces critères, le choix des espèces s'est arrêté sur le *Kalmia Angustifolia* (*Kalmia* à feuille étroite) dont la littérature cite l'émission de substances allélopathiques en plus d'offrir une bonne capacité reproductrice et une bonne amplitude écologique³⁴.

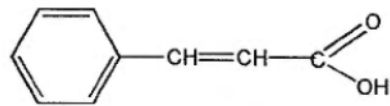
2.9.1.1 Liste des composés chimiques retenus

Le choix des substances à utiliser a été effectué en tenant compte des composés répertoriés dans la littérature et énumérés partiellement dans la section 2.4. De plus, une attention particulière a été portée sur l'étude effectuée par le GRHSLEA³⁴ concernant le *Kalmia Angustifolia*. A l'intérieur de cette étude, la présence d'alcaloïdes, de terpènes, de composés phénoliques, d'acides carboxyliques et glucosides cyanogénés a été rapportée. Il est à noter que ces substances ne sont pas identifiées comme étant allélopathiques, seule leur présence a été détectée. L'information se veut donc complémentaire à celle obtenue dans la littérature. Pour cette raison, on se doit de sélectionner les composés à l'intérieur de plusieurs familles, de façon à ne pas limiter la procédure expérimentale. Le tableau 1 présente ces substances classées selon leur famille respective.

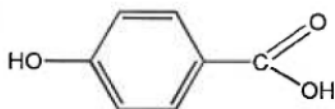
Tableau 1: Liste des composés chimiques sélectionnés

Acides carboxyliques:

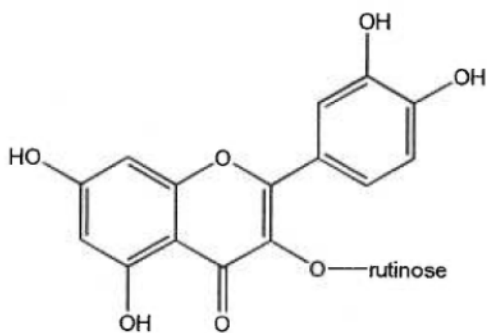
acide p-coumarique



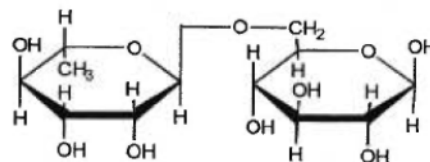
acide t-cinnamique



acide p-hydroxybenzoïque

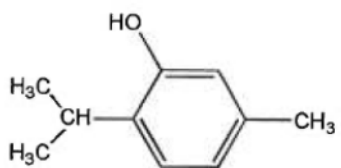
Flavonoïde:

rutine

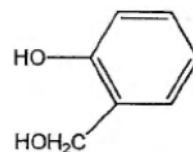


rutinose

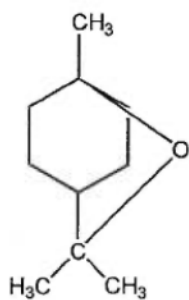
Tableau 1: (suite)

Phénols:

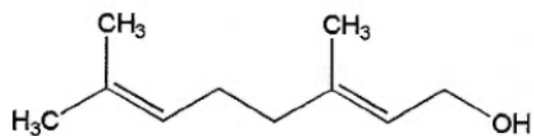
thymol



alcool salicylique

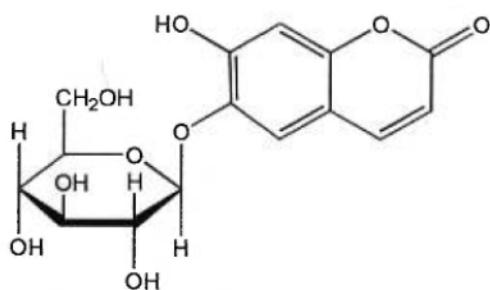
Terpènes:

cinéole

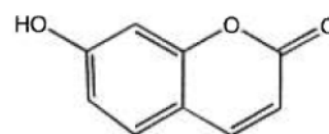


géraniol

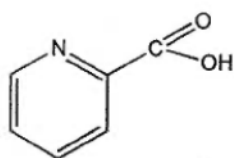
Tableau 1: (suite)

Lactones:

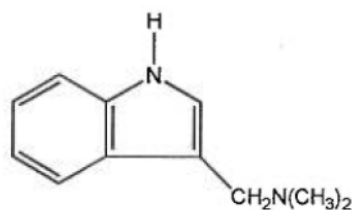
esculine



umbelliférone

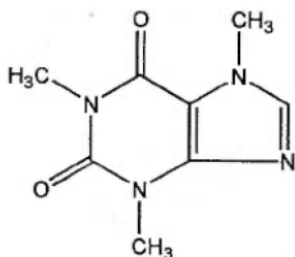
Alcaloïdes:

acide picolinique

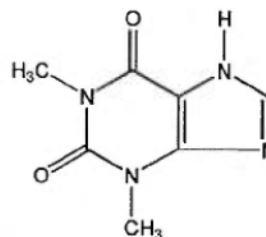


gramine

Tableau 1: (suite)

Xanthines:

caféine



théophylline

2.9.2 Approche analytique pour l'échantillonnage, la récupération et le fractionnement chimique des substances allélopathiques

L'approche analytique est développée afin de rencontrer les objectifs fixés à la section 1.2. Le développement de la méthode analytique s'effectue en tenant compte des technologies disponibles (section 2.5) et des méthodes analytiques développées dans d'autres études (section 2.6).

Des conditions de séparations chromatographiques en phase liquide et gazeuse seront mises au point pour les composés cités au tableau 1. L'évaluation de l'ensemble des méthodes analytiques se fera à l'aide de ces méthodes chromatographiques.

2.9.2.1 Développement et l'évaluation d'un système de collecte des eaux de percolation de sol en milieu contrôlé

Le premier objectif est le développement d'un système de récupération des eaux de percolation du *Kalmia Angustifolia*. Les techniques citées à la section 2.6 sont efficaces. Par contre, elles ne permettent pas l'analyse simultanée de l'ensemble des modes de libération des substances allélopathiques. Cette contrainte représente un temps d'analyse très long pour couvrir tous les modes d'émission de substances allélopathiques. De plus, les plantes ne poussent pas dans des conditions naturelles. Le milieu artificiel influence la quantité et le type de substances émises par la plante². Pour ces raisons, le système utilisé par Tang² sera modifié pour l'élaboration de la procédure d'échantillonnage. Un système d'échantillonnage sous conditions contrôlées sera développé. Le sol artificiel sera remplacé par le sol naturel du *Kalmia Angustifolia*. La solution nutritive sera remplacée par des eaux d'arrosage. Les eaux d'arrosage seront appliquées directement sur la plante afin de produire un lessivage des substances allélopathiques. Les eaux d'arrosage seront recueillies pour être traitées ultérieurement.

Le deuxième objectif de cette étude est la vérification du potentiel de récupération de la procédure d'échantillonnage. Pour ce faire, un modèle à petite échelle du système d'échantillonnage sera reproduit en laboratoire. Le sol du *Kalmia Angustifolia* y sera introduit et enrichi avec un mélange de substances à potentiel allélopathique. Le sol sera ensuite arrosé avec de l'eau. Un bilan de matière entre les substances recueillies dans les eaux de percolation et celles demeurées dans le sol déterminera l'efficacité de la procédure. La détermination des substances dans le sol nécessite l'optimisation d'une méthode d'extraction des sols. Un choix des solvants d'extraction sera effectué.

2.9.2.2 Préconcentration d'échantillons aqueux et le fractionnement chimique des échantillons recueillis lors de l'échantillonnage

Le premier objectif fixé est la récupération des composés à potentiel allélopathique à partir d'échantillons aqueux. Le niveau de concentration des composés attendus dans la matrice aqueuse est très faible. Dans ce contexte, l'isolation des composés à potentiel allélopathique est essentielle afin d'augmenter le niveau de concentration des composés. Pour ce faire, deux approches sont disponibles. L'extraction liquide-liquide et l'extraction solide-liquide. Dans le cas présent, l'extraction solide-liquide est l'approche la plus intéressante. Les volumes d'échantillons aqueux prévus sont d'environ 250 mL. Effectuer une extraction liquide-liquide sur un volume aussi grand génère des coûts élevés en solvants. De plus, le temps requis pour une extraction liquide-liquide est considérable. Le choix se porte donc sur une extraction sur phase solide. L'optimisation de l'extraction est effectuée à l'aide d'un mélange synthétique contenant les composés du tableau 1. Le type de phase stationnaire à utiliser sera étudié de même que les conditions d'extraction (pH, volume d'élution etc..).

Le deuxième objectif de l'étude est le développement d'une méthode de fractionnement chimique des échantillons. En variant le pH de la solution aqueuse, il est possible d'effectuer un fractionnement chimique en utilisant une extraction liquide-liquide ou une extraction solide-liquide. Les deux techniques seront étudiées et comparées afin de choisir celle qui convient le mieux à nos applications. L'optimisation des méthodes est effectuée à l'aide d'un mélange synthétique contenant les composés du tableau 1. Dans le cas de l'extraction liquide-liquide le choix des solvants et le pH de la solution aqueuse seront étudiés. En ce qui a trait à l'extraction solide-liquide, les résultats de l'optimisation de la récupération des substances allélopathiques seront utilisés. L'utilisation des mêmes phases stationnaires à des conditions

de pH différentes sera étudiée afin d'effectuer un fractionnement chimique des échantillons.

CHAPITRE 3

PARTIE EXPÉRIMENTALE

3.1 Instrumentation

3.1.1 Chromatographie en phase gazeuse

Le système de chromatographie en phase gazeuse est un chromatographe Hewlett and Packard HP-5840A. Ce système est modifié pour l'utilisation d'une colonne capillaire ou mégabore avec l'ensemble de conversion J2201100 de Chromatographic Specialties (Brockville, Ont). La colonne utilisée est une colonne peu polaire de type DB-5. Ses dimensions sont de 0.53 mm de diamètre interne et de 30 m de longueur. Le film de phase stationnaire, d'une épaisseur de 0.5 μm , est composé de 5 % phényle et de 95 % méthyle. Cette colonne est vendue par Chromatographic Specialties (Brockville, Ont). Le détecteur utilisé est un détecteur à ionisation à la flamme (FID). Le gaz porteur est l'hélium et les gaz de combustion sont l'air et l'hydrogène. Le tableau 2 décrit les conditions d'utilisation du chromatographe en phase gazeuse.

Tableau 2: Conditions d'utilisation du chromatographe en phase gazeuse

Rampe de température	90 °C, 3 min. / 15 °C min. ⁻¹ / 260°C, 1 min.	
Débit	Hélium	5 mL/min.
	Hydrogène	40 mL/min.
	Air	100 mL/min.
	Gaz d'appoint hélium	30 mL/min.
Température	Injecteur	280°C
	Détecteur	300°C

3.1.2 Chromatographie liquide

Le système de chromatographie à phase liquide utilisé est composé d'une pompe Perkin-Elmer quaternaire de série LC-410, d'un injecteur Rhéodyne 7125 muni d'une boucle d'injection de 6 µL et d'un détecteur UV-Visible Perkin-Elmer LC-85 dont le volume de la cellule de détection est de 1.8 µL. La colonne chromatographique utilisée contient une phase stationnaire de type octadécylsilane (ODS). Elle est d'une longueur de 15 cm par 0.46 cm de diamètre interne contenant des particules de phase stationnaire de 5µm. Cette colonne provient du fournisseur C.S.C. (Montréal, Qué.). La phase mobile nécessite l'utilisation d'eau de qualité Millipore™ obtenue d'un système Milli-Q™, de l'acétonitrile de qualité HPLC et de l'acide acétique. La phase mobile est dégazée trente minutes à l'aide d'un jet d'azote. Les conditions d'opération du chromatographe LC-410 sont résumées dans le tableau 3 et 4.

Tableau 3: Conditions d'utilisation du chromatographe LC-410 pour l'optimisation de la méthode de récupération et de fractionnement chimique des composés à potentiel allélopathique

Phase mobile: acétonitrile/eau (ajustée à pH 3 avec de l'acide acétique)

Gradient d'élution: 2.0 % ACN à 20.0 % ACN en 15 minutes
20.0 % ACN à 100 % ACN en 10 minutes

Débit de la phase mobile: 1 mL/min.

Longueur d'onde d'analyse: 254 nm

Tableau 4: Conditions d'utilisation du chromatographe LC-410 pour l'optimisation des extraits de terre

Phase mobile: acétonitrile/eau (ajustée à pH 3 avec de l'acide acétique)

Gradient d'élution: 0.00 % ACN à 13.5 % ACN en 18 minutes
13.5 % ACN à 100 % ACN en 12 minutes
100 % ACN pendant 5 minutes

Débit de la phase mobile: 1 mL/min.

Longueur d'onde d'analyse: 254 nm

3.2 Composés chimiques et solvants

Les composés chimiques utilisés pour le développement de la méthode analytique proviennent de chez Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.).

Les composés inorganiques comme l'acide chlorhydrique, l'acide acétique et l'hydroxyde de sodium proviennent de B.D.H (Montréal, Qué.).

Plusieurs solvants ont été utilisés au cours de ces expériences. Le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'hexane et l'acétone de qualité GC-MS ont été obtenus de la compagnie Baxter (Mississauga, Ontario). L'acétonitrile et le méthanol de qualité spectrograde ont été achetés chez Aldrich (Milwaukee, Wisconsin U.S.A.). L'eau provient d'un système de purification Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.).

Les gaz utilisés proviennent de chez Liquid-Carbonic (Montréal, Québec).

Les cartouches adsorbantes pour les extractions solide-liquide proviennent de la compagnie Waters (Boston, Massachusetts).

Les cartouches d'extractions en cellulose Whatmann pour soxhlet proviennent de chez Baxter (Mississauga, Ontario).

CHAPITRE 4

MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

4.1 Introduction

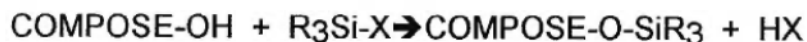
Les profils chromatographiques des substances énumérées au tableau 1 ont été effectués par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie en phase liquide. L'analyse simultanée de tous les composés est impossible. Les terpènes du tableau 1 absorbent très peu en UV-Visible et rendent les analyses par chromatographie en phase liquide impossible. De leur côté, la majorité des flavonoïdes sont instables aux hautes températures nécessaires à la chromatographie en phase gazeuse. De plus, le mélange de substances a été séparé en petits groupes afin de réduire le temps d'analyse.

4.2 Dérivation pour chromatographie en phase gazeuse

La dérivation de groupements fonctionnels sur certains composés s'avère nécessaire afin de permettre une analyse par chromatographie en phase gazeuse. Par exemple, le remplacement des hydrogènes actifs atténue les possibilités de lien hydrogène et par le fait même abaisse le point d'ébullition des composés. De plus, on observe chez les composés dérivés une augmentation très nette de leur stabilité lors des analyses³⁵.

Dans la présente étude, les échantillons sont dérivés avant chaque analyse par chromatographie en phase gazeuse. La méthode de dérivation utilisée est la silylation des fonctions hydroxyles par un réactif triméthylsilylant. Ce type de réactif remplace les hydrogènes actifs sur les groupements OH, SH et NH

pour former le composé dérivé^{35,36}. La réaction de silylation générale est la suivante.



Dans notre cas, le réactif utilisé est le N-Méthyl-N-Triméthylsilyltrifluoroacétamide connu sous l'abréviation MSTFA. Le mécanisme de la silylation implique une attaque nucléophile du composé sur l'atome de silice contenu dans le MSTFA. L'observation de la structure de ce réactif, à la figure 3, démontre la possibilité d'obtenir un état de transition par la stabilisation de la charge négative sur le groupement partant.

Cet agent silylant réagit efficacement et rapidement lorsqu'en contact avec la solution à injecter dans des proportions de 1:10 (agent silylant: solution à injecter). Par contre, le MSTFA est sensible à l'humidité et doit être conservé sous une atmosphère inerte. De plus, pour une bonne efficacité, le milieu réactionnel doit être propre et sec. Pour ces raisons, la dérivation des composés ne s'effectue que quelques instants avant l'injection. Une partie de MSTFA est combinée avec 10 parties de la solution d'acétonitrile à injecter. On laisse le mélange reposer pendant une minute, puis on injecte dans le chromatographe en phase gazeuse.

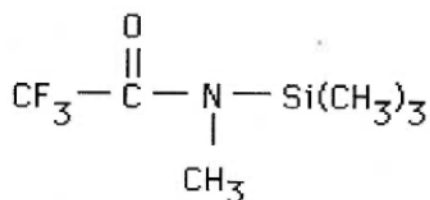


Figure 3: Structure du MSTFA

4.3 Phase mobile pour la chromatographie en phase liquide

La phase mobile pour les analyses par chromatographie en phase liquide utilise de l'eau contenant de l'acide acétique afin d'ajuster son pH aux environs de 3. La colonne chromatographique utilisée (octadécylsilane) est compatible avec ce genre de phase mobile. Cette colonne est stable dans un intervalle de pH compris entre 2.5 et 7.5. En dessous de ces limites ($\text{pH} < 2.5$), il peut y avoir hydrolyse des liens siloxanes et une perte de rétention. Au-delà de ces limites ($\text{pH} > 7.5$), la silice peut être solubilisée pour détruire la colonne chromatographique. Un pH de 3 réduit la dissociation des acides carboxyliques qui ont un pK_a entre 3 et 5 et permet d'obtenir une meilleure rétention et une plus grande symétrie des pics chromatographiques obtenus.

4.4 Limites de détection

La limite de détection est la concentration ou la quantité injectée d'un composé permettant une détection adéquate de ce composé. Snyder et Kirkland³⁷ définissent la limite de détection d'un composé comme suit : la quantité injectée d'un composé donnant un signal sur bruit supérieur à 2 est la limite de détection de la méthode d'analyse pour ce composé. Dans la présente étude, la réponse d'un composé donnant un signal sur bruit supérieur à 3, détermine la limite de détection de ce composé. Les limites de détection du détecteur FID, utilisé pour les analyses en chromatographie en phase gazeuse, se retrouvent dans le tableau 5. Les limites de détection du détecteur UV-Visible, utilisé à une longueur d'onde de 254 nm pour les analyses en chromatographie en phase liquide, se retrouvent dans le tableau 6. L'étude des tableaux 5 et 6 indique que les limites de détection pour les méthodes chromatographiques sont de l'ordre du ng de substances injectées. La limite de détection varie entre 1 et 25 ng selon le composé injecté. Le

niveau de concentration des composés sera maintenu au-delà des limites de détection de la méthode analytique.

Tableau 5: Limites de détection observées pour le détecteur FID

acide p-coumarique	1	ng
acide p-hydroxybenzoïque	1	ng
acide t-cinnamique	1	ng
thymol	1	ng
alcool salicylique	1	ng
cinéole	1	ng
géraniol	1	ng
umbelliférone	1	ng
acide picolinique	1	ng
gramine	1	ng
caféine	25	ng
théophylline	25	ng

Tableau 6: Limites de détection observées pour le détecteur UV

acide p-coumarique	2	ng
acide p-hydroxybenzoïque	2	ng
acide t-cinnamique	1	ng
rutine	3	ng
thymol	13	ng
alcool salicylique	6	ng
esculine	13	ng
umbelliférone	2	ng
tryptophane	6	ng
caféine	3	ng
théophylline	2	ng

4.5 Linéarité

Les détecteurs utilisés doivent avoir un grand domaine de linéarité afin de permettre l'analyse d'une vaste gamme de concentrations des composés. Les domaines de linéarité des systèmes chromatographiques ont été évalués avec des solutions de concentrations différentes. Un exemple de la linéarité du détecteur FID, utilisé pour la chromatographie en phase gazeuse, est donné à la figure 4. Un exemple de la linéarité du détecteur UV-Visible, utilisé à une longueur d'onde de 254 nm pour la chromatographie en phase liquide, est donné à la figure 5. L'étude des figures 4 et 5 indique que les domaines de linéarité sont au minimum de deux ordres de grandeur. La concentration des composés analysés se situera dans cet intervalle.

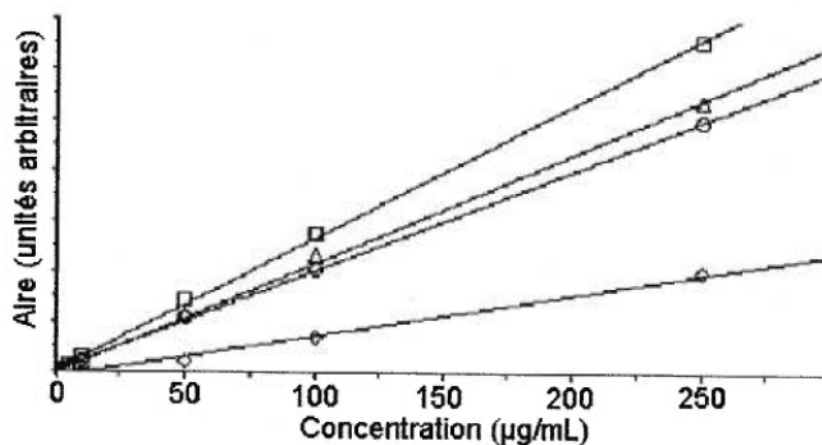


Figure 4: Linéarité du détecteur FID
○ cinéole, ◇ caféine, □ thymol, △ gramine.

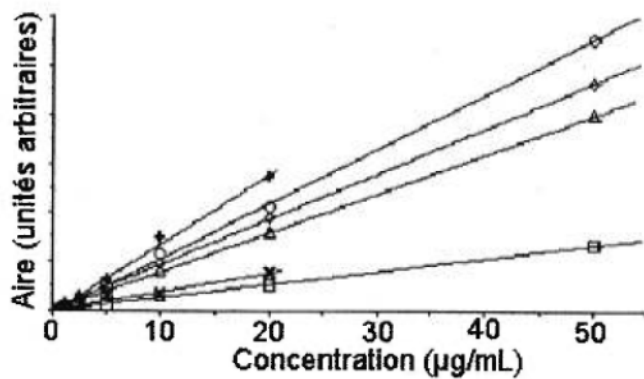


Figure 5: Linéarité du détecteur UV-Visible

+ rutin, O caféine, ◇ acide p-coumarique, Δ umbelliférone,
× tryptophane, □ alcool salicylique

Des exemples de chromatogrammes sont donnés pour la chromatographie en phase gazeuse (figures 6 et 7) et pour la chromatographie liquide (figures 8 et 9).

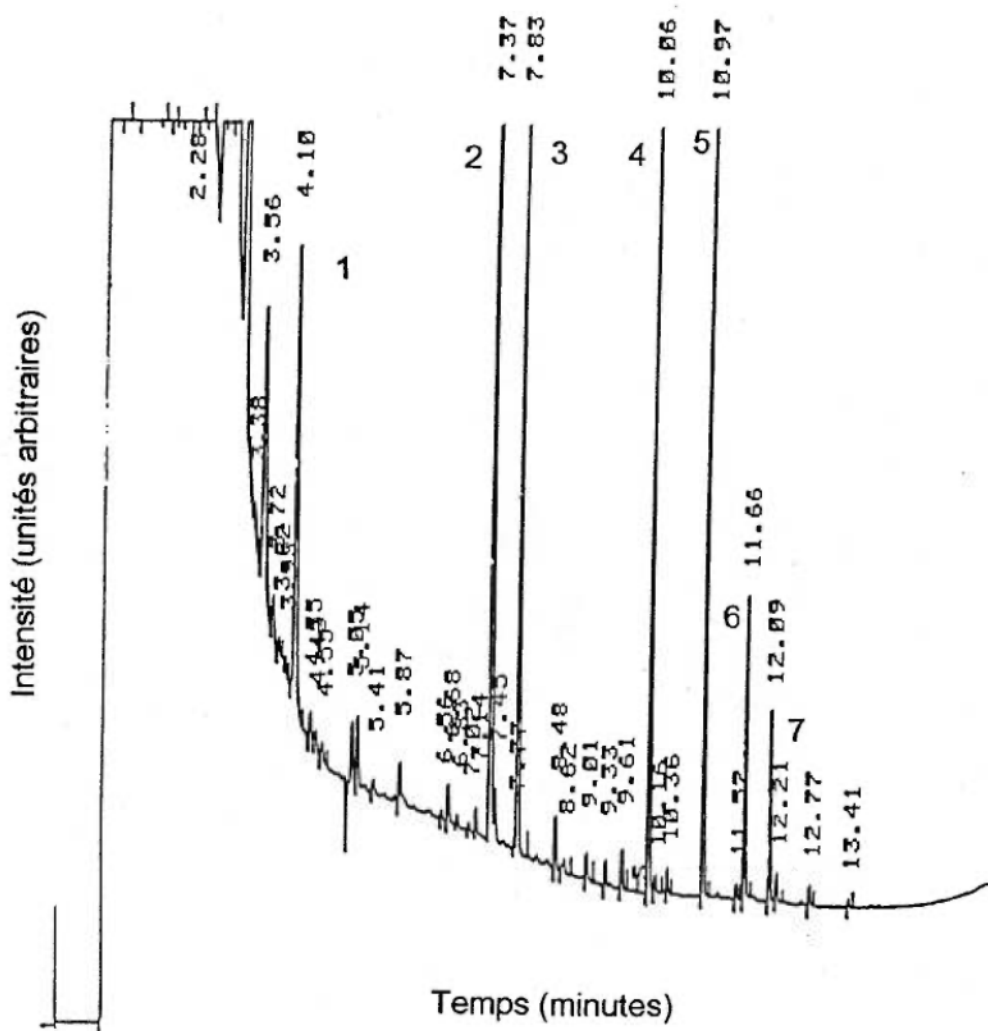


Figure 6 : Chromatogramme obtenu par GC-FID à la suite d'une injection d'un mélange de composés tirés du tableau 1 avec les conditions d'utilisation décrites dans le tableau 2.

1.cinéole, 2.thymol, 3.géranol, 4.diphénylamine, 5.gramine, 6.caféine, 7.théophylline

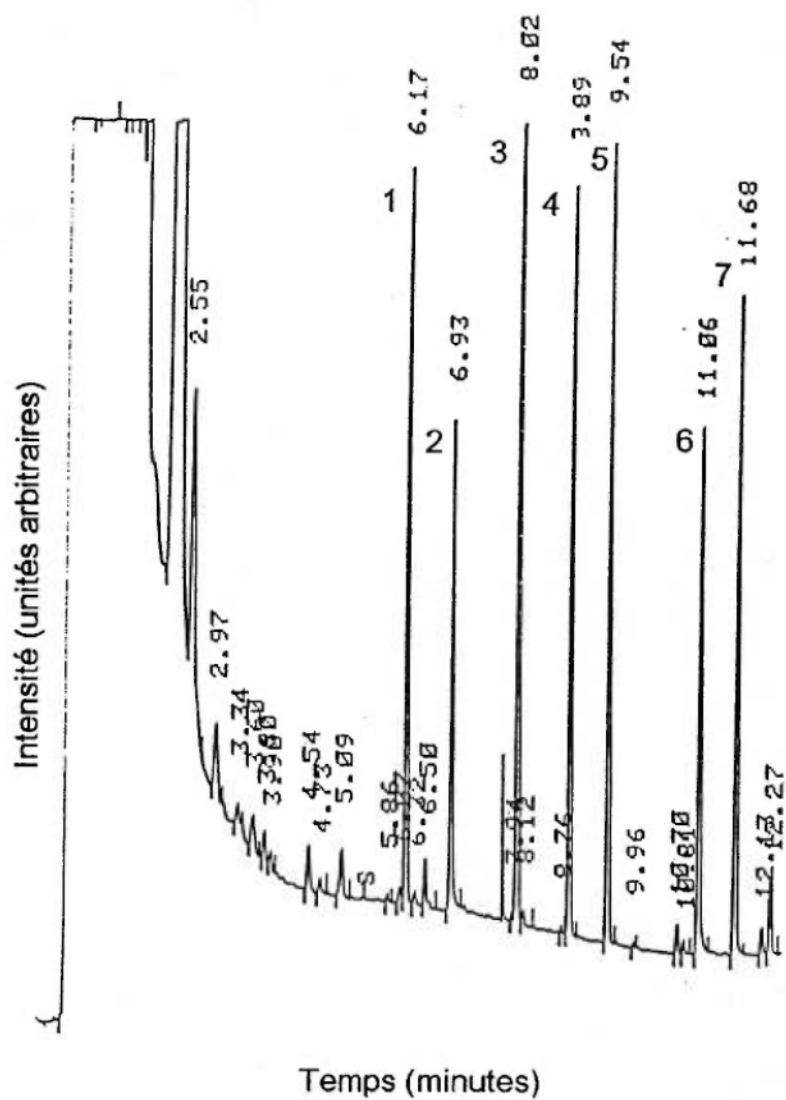


Figure 7 : Chromatogramme obtenu par GC-FID à la suite d'une injection d'un mélange de composés tirés du tableau 1 avec les conditions d'utilisation décrites dans le tableau 2.

1.acide benzoïque, 2.acide picolinique, 3.alcool salicylique,
 4.acide t-cinnamique, 5.acide p-hydroxybenzoïque,
 6.umbelliférone, 7.acide p-coumarique

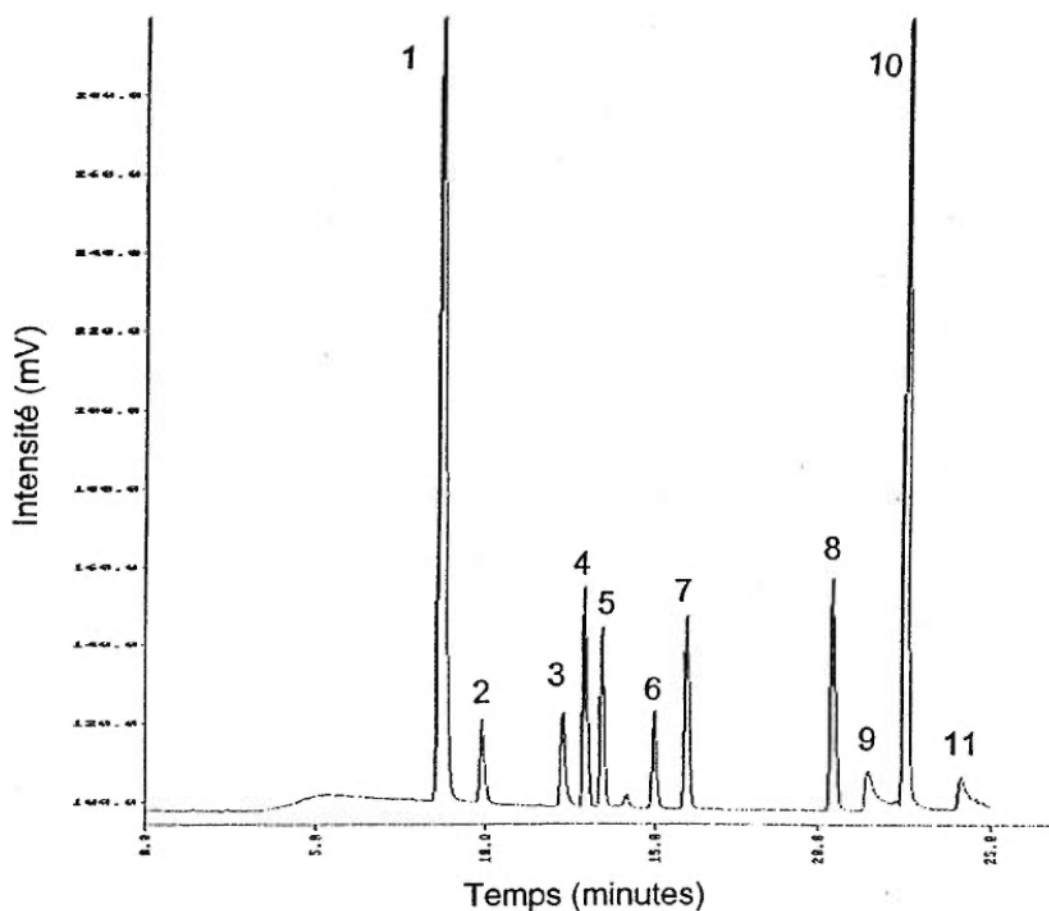


Figure 8 : Chromatogramme obtenu par HPLC-UV à la suite d'une injection d'un mélange de composés à potentiel allélopathique avec les conditions d'utilisation décrites dans le tableau 3.

1. acide p-hydroxybenzoïque, 2. tryptophane, 3. alcool salicylique, 4. théophylline, 5. esculine, 6. amygdaline, 7. acide p-coumarique, 8. umbelliférone, 9. rutine, 10. acide t-cinnamique, 11. L-proline

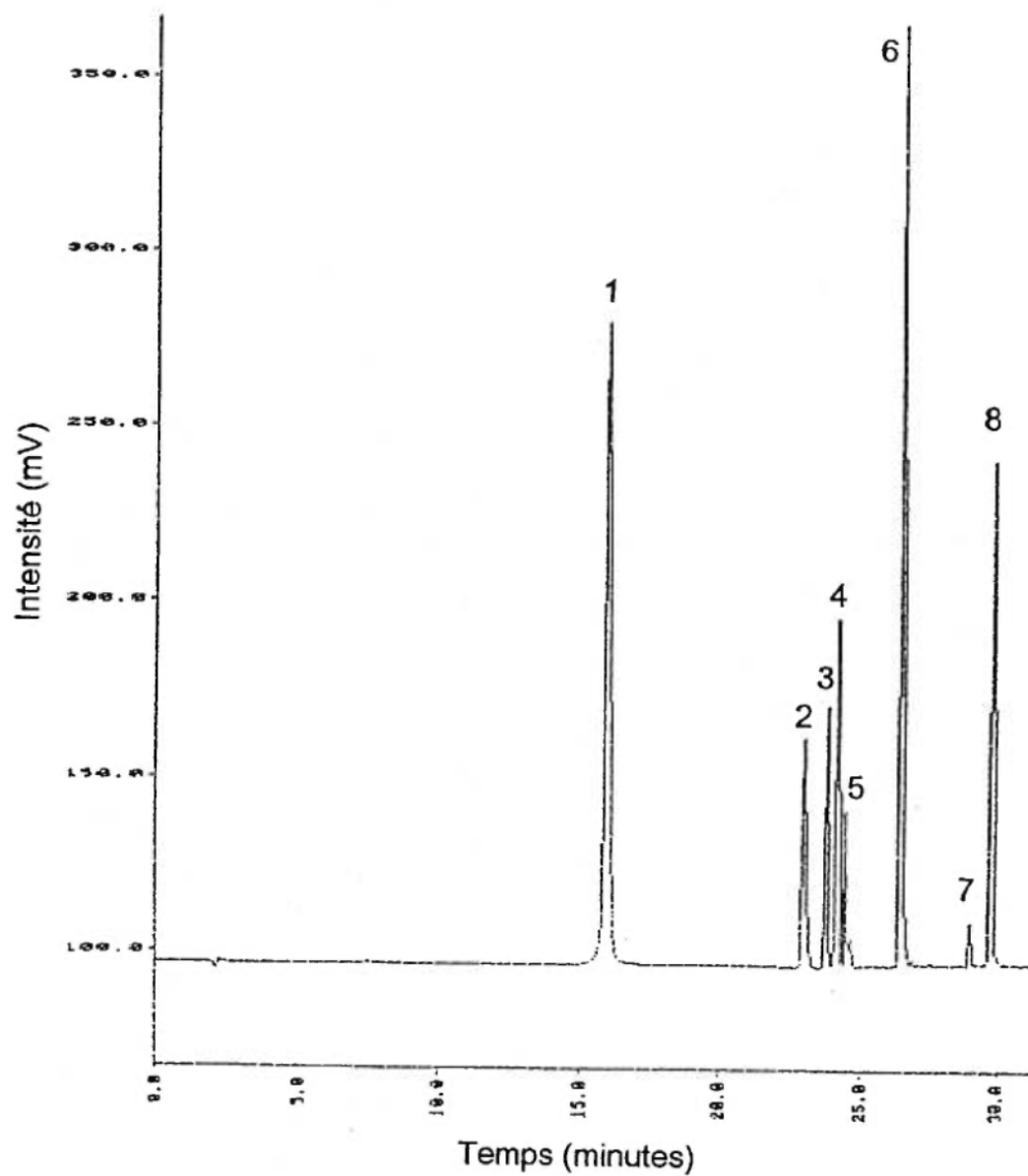


Figure 9 : Chromatogramme obtenu par HPLC-UV à la suite d'une injection d'un mélange de composés tiré du tableau 1 avec les conditions d'utilisation décrites dans le tableau 4

1. acide p-hydroxybenzoïque, 2.caféine, 3.umbelliférone, 4.acide p-coumarique, 5.acide benzoïque, 6.acide t-cinnamique, 7.thymol, 8.diphénylamine

CHAPITRE 5

RÉCUPÉRATION DE COMPOSÉS À POTENTIEL ALLÉLOPATHIQUE À PARTIR D'ÉCHANTILLONS AQUEUX

5.1 Introduction

La récupération ou la préconcentration des composés à potentiel allélopathique est située après les procédures d'échantillonnage dans la stratégie analytique globale (cf. section 2.8). Les échantillons recueillis à la suite des procédures d'échantillonnage sont dans une matrice organique (solvants) ou dans l'eau. Dans le cas des matrices organiques, la récupération des composés à potentiel allélopathique peut se faire par une simple évaporation du solvant. Dans le cas des matrices aqueuses, l'évaporation de l'eau est difficile et effectuée à haute température. Le chauffage de l'échantillon pour l'évaporation de la phase aqueuse peut amener la dégradation de certains composés. Pour ces raisons, on doit faire appel à une méthode de récupération des composés à potentiel allélopathique.

La méthode de récupération des composés nécessite une procédure d'extraction des substances du milieu aqueux qui permet d'effectuer une préconcentration des composés. Cette étape de préconcentration s'impose du fait que la quantité émise de substances à potentiel allélopathique est faible. Les quantités maximales de substances dans les sols, provenant de l'ensemble des mécanismes de libération, ont été évaluées à quelques microgrammes par gramme de sol³⁸. Il est à noter que les échantillons aqueux ne pourront contenir qu'une fraction de la quantité disponible des composés. Seule la partie solubilisée pourra être récupérée.

Les composés allélopathiques ne sont pas connus et proviennent de différentes familles chimiques. Dans ce contexte, la méthode analytique doit permettre la récupération de composés provenant de différentes familles chimiques.

L'une des approches qui se prêtent bien à la récupération de substances à partir d'un milieu aqueux est l'utilisation d'adsorbants solides. L'extraction solide-liquide est une méthode simple, efficace, peu coûteuse et qui peut être automatisée^{2,23,27,29}.

Plusieurs paramètres ont été étudiés et seront traités dans les prochaines sections afin de déterminer les conditions optimales de récupération des substances à potentiel allélopathique. Le choix de la phase stationnaire contenu dans les cartouches pour l'extraction solide-liquide, le solvant utilisé pour la désorption des composés allélopathiques des cartouches adsorbantes et l'effet du pH ont été étudiés à l'aide de mélanges de substances tirés du tableau 1.

5.2 Mode d'utilisation des cartouches d'extraction

Plusieurs étapes ayant une influence sur le rendement de l'extraction sont reliées à l'utilisation des cartouches d'extraction. Ces étapes sont le conditionnement ou l'activation de la phase stationnaire, le passage de l'échantillon, le rinçage de la cartouche, le séchage et l'élution des composés adsorbés sur la phase stationnaire.

L'activation de la phase stationnaire s'effectue à l'aide d'un solvant organique. Le solvant organique élimine les impuretés présentes dans la cartouche et permet l'activation des groupes fonctionnels. L'activation des groupes fonctionnels permet d'augmenter la surface de contact et le rendement de la

cartouche. À la suite de l'activation de la cartouche, on ajoute de l'eau afin d'éliminer le surplus de solvant organique et préparer la phase stationnaire aux conditions de la phase aqueuse de l'échantillon. Pour ce faire, le volume d'eau est préparé de la même façon que l'échantillon afin d'obtenir un pH, une polarité et une force ionique similaires. Il est à noter que la phase stationnaire ne doit pas sécher entre l'étape de conditionnement et l'étape de lavage. Le cas échéant, le rendement de la cartouche serait affecté.

Ensuite, le pH de l'échantillon, fortifié ou réel, est ajusté. L'échantillon est introduit dans la cartouche à un débit d'environ 2 à 3 mL par minute.

L'étape suivante est le lavage. Le lavage consiste à faire passer sur la cartouche 2 mL de la solution aqueuse ayant servi au conditionnement, afin d'éliminer les impuretés solubles dans l'eau et demeurées retenues à l'intérieur de la cartouche.

À la suite du lavage, la cartouche est séchée en y laissant passer un jet d'azote pendant 30 minutes. Le séchage retire toute trace d'eau de la cartouche. Cette étape est nécessaire afin de faciliter la réduction de l'éluat et de permettre, si désiré, des analyses par chromatographie en phase gazeuse.

La dernière étape est l'élution des composés d'intérêt. L'élution s'effectue avec un solvant ayant une plus grande affinité pour les composés que la phase stationnaire. Le débit du solvant d'élution qui mouille la phase stationnaire est de 1 mL par minute. Ensuite, l'éluat est évaporé à sec sous un jet d'azote et repris avec un solvant compatible avec les méthodes chromatographiques.

5.3 Choix de la phase stationnaire

Les cartouches utilisées pour les extractions solide-liquide sont des enveloppes de polypropylène contenant une phase stationnaire entre deux disques de polyéthylène de 20 µm de porosité. Ces cartouches d'extraction sont disponibles avec différents volumes de phases stationnaires. Elles peuvent contenir entre 50 mg et 1 g de phase stationnaire. La figure 10 illustre une cartouche Sep-Pak™ de Waters.

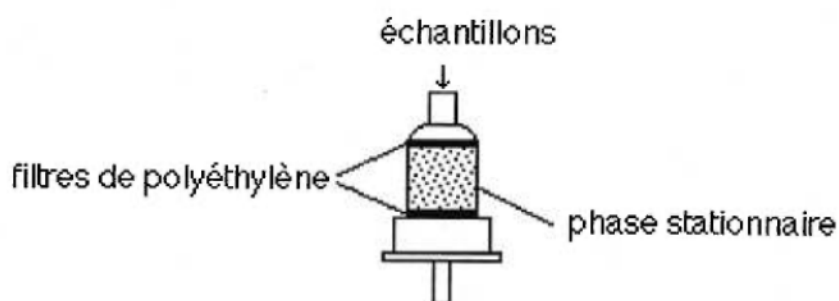


Figure 10: Structure des cartouches Sep-Pak™ de Waters.

L'extraction sur phase solide est un procédé qui implique une phase liquide, solvant dans lequel est dissout le soluté, et une phase solide, phase stationnaire de la cartouche. L'extraction sur phase solide est possible si le soluté a une plus grande affinité pour la phase solide que pour la phase liquide. Le choix de la phase stationnaire contenu dans la cartouche est donc un élément important pour la réussite de l'extraction. Le choix de la phase stationnaire s'effectue en tenant compte des composés à extraire et de la matrice dans laquelle ils sont dissous. Les phases stationnaires disponibles sont regroupées en trois modes d'interaction différents; le mode d'interaction polaire, le mode d'interaction non-polaire et le mode d'interaction ionique.

Dans la présente étude, les substances à potentiel allélopathique se distribuent en plusieurs familles chimiques et les échantillons sont dissous dans l'eau. Afin d'obtenir un taux de recouvrement acceptable pour l'ensemble des composés, les trois modes d'interaction seront étudiés et évalués selon leur capacité à concentrer et recueillir les composés du tableau 1. Le tableau 7 dresse une liste des phases stationnaires étudiées.

Tableau 7: Phases stationnaires disponibles pour la récupération d'échantillons en milieu aqueux

Non-polaire	octadécyl	(C18)
	octyl	(C8)
	phényle	(C ₆ H ₅ C ₂ H ₅)
Polaire	cyanopropyl	(C ₃ H ₆ CN)
Ionique	QMA	(NH ₃ ⁺)

Dans toutes les expériences effectuées au cours de ce chapitre, 15 mL d'une solution aqueuse fortifiée avec 100 µL d'acétonitrile d'une solution de 50 mg/L de composés tirés du tableau 1 ont été utilisés. L'échantillon obtenu est par la suite analysé par chromatographie gazeuse ou liquide selon la nature et la stabilité des composés. Chacune des fractions injectées contient un étalon interne et est comparée à une injection d'un standard de concentration connue.

5.3.1 Phase non-polaire

L'extraction sur phase solide, en mode d'interaction non-polaire, est un système où la phase stationnaire est moins polaire que le solvant contenant les échantillons. Les interactions entre les solutés et la phase stationnaire non-polaire sont basées sur l'hydrophobicité des solutés et sur les forces dispersives reliées entre les liens carbone hydrogène de la phase stationnaire et les liens carbone hydrogène du soluté.^{39,40} Afin de favoriser l'extraction des solutés, le solvant contenant les solutés doit être polaire. Dans la présente étude, l'eau est le solvant contenant les composés à potentiel allélopathique. Ce solvant est très polaire ce qui est adéquat pour ce type de phase stationnaire. Pour éluer les composés de la phase stationnaire, l'éluant idéal est un solvant non-polaire ou modérément polaire afin de compétitionner avec les interactions non-polaire de la phase stationnaire. Les composés susceptibles d'avoir un haut pourcentage de recouvrement sont des composés non-polaires possédant des parties hydrophobes compatibles avec les phases non-polaires. Le recouvrement peut également être amélioré en contrôlant le pH de la solution aqueuse.

5.3.1.1 Effet du pH sur le recouvrement des substances allélopathiques

Le pH de la solution aqueuse contenant les composés à potentiel allélopathique est important afin de favoriser les interactions avec les phases stationnaires non-polaires. La rétention d'un composé en chromatographie est expliquée avec la constante de partage du composé (K).

$$K = C_S / C_M \quad (1)$$

où C_S est la concentration de soluté dans la phase stationnaire et C_M la concentration de soluté dans la phase mobile. Cette équation indique que plus le soluté a de l'affinité pour la phase stationnaire, plus sa constante de partage est élevée. La rétention d'un composé est directement reliée à son temps de résidence dans la phase stationnaire. Donc, plus la constante de partage est élevée meilleure est la rétention. Dans cette optique, il faut favoriser les interactions des composés avec la phase stationnaire pour obtenir une meilleure rétention. Pour ce faire, l'hydrophobicité des composés peut être augmentée en maintenant les composés facilement dissociables en phase aqueuse dans des conditions de pH afin d'éviter leur dissociation dans la phase aqueuse. Les électrolytes forts sont facilement dissociés en phase aqueuse. Les acides forts ($pK_a < 4$) et les bases fortes ($pK_a > 11$) sont des électrolytes forts. Il y a dissociation d'un composé acide pour former un anion lorsque le pH de la solution aqueuse est de deux ou trois unités au-dessus du pK_a du composé. Il y a dissociation d'un composé basique pour former un cation lorsque le pH de la solution aqueuse est de deux ou trois unités sous le pK_a du composé. Le tableau 8 donne les pK_a approximatifs pour les familles de composés du tableau 1^{40,41}.

L'examen du tableau 8 suggère que le pH des acides doit être contrôlé pour favoriser l'hydrophobicité de ces composés facilement dissociables. Normalement, les phases greffées à base de silice sont stables entre un pH de 2.5 et un pH de 7.5. Au-dessus d'un pH de 7.5 la silice est dissoute et sous un pH de 2.5 les greffons attachés au gel de silice sont hydrolysés. Par contre, lors d'extractions sur phase solide, la phase stationnaire greffée est stable pour des variations de pH entre 1 et 14. L'effet du pH des solvants sur les phases stationnaires est négligeable puisque les phases stationnaires sont exposées aux solvants pendant une courte période de temps⁴⁰. Le tableau 9 montre l'effet du pH sur l'adsorption de différentes substances tirées du tableau 1 sur une cartouche contenant 400 mg d'une phase stationnaire non-polaire de type octadécyl (C18).

Tableau 8 : pKa des familles de composés du tableau 1

familles	pKa
acides carboxyliques	3-5
flavonoïdes	≈10
phénols	≈10
terpènes	≈10
lactones	≈10
alcaloïdes	≈ 6
xanthines	≈ 9

Pour ce test, les cartouches ont été conditionnées avec 3 mL de méthanol suivi de 5 mL d'eau ajustée au pH désiré avec une solution d'hydroxyde d'ammonium ou d'acide chlorhydrique. Après le conditionnement, l'échantillon aqueux ajusté au pH de conditionnement est ajouté sur la cartouche. La cartouche est ensuite rincée avec 2 mL d'eau ajustée à la valeur du pH de conditionnement et séchée sous un jet d'azote pendant 30 minutes. Les composés sont élués avec 3 mL d'une solution d'acétate d'éthyle. L'éluat est ensuite réduit sous un jet d'azote et l'échantillon est reconstitué dans 100 µL d'acétonitrile pour analyse par chromatographie en phase gazeuse.

L'examen des résultats révèle que le pH de la phase aqueuse affecte les taux de recouvrement des composés acides. Le pH doit être ajusté en fonction du type de substances à récupérer afin de limiter la dissociation des composés dans la phase aqueuse. Ce contrôle du pH permet d'augmenter l'hydrophobicité des substances organiques et d'accroître significativement l'affinité des composés pour la phase stationnaire. Par contre, afin de

favoriser la récupération de l'ensemble des composés, la phase aqueuse devra être passée sur plus d'une cartouche à des pH différents.

Tableau 9: Influence du pH sur le taux de recouvrement de composés tirés du tableau 1 avec des cartouches adsorbantes contenant 400 mg de phase stationnaire non-polaire C18

substances	pH 2 (%)	pH 4 (%)	pH 7 (%)	pH10 (%)
acide picolinique	43	29	<5	<5
alcool salicylique	33	20	14	<5
acide t-cinnamique	92	92	<5	<5
acide p-hydroxybenzoïque	59	27	<5	<5
umbelliférone	97	92	6	<5
acide p-coumarique	84	80	<5	<5
cinéole	87	-	-	87
thymol	82	-	-	99
géraniol	99	-	-	99
gramine	33	-	-	71
caféine	98	-	-	90
théophylline	96	-	-	47

5.3.1.2 Évaluation des phases non-polaires

L'évaluation de l'efficacité des phases non-polaires pour retenir les composés d'intérêt est effectuée avec une phase aqueuse en milieu alcalin (pH 10) et en milieu acide (pH 2). Les composés offrant un bon taux de recouvrement en

milieu alcalin sont associés à la fraction des composés à caractère neutre et basique. D'un autre côté, les composés ayant un meilleur recouvrement en milieu acide sont associés à la fraction à caractère acide. Cette appellation donnée aux fractions est qualitative et suivra les composés au cours de l'étude.

Les phases stationnaires octadécyl (C18) et octyl (C8) ont été étudiées pour les deux fractions de composés. Par contre, pour la fraction des composés à caractère acide, la phase stationnaire phényle a été étudié afin d'essayer d'améliorer le recouvrement des acides carboxyliques sur les phases stationnaires non-polaires. Les résultats sont présentés dans les tableaux 10 et 11. Ces tableaux présentent les pourcentages de recouvrement des substances allélopathiques en fonction des différentes phases stationnaires non-polaires étudiées. Pour ce test, les échantillons sont traités tel que décrit à la page 51.

Tableau 10: Pourcentages de recouvrement de substances à caractère basique et neutre sur cartouches d'extraction non-polaires obtenu à pH 10

substances	C18	C8
cinéole	87	85
thymol	99	94
géraniol	99	95
gramine	71	69
caféine	99	97
théophylline	77	74

Tableau 11: Pourcentages de recouvrement de substances à caractère acide sur cartouches non-polaires obtenu à pH 2

substances	C18	C8	Phényle
acide picolinique	23	7	10
alcool salicylique	33	24	9
acide t-cinnamique	92	78	92
acide p-hydroxybenzoïque	53	34	23
umbelliférone	95	84	93
acide p-coumarique	84	72	81

L'examen des résultats montre que la phase C18 est la phase stationnaire non-polaire la plus efficace pour la récupération des composés étudiés. Dans le cas des substances à caractère acide, certains rendements d'extraction sont faibles puisque ces composés sont fortement dissociés en phase aqueuse et présentent moins d'affinité pour ce type de phase stationnaire. Par contre, en changeant le rapport de phase entre la phase stationnaire et la phase mobile, il est possible d'augmenter le recouvrement des composés. Une augmentation du volume de phase stationnaire a pour effet d'augmenter le facteur de capacité des composés. Le facteur de capacité est régi par l'équation suivante :

$$k' = K (V_s/V_m) \quad (2)$$

Où K représente la constante de partage, V_s le volume de phase stationnaire et V_m le volume de phase mobile. Le facteur de capacité peut aussi être défini selon les temps de rétention à l'aide de l'équation suivante :

$$k' = (t_r - t_m) / t_m \quad (3)$$

Où t_r représente le temps de rétention du composé et t_m le temps mort du système.

Selon l'équation 3, plus un produit a un facteur de capacité élevé, plus grande est sa rétention. Selon l'équation 1, plus la quantité de phase stationnaire est grande plus le facteur de capacité est élevé. Donc selon ces équations, une augmentation du volume de phase stationnaire fait augmenter la rétention des composés. Par contre, l'équilibre du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile n'est pas modifié (K). La méthode de récupération est donc dépendante de tout changement de volume des échantillons. Par exemple, si le volume de l'échantillon est plus important, le facteur de capacité sera réduit et du même coup la rétention des composés. Il est donc préférable de résoudre le problème à l'aide d'autres types de phases stationnaires qui auront un effet bénéfique sur la constante de partage.

5.3.2 Phase polaire

La chromatographie d'adsorption à l'aide de cartouches à phase stationnaire polaire est un système où la phase stationnaire est plus polaire que la phase mobile. Les interactions rencontrées dans la chromatographie en phase polaire sont de types liaison hydrogène, dipôle-dipôle, dipôle-dipôle induit et autres types d'interactions électrostatiques faisant appel à la présence de sites de charge sur une molécule. Les composés susceptibles d'interagir avec ce type de phase sont des substances polaires. L'extraction des composés est favorisée lorsque le solvant contenant les composés est peu polaire. Un solvant peu polaire permet aux composés d'avoir une plus grande affinité avec la phase stationnaire qu'avec la phase mobile. Dans la présente étude, la

phase mobile est l'eau qui est un solvant très polaire. Ce type de phase stationnaire ne semble donc pas approprié pour notre étude.

Malgré ces appréhensions, des tests ont été effectués sur des cartouches de type cyanopropyl et diol. Les taux de recouvrement obtenus à l'aide de ces cartouches adsorbantes sont inférieurs à 10 %. Ce type de phase stationnaire n'est donc pas adéquat pour notre étude. L'eau possède une force éluotrope trop élevée pour permettre une rétention efficace des composés.

5.3.3 Phase échangeuse d'ions

La chromatographie d'adsorption sur phase solide en mode d'échange d'ions est basée sur les interactions ioniques entre le composé et la phase stationnaire. Ce mode d'adsorption est présent lorsque le composé est chargé (d'une charge positive ou négative) et que la phase stationnaire est chargée d'une charge inverse à celle du composé. Le nombre de molécules chargées positivement augmente lorsque le pH est sous les valeurs de pKa des composés basiques. Inversement, le nombre de molécules chargées négativement augmente lorsque le pH est au-dessus de la valeur du pKa des composés acides. Ce type d'extraction est intéressant pour les acides ou les bases fortes puisqu'ils sont facilement dissociés en phase aqueuse. En utilisant un pH supérieur au pKa de deux unités pour les acides et inférieur de deux unités pour les bases on obtient une forme ionique majoritaire et stable.

Par exemple, les acides carboxyliques ont des pKa entre 3 et 5. En utilisant une phase aqueuse ajustée à un pH supérieur au pKa des acides carboxyliques, il est théoriquement possible de les adsorber quantitativement. Des essais ont été effectués pour la fraction à caractère acide. La cartouche utilisée contient une phase stationnaire de type amine quaternaire. Dans ces expériences, les adsorbants ont été conditionnés avec 3 mL de méthanol suivi

de 5 mL d'eau ajustée à pH 9 avec une solution d'hydroxyde d'ammonium. Après le conditionnement, l'échantillon aqueux ajusté à pH 9 est ajouté sur la cartouche. La cartouche est ensuite rincée avec 2 mL d'eau à pH 9 et séchée sous un jet d'azote. Les acides sont élués avec 3 mL d'une solution méthanolique contenant 10% de HCl. Ce solvant élimine la forme ionique des composés et d'offre un contre-ion pour occuper les sites actifs de la cartouche adsorbante. L'éluat est ensuite réduit sous un jet d'azote et l'échantillon est reconstitué dans 100 μ L d'acétonitrile pour analyse par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats du pourcentage de recouvrement de la fraction acide sur la cartouche avec phase stationnaire échangeuse d'ions sont présentés au tableau 12.

Tableau 12 : Pourcentages de recouvrement de substances à caractère acide sur une cartouche échangeuse d'ions avec une phase aqueuse à pH 9

substances	recouvrements (%)
acide picolinique	99
alcool salicylique	16
acide t-cinnamique	51
acide p-hydroxybenzoïque	98
umbelliférone	50
acide p-coumarique	64

Les résultats du tableau 12 montrent que ces cartouches échangeuses d'ions augmentent substantiellement le recouvrement de certains acides dont l'acide picolinique et l'acide p-hydroxybenzoïque. Par contre, les autres composés

ont un recouvrement plus faible que lors de l'utilisation d'une phase stationnaire non polaire C18. L'ensemble des résultats démontre la nécessité d'utiliser les deux modes d'extraction en tandem pour obtenir un système efficace de récupération des substances allélopathiques.

5.4 Procédure de désorption chimique des échantillons

L'extraction des substances allélopathiques sur phases solides a été étudiée. Lors de ces essais, nous avons déterminé les conditions optimales de rétention des substances allélopathiques sur différentes phases stationnaires. Implicitement, les résultats de ces études nécessitent l'optimisation des conditions d'élution des substances allélopathiques à partir des cartouches utilisées. L'élution des composés est favorisée lorsque les composés ont une plus grande affinité pour la phase mobile que la phase stationnaire. Selon l'équation (1), décrite précédemment, l'élution est favorisée lorsque la constante de partage devient très petite pour un système donné. De façon à optimiser la récupération des substances allélopathiques retenues sur les différentes phases solides, nous avons effectué l'élution des composés avec des solvants différents.

5.4.1 Phases non polaires C18

L'élution des composés retenus sur une phase stationnaire non-polaire est favorisée par l'utilisation d'un solvant d'une polarité modérée à non-polaire. De plus, la solubilité de l'ensemble des composés dans ce solvant doit être considérée. Dans ce contexte, l'efficacité de trois solvants pour éluer les substances d'intérêt à partir des cartouches C18 a été étudiée. Lors de ces essais trois solvants sont utilisés : le dichlorométhane, un solvant peu polaire et deux solvants modérément polaires, l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle.

L'efficacité est évaluée en comparant le volume requis de chacun de ces solvants pour éluer les composés d'une cartouche contenant 400 mg de phase stationnaire. Pour chaque solvant d'élution le volume est varié entre 0.5 mL et 4 mL. Selon l'équation (2) décrite précédemment, si la quantité de phase stationnaire change le volume de solvant d'élution devra être modifié.

Pour chaque volume d'élution, l'aire des composés élués est mesurée. Le volume d'élution optimal pour un solvant donné est le volume d'élution à partir duquel aucune augmentation de la quantité de composés élués est observée. Le volume d'élution optimal est évalué pour la majorité des familles chimiques impliquées. Les résultats obtenus pour la fraction contenant les substances à caractère acide sont présentés à la figure 11. Les résultats obtenus pour la fraction contenant les substances à caractère neutre et basique sont donnés à la figure 12. Sur ces figures, on présente l'aire des composés élués en fonction du volume d'élution pour chacun des solvants testés. Le dernier volume d'élution, où la quantité de composés est représentée, est le volume d'élution optimal. L'examen des résultats révèle que pour les substances de la fraction acide, l'acétate d'éthyle (C) est le meilleur solvant d'élution. Le volume d'élution optimal pour l'acétate d'éthyle est d'environ 1.0 mL. Pour l'acétonitrile (B) et le dichlorométhane (A), le volume d'élution optimal est ≥ 2 mL. De façon similaire, on peut constater que l'acétate d'éthyle (C) est également le solvant de choix pour éluer les composés à caractère neutre et basique retenus sur la phase stationnaire C18. Le volume d'élution optimal pour l'acétate d'éthyle est d'environ 1.5 mL comparativement à des volumes ≥ 2 mL pour les autres solvants. Le volume d'élution optimal mesuré pour les substances à caractère neutre et basique est supérieur au volume d'élution optimal mesuré pour les composés à caractère acide. Les substances à caractère neutre et basique sont donc plus fortement retenues sur l'octadécyl que les composés acides. Cet énoncé est en accord avec les données présentées aux tableaux 10 et 11 qui représentent le recouvrement des substances sur ce type de phase stationnaire.

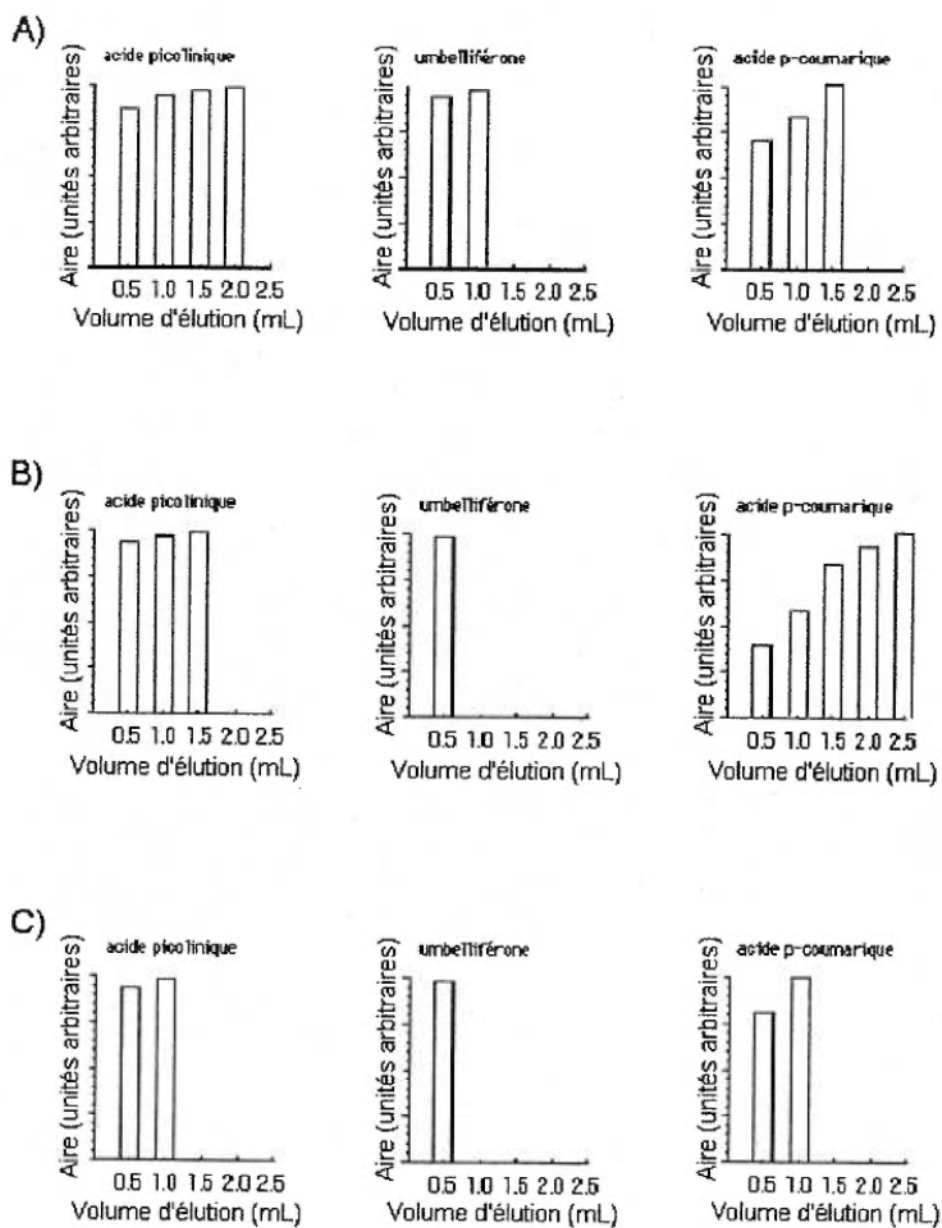


Figure 11: Désorption de la fraction à caractère acide par différents solvants organiques:

A) Dichlorométhane, B) Acétonitrile, C) Acétate d'éthyle

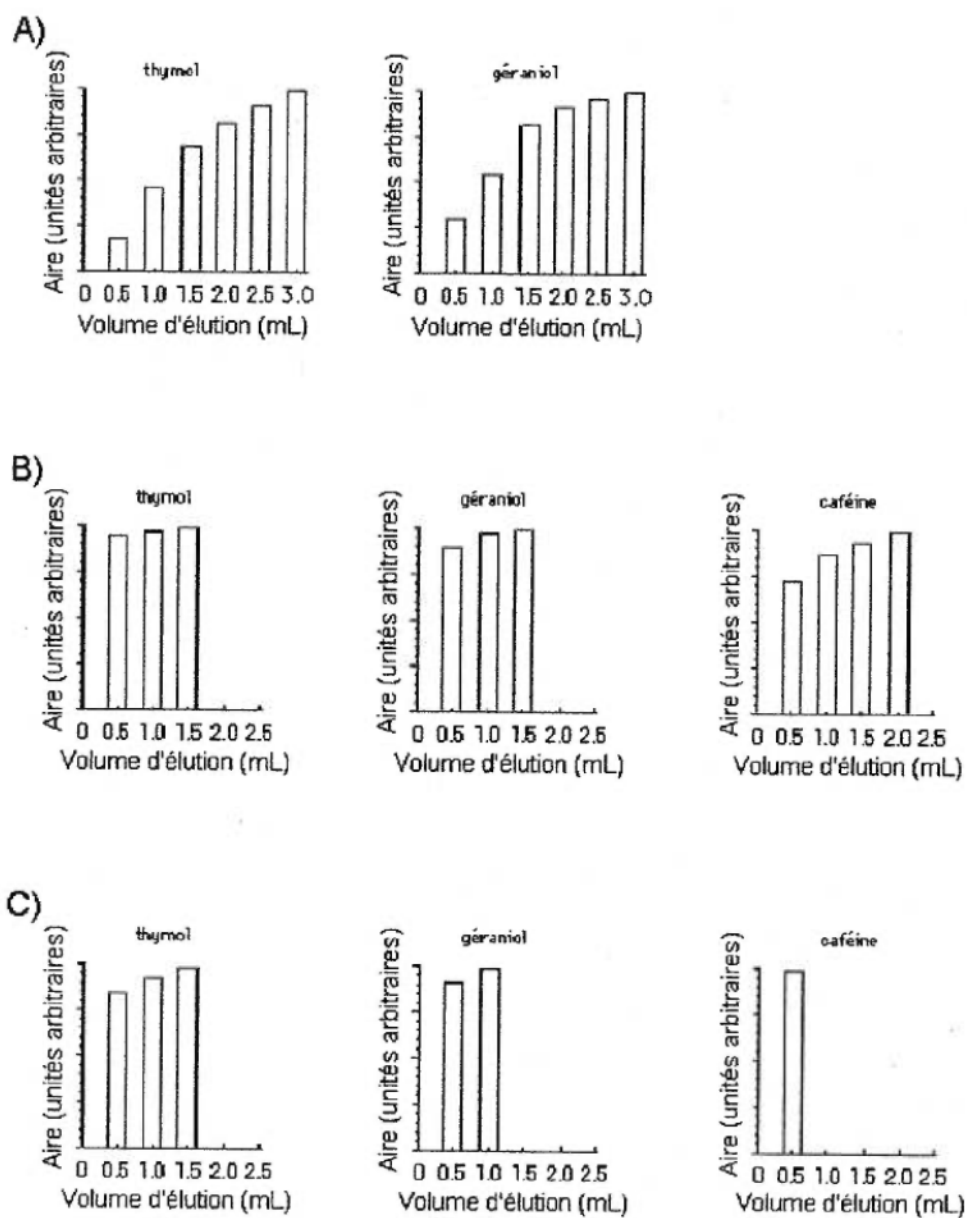


Figure 12: Désorption de la fraction à caractère neutre et basique par différents solvants organiques

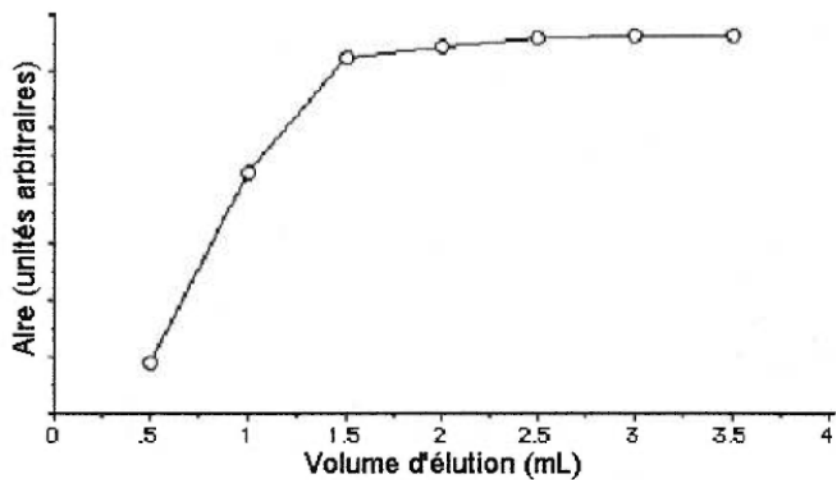
A) Dichlorométhane, B) Acétonitrile, C) Acétate d'éthyle

5.4.2 Phases échangeuses d'ions

L'élution des composés retenus sur une phase stationnaire échangeuse d'ions est favorisée lorsque la charge des composés ou de la phase stationnaire est neutralisée. De plus, une haute concentration ionique de la phase mobile combinée à la présence de contre-ions favorisent l'élution des composés adsorbés sur la phase stationnaire. Dans la présente étude, la charge des composés est neutralisée. La récupération des acides à partir des cartouches est effectuée en utilisant du méthanol incorporant 10 % d'acide chlorhydrique. Ce solvant permet aux composés de perdre leur forme ionique en protonant les acides. Selon la définition des acides de Bronsted et Lowry, le méthanol peut agir à titre de solvant amphotère tout comme l'eau. De plus, la constante diélectrique du méthanol et l'activité protonique de ce mélange permettent son utilisation à ce type d'expérience⁴².

La détermination du volume d'élution optimal, pour les cartouches échangeuses d'ions (QMA) contenant 360 mg de phase stationnaire, est effectuée en mesurant l'aire des composés élués pour des volumes variant entre 0.5 mL et 3.5 mL de solvant. La figure 13 illustre l'aire d'un pic d'un composé mesurée en fonction du volume d'élution. Avec ces résultats, on peut voir qu'après 3 mL de solution (méthanol :acide chlorhydrique, 90 :10, V :V), l'augmentation de l'aire du composé élué est négligeable. Le volume d'élution optimal est fixé à 3 mL de solution méthanolique.

a)



b)

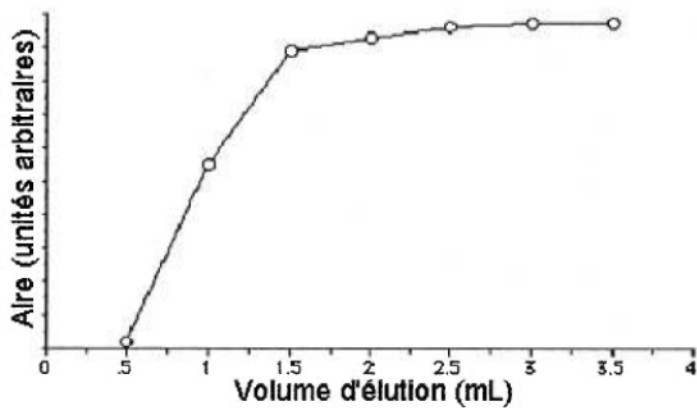


Figure 13: Étude du volume de méthanol/HCl (90 :10, V :V) requis pour éluer les acides des cartouches adsorbantes échangeuses d'anions
a) acide p-coumarique, b) acide t-cinnamique

5.5 Optimisation de la méthode de récupération

Les résultats obtenus lors de l'étude des facteurs affectant la récupération des substances à potentiel allélopathique sur les phases stationnaires permettent d'établir une méthode de récupération et de préconcentration à l'aide de cartouches d'extraction. Cette méthode utilise la combinaison des phases stationnaires non-polaires et échangeuses d'ions.

Dans cette approche, la phase aqueuse obtenue à partir de l'échantillonnage est ajustée à un pH de 10 avec une solution de NaOH. La phase aqueuse est passée sur une cartouche de type octadécyl C18 où les substances à caractère neutre et basique sont retenues avec des rendements tels que ceux donnés au tableau 10. De plus, ces conditions alcalines sont propices à l'adsorption des acides sur phase stationnaire échangeuse d'anions (tableau 12). Il est possible de jumeler une cartouche échangeuse d'anions (QMA) en série avec la cartouche C18. Ainsi, cette cartouche (QMA) adsorbe les acides fortement dissociés en phase aqueuse. Suite à cette opération, l'éluat est ajusté à un pH de 2 avec une solution de HCl et est passé sur une colonne C18 où les substances à caractère acide, non dissociées en phase aqueuse, seront retenues (tableau 11). Suite à ces extractions, les cartouches sont éluées selon leur méthode respective (cf. section 5.4). Les éluats sont combinés afin d'éviter le chevauchement d'une même substance dans des fractions différentes. Les éluats sont réduits sous un jet d'azote et l'échantillon est repris dans un volume de 100 μ L d'acétonitrile pour analyse chromatographique ou dans 10 mL d'eau pour le fractionnement chimique des composés.

Le tableau 13 résume le taux de récupération globale pour les différentes substances à potentiel allélopathique du tableau 1 soumis à cette procédure. L'examen des résultats indique que les composés des familles chimiques

retenues pourront être récupérés quantitativement avec la procédure de récupération des substances à potentiel allélopathique.

Tableau 13: Pourcentages de recouvrement de la méthode de récupération des substances à potentiel allélopathique.

substances	recouvrements (%)
cinéole	87 (2)
thymol	99 (2)
géraniol	99 (2)
gramine	71 (4)
caféine	99 (1)
théophylline	77 (5)
acide picolinique	99 (2)
alcool salicylique	36 (6)
acide t-cinnamique	98 (3)
acide p-hydroxybenzoïque	98 (4)
umbelliférone	97 (5)
acide p-coumarique	88 (5)
rutine	61 (8)
esculine	59 (6)

() = coefficients de variation sur 3 essais

5.6 Conclusion

Les travaux effectués ont permis de déterminer les conditions optimales de récupération des substances du tableau 1 à partir d'un échantillon aqueux. Il a été démontré que l'extraction sur phase solide de certains composés est dépendante du pH de la solution aqueuse. Le pH de la phase aqueuse doit être maintenu sous le pKa des acides afin de limiter leur dissociation dans la phase aqueuse et de favoriser les interactions avec les phases stationnaires non-polaires. De plus, le rendement de l'extraction dépend d'un choix judicieux de la phase stationnaire, des cartouches d'extraction et de la sélection du solvant d'élution.

L'examen des résultats indique qu'il est possible de récupérer la plupart des substances à potentiel allélopathique à l'aide d'extractions successives sur phase solide. La méthode de récupération obtenue permet d'obtenir des taux de recouvrement généralement supérieur à 60 % pour la plupart des familles chimiques du tableau 1. De plus, la méthode de récupération ne limite pas le recouvrement de certaines substances comme c'est le cas dans d'autres études².

La procédure développée permet non seulement la récupération des substances allélopathiques, mais permet également une préconcentration importante des substances récupérées. Les résultats indiquent qu'il est possible de concentrer les éluats de 15 mL par un facteur de 150, ce qui représente, si l'adsorption est effectuée en plusieurs étapes, un facteur de concentration de l'ordre de 3000 pour des volumes d'eau collectés de 300 mL. Il semble donc que l'approche choisie est bien adaptée aux étapes ultérieures de fractionnement chimique, de profilage chromatographique et d'identification des substances à potentiel allélopathique.

CHAPITRE 6

FRACTIONNEMENT CHIMIQUE

6.1 Introduction

Le fractionnement chimique des composés à potentiel allélopathique est situé avec la procédure de récupération des substances allélopathiques dans la stratégie analytique globale (cf. section 2.8). Cette étape est un complément de la procédure de récupération des substances allélopathiques. Suite aux procédures d'échantillonnage des substances à potentiel allélopathique, les échantillons recueillis dans une matrice organique (extraction directe des plantes et des sols) sont récupérés par évaporation du solvant. Par contre, les échantillons aqueux sont soumis à la procédure de récupération discutée à l'intérieur du chapitre 5. Après l'étape de récupération, les échantillons sont analysés chromatographiquement ou dirigés vers la procédure de fractionnement chimique des composés à potentiel allélopathique. Dans le cas où l'échantillon contient peu de composés à potentiel allélopathique, l'analyse chromatographique est possible sans avoir recours au fractionnement chimique des échantillons. Par contre, l'échantillon concentré peut contenir une foule de substances parmi lesquelles se retrouvent la ou les substances allélopathiques d'intérêt que l'on désire identifier. Dans ce cas, le fractionnement chimique de l'échantillon est nécessaire.

L'étape de fractionnement chimique des échantillons permet de simplifier les profils chromatographiques en limitant le nombre de substances présentes. Le fractionnement chimique permet aussi d'obtenir de l'information préliminaire sur le type de substances chimiques que l'on désire identifier, car le fractionnement rassemble certaines classes chimiques dans des fractions

déterminées. De plus, en identifiant les fractions contenant des composés actifs à l'aide de tests d'activités biologiques, le travail d'identification des substances allélopathiques est réduit aux fractions actives seulement.

Il existe plusieurs approches de fractionnement chimique qui peuvent être utilisées. Parmi celles-ci, l'extraction liquide-liquide³¹, l'extraction sur phase solide (solide-liquide)^{2,23,27,29} et la chromatographie préparative. Dans le contexte du présent projet, nous avons choisi d'étudier l'extraction liquide-liquide et l'extraction solide-liquide. À l'aide de ces techniques, le fractionnement chimique est possible en variant le pH d'une solution aqueuse contenant les composés à potentiel allélopathique. Les deux techniques de fractionnement chimique seront développées et comparées. Les résultats obtenus pour la récupération des substances allélopathiques (chapitre 5) seront utilisés afin de développer le fractionnement chimique à l'aide de l'extraction sur phase solide. Dans le cas de l'extraction liquide-liquide, le choix des solvants et le pH de la solution aqueuse seront étudiés de façon à développer une méthodologie adéquate de fractionnement chimique des composés à potentiel allélopathique.

Dans toutes les expériences de ce chapitre, 15 mL d'une solution aqueuse enrichie avec 100 μ L d'acétonitrile contenant 50 mg/L de composés tirés du tableau 1 ont été utilisés pour étudier les différents paramètres influençant les taux de recouvrement des méthodes de fractionnement chimique. Les fractions résultantes du fractionnement chimique sont réduites sous un jet d'azote et reprises dans 100 μ L d'acétonitrile pour analyse par chromatographie en phase gazeuse ou par chromatographie en phase liquide selon la nature et la stabilité des composés à analyser. Chaque fraction injectée contient un étalon interne ou externe et est comparée à une injection d'un standard de concentration connue.

6.2 Fractionnement chimique par extraction liquide-liquide.

L'extraction liquide-liquide est basée sur la distribution d'un soluté entre deux phases liquides non-miscibles. Les phases liquides impliquées sont généralement une phase aqueuse et une phase organique. La plupart des extractions ont pour but de faire passer des composés de la phase aqueuse à la phase organique. L'équilibre entre les deux phases liquides est relié à l'équation de la constante de distribution⁴². Prenons par exemple un composé HX :

$$K_D = [HX]_o / [HX]_a \quad (4)$$

Où K_D représente la constante de distribution, $[HX]_o$ la concentration de soluté en phase organique et $[HX]_a$ la concentration de soluté en phase aqueuse. Dans cette équation, seule la solubilité du soluté pour les phases liquides est en jeu. Par contre, tel que discuté à la section 5.3.1.1, certaines substances sont partiellement ionisées en phase aqueuse. Dans ce cas, il est approprié d'introduire l'équation du ratio de distribution⁴². Par exemple, un soluté acide HX donnera :

$$D = [HX]_o / ([HX]_a + [X^-]) \quad (5)$$

Où D est le ratio de distribution, $[HX]_o$ la concentration de soluté en phase organique, $[HX]_a$ la concentration de soluté en phase aqueuse et $[X^-]$ la concentration de soluté dissocié en phase aqueuse. Une extraction efficace est obtenue lorsque le ratio de distribution est égal à la constante de distribution. Pour ce faire, le pH de la solution aqueuse doit être ajusté afin de limiter la dissociation des composés dans la phase aqueuse. Selon ces équations, il est possible en variant le pH des solutions aqueuses de fractionner les substances en fonction de leurs propriétés acides-bases.

6.2.1 Choix des solvants d'extraction

L'extraction liquide-liquide est possible si les composés ont plus d'affinité pour les solvants d'extraction que pour la phase aqueuse (équation 4). Les solvants utilisés doivent offrir des rendements d'extraction élevés pour les substances d'intérêt sans limiter la venue de nouvelles substances. Dans ce contexte, les solvants qui possèdent un haut point d'ébullition ($> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) sont éliminés afin de ne pas nuire à la présence de produits volatils. Les produits volatils peuvent être perdus lors de la concentration par évaporation du solvant. De plus, le solvant d'extraction doit être de polarité intermédiaire afin de permettre l'extraction d'un grand nombre de composés. Il doit aussi être miscible avec la majorité des solvants organiques afin de permettre des combinaisons de solvants. Selon ces critères, le choix du solvant de départ s'est arrêté sur le dichlorométhane. Le dichlorométhane est un solvant très volatil et cité dans la littérature pour des extractions liquide-liquide et des extractions directes de substances émises par des plantes dans les sols^{2,43}. Le dichlorométhane peut être utilisé seul ou jumelé à d'autres solvants afin d'obtenir un solvant de polarité intermédiaire entre les deux solvants purs. Un mélange de solvant permet dans certains cas d'augmenter la solubilité de certaines substances dans la phase organique afin d'améliorer l'extraction.

6.2.1.1 Optimisation des conditions d'extraction

L'établissement des conditions d'extraction s'effectue en deux étapes. La première étape consiste à déterminer les conditions de pH auxquelles les produits sont le moins dissociés en phase aqueuse. Cette étape est primordiale pour l'évaluation des solvants d'extraction. En diminuant la dissociation des composés, l'équation 5 peut être réduite à l'équation 4. Dans ce cas, la distribution des composés entre les deux phases dépend de la solubilité des composés dans les phases impliquées. La détermination du pH

de la phase aqueuse est effectuée avec des extractions de composés tirés du tableau 1. Les extractions sont effectuées sous deux conditions de pH. Premièrement, 15 mL de phase aqueuse ajustée à pH 12 avec une solution de NaOH sont extraits avec 3 portions successives de 15 mL de dichlorométhane. La fraction obtenue de cette extraction (F 1) peut contenir des substances ionisées en milieu acide, des composés à caractère basique et des composés neutres. À la suite de cette extraction, la phase aqueuse est ajustée à un pH de 2 avec une solution de HCl et extraite avec 3 portions successives de 15 mL de dichlorométhane. La fraction obtenue de cette extraction (F 2) contient les composés à caractère acide qui selon l'équation 5 sont ionisés et demeurés en phase aqueuse à pH alcalin. Les deux fractions sont évaporées et reprises dans un volume de 100 μ L d'acétonitrile pour analyse par chromatographie en phase gazeuse. La distribution des composés dans les fractions selon leur pH d'extraction et le taux de recouvrement des composés sont présentés dans le tableau 14.

La fraction (F 1), obtenue à pH 12, contient des composés dont le pKa est inférieur à 10 (tableau 8). Les composés à caractère basique sont ionisés lorsque le pH de la phase aqueuse est de deux unités sous le pKa des composés. Pour cette raison, les composés de la fraction (F 1) ne sont pas ionisés à pH 12 et sont dirigés dans la phase organique. La fraction (F 2), obtenue à pH 2, contient des composés dont le pKa est supérieur à 3 (tableau 8). Les composés à caractère acide sont ionisés lorsque le pH de la phase aqueuse est de deux unités supérieures au pKa des composés. Pour cette raison, les composés de la fraction (F 2) ne sont pas ionisés à pH 2 et sont dirigés dans la phase organique.

Tableau 14 : Taux de recouvrement des composés extraits à pH12 (F 1) et des composés extraits à pH 2 (F 2) avec du dichlorométhane

F 1 (%)		F 2 (%)	
cinéole	(91)	acide picolinique	(42)
gramine	(94)	alcool salicylique	(62)
caféine	(88)	acide t-cinnamique	(78)
thymol	(68)	acide p-hydroxybenzoïque	(35)
théophylline	(44)	umbelliférone	(54)
géraniol	(92)	acide p-coumarique	(68)

La deuxième étape est l'optimisation des solvants d'extraction. L'examen des résultats du tableau 14 révèle que les taux de recouvrement des composés de la fraction (F 2) sont inférieurs à ceux des composés de la fraction (F 1) avec une extraction au dichlorométhane. Les composés de la fraction à caractère acide (F 2) ont des fonctions hydroxyles plus nombreuses que les composés de la fraction à caractère neutre et basique (F 1). Les composés de la fraction à caractère acide peuvent former plus de liens hydrogènes avec la phase aqueuse. Le solvant d'extraction doit donc être modifié afin d'augmenter les interactions entre les composés et la phase organique. La modification de la phase organique s'effectue en ajoutant au dichlorométhane un solvant de polarité plus élevée afin de combattre les liens hydrogène entre la phase aqueuse et les composés. La modification de la phase organique permet d'augmenter la solubilité des composés dans la phase organique afin d'augmenter la constante de distribution (équation 4). L'ajout d'un solvant polaire peut par contre nuire à l'extraction des substances non-polaires. L'optimisation de l'extraction s'effectue en ajoutant de l'acétate d'éthyle au

dichlorométhane. Pour vérifier l'effet de l'ajout d'acétate d'éthyle au dichlorométhane comme solvant d'extraction, le rapport entre l'aire des produits extraits et l'étalon interne, qui est l'acide benzoïque pour la fraction à caractère acide et la diphénylamine pour la fraction à caractère neutre et basique, a été porté sur graphique en fonction de la composition de la phase organique. Pour chaque ratio de phase organique, 15 mL de phase aqueuse ont été extraits avec 3 portions successives de 15 mL de phase organique. La phase organique est par la suite évaporée et l'échantillon est repris dans 100 μ L d'acétonitrile pour analyse par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats illustrés à la figure 14 et la figure 15 permettent de déterminer la composition optimale de la phase organique pour l'extraction des différentes fractions du mélange.

En examinant les résultats des expériences d'extraction illustrées par les figures 14 et 15, il est possible de tirer des conclusions sur la composition des solvants d'extraction pour chacun des groupes de substances. Dans le premier cas, la fraction à caractère acide (F 2) (figure 14), on peut voir que l'efficacité de l'extraction pour la majorité des substances augmente avec l'ajout d'acétate d'éthyle. Ceci est en corrélation avec les énoncés précédents puisque ces composés possèdent tous une fonction polaire, alcool ou acide, et il y a donc une possibilité de forte affinité de ces composés avec l'acétate d'éthyle, solvant de plus forte polarité que le dichlorométhane. L'acide picolinique, bien que possédant une fonction acide, ne suit pas cette règle. Sa faible solubilité pour ce solvant explique ce recouvrement et on doit traiter cette substance comme un cas isolé. Pour les autres substances, l'augmentation de solubilité n'est plus significative à partir d'un pourcentage d'acétate d'éthyle supérieur à 50%. Ainsi, pour favoriser le recouvrement des acides organiques et réduire le temps d'évaporation lors de l'étape de concentration, il est souhaitable d'utiliser un mélange 50/50 de dichlorométhane/acétate d'éthyle. De plus, au-delà de 50 % d'acétate d'éthyle

la phase organique remonte à la surface de la phase aqueuse, ce qui augmente le nombre de manipulations pour récupérer la phase organique.

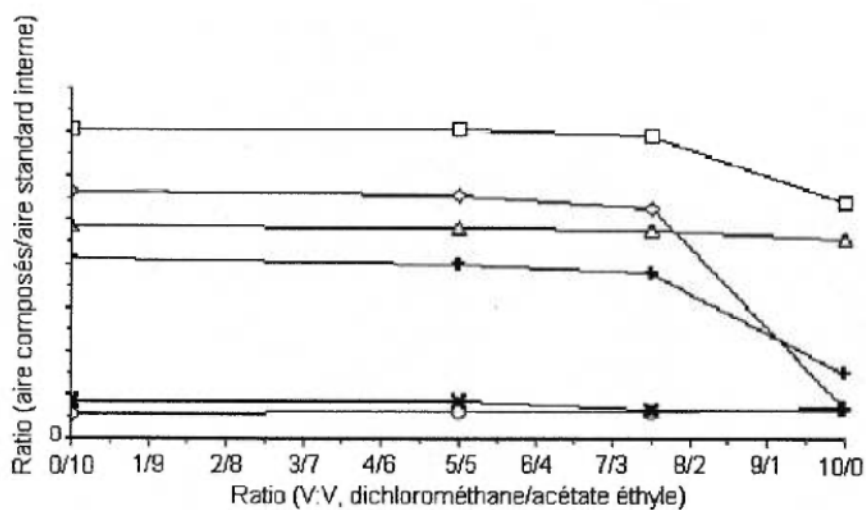


Figure 14: Influence de l'ajout d'acétate d'éthyle au dichlorométhane sur l'extraction liquide-liquide d'une phase aqueuse à pH 2.

O acide picolinique, ◇ acide p-hydroxybenzoïque,
 ⊕ umbelliférone, □ alcool salicylique, × acide p-coumarique,
 Δ acide t-cinnamique.

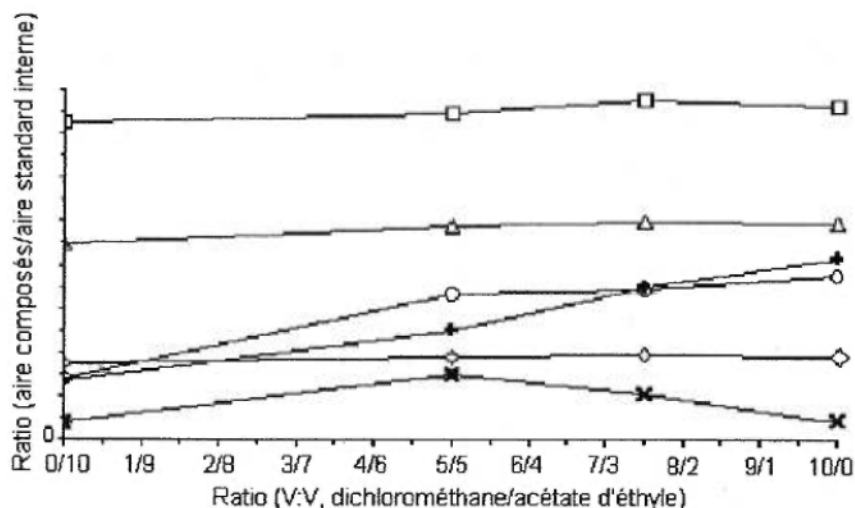


Figure 15: Influence de l'ajout d'acétate d'éthyle au dichlorométhane sur l'extraction liquide-liquide d'une phase aqueuse à pH 12.

O cinéole, ◇ gramine, + caféine, □ thymol, ✕ théophylline, Δ géraniol.

En ce qui concerne la fraction contenant les substances à caractère basique et neutre, on remarque sur la figure 15 que l'ajout d'acétate d'éthyle est peu significatif et même néfaste dans certains cas. La distribution des composés entre la phase organique et la phase aqueuse n'est pas modifiée de façon avantageuse avec l'ajout d'acétate d'éthyle. Le choix du solvant d'extraction pour cette fraction du schéma est donc de 100% de dichlorométhane.

Afin de vérifier l'efficacité des solvants choisis, des mesures du taux de recouvrement ont été effectuées en comparant le ratio des composés extraits à celui obtenu d'un mélange étalon de concentration identique. Les résultats présentés au tableau 15 donnent les rendements d'extraction obtenus pour les

différentes substances étudiées dans chacune des fractions. On observe que les rendements d'extraction obtenus sont dans l'ensemble supérieur à 80%, ce qui est suffisant pour une étude quantitative. L'acide picolinique pour des raisons de solubilité donne un rendement de 46%. La théophylline de son côté aurait eu avantage à être extraite avec le mélange 50/50 acétate d'éthyle dichlorométhane comme on peut le constater sur la figure 15. La théophylline aurait gagné près de 40% de recouvrement. Par contre, l'ensemble des substances de sa fraction nécessite plus de dichlorométhane.

Tableau 15 : Taux de recouvrement des composés extraits à pH12 (F 1) avec du dichlorométhane et des composés extraits à pH 2 (F 2) avec du dichlorométhane/acétate d'éthyle (50 :50, V :V)

F 1 (%)		F 2 (%)	
cinéole	(91)	acide picolinique	(46)
gramine	(94)	alcool salicylique	(93)
caféine	(88)	acide t-cinnamique	(97)
thymol	(68)	acide p-hydroxybenzoïque	(89)
théophylline	(44)	umbelliférone	(78)
géraniol	(92)	acide p-coumarique	(81)

6.2.2 Optimisation du schéma d'extraction liquide-liquide

À l'aide des résultats présentés, il a été possible d'effectuer un choix judicieux des solvants pour l'extraction liquide-liquide des substances d'intérêt. Le solvant pour la fraction contenant des substances à caractère acide est un

mélange 50/50 dichlorométhane/acétate d'éthyle. Le solvant pour la fraction contenant les substances à caractère basique et neutre est le dichlorométhane.

Une fois les compositions des solvants d'extraction optimisées, il est possible de développer un schéma de fractionnement compatible avec la stratégie analytique que nous poursuivons. Les deux fractions obtenues précédemment peuvent être divisées en sous fractions en variant le pH de la phase aqueuse lors des extractions. Selon l'équation 5, un composé complètement dissocié en phase aqueuse ne sera pas extrait. Donc, selon l'équation 5, des extractions successives de la phase aqueuse ajustée à différents pH permettent de séparer les composés en plusieurs fractions selon le pKa de chaque composé.

La figure 16 présente un schéma de fractionnement chimique des échantillons obtenus à partir des procédures d'échantillonnage ou de la procédure de récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillons aqueux. Dans ce schéma, l'échantillon aqueux est filtré sous vide à l'aide d'un filtre de 45 μm . Suite à la filtration, le pH de l'échantillon est ajusté à 12 avec une solution de NaOH 1 N. L'extraction initiale de l'échantillon aqueux est effectuée avec trois portions successives de dichlorométhane. Par la suite, toutes les extractions des fractions découlant de la phase organique obtenue de l'extraction initiale sont effectuées à l'aide de trois portions successives de dichlorométhane. Les fractions de cette partie du schéma (partie droite) contiennent les substances à caractère neutre et basique. Pour les extractions effectuées sur la phase aqueuse restante de l'extraction initiale à pH 12 et celles qui en découlent, un mélange 50/50 dichlorométhane/acétate d'éthyle est utilisé comme solvant d'extraction. Les fractions de cette partie du schéma (partie gauche) contiennent les substances à caractère acide. La quantité de solvant utilisée dans chacune des portions est identique à la quantité de phase aqueuse présente. La phase organique des fractions

d'intérêt est récupérée dans des ballons et évaporée à sec sur un évaporateur rotatif. Par la suite, chaque extrait est repris dans un volume de 100 μ L d'acétonitrile pour être analysé chromatographiquement.

Lors de l'extraction initiale, les substances à caractère neutre ou basique se retrouvent dans la phase organique tandis que les substances à caractère acide demeurent dans la solution aqueuse. La phase organique obtenue de l'extraction de départ est mise en contact avec une phase aqueuse ajustée à un pH aux environs de 9 avec une solution de NaOH 1 N. Cette procédure permet d'isoler les bases fortes qui seront entraînées dans la phase aqueuse, alors que les substances neutres et les bases faibles demeureront dans la phase organique. La phase organique résultante de cette étape est alors mise au contact d'une phase aqueuse ajustée à un pH de 3 avec une solution de HCl 2 N. Les composés neutres demeureront dans de la phase organique pour former la fraction F5 et les bases faibles passeront dans la phase aqueuse. Les bases fortes et faibles qui se retrouvent dans des phases aqueuses sont transférées en milieu organique par des extractions au dichlorométhane de leur phase aqueuse respective ajustée à pH 12 avec une solution de NaOH 5 N. Cette dernière étape conduit respectivement aux fractions F3 représentant les bases fortes et F4 représentant les bases faibles.

Le fractionnement chimique des substances retenues initialement à l'intérieur de la phase aqueuse de l'extraction de départ s'effectue selon le même principe. La phase aqueuse est ajustée à un pH aux environs de 4 à l'aide d'une solution de HCl 2 N. Cette étape permet de séparer les acides forts qui sont maintenus dans la phase aqueuse à ces conditions de pH, des acides faibles qui sont entraînés dans la phase organique pour former la fraction F2. Par la suite, la phase aqueuse résiduelle est portée à un pH aux environs de 1 à l'aide d'une solution de HCl 2 N pour isoler les acides forts qui forment la fraction F1. Les fractions F1 à F5 sont analysées par chromatographie en phase liquide ou gazeuse selon la nature et la stabilité des composés.

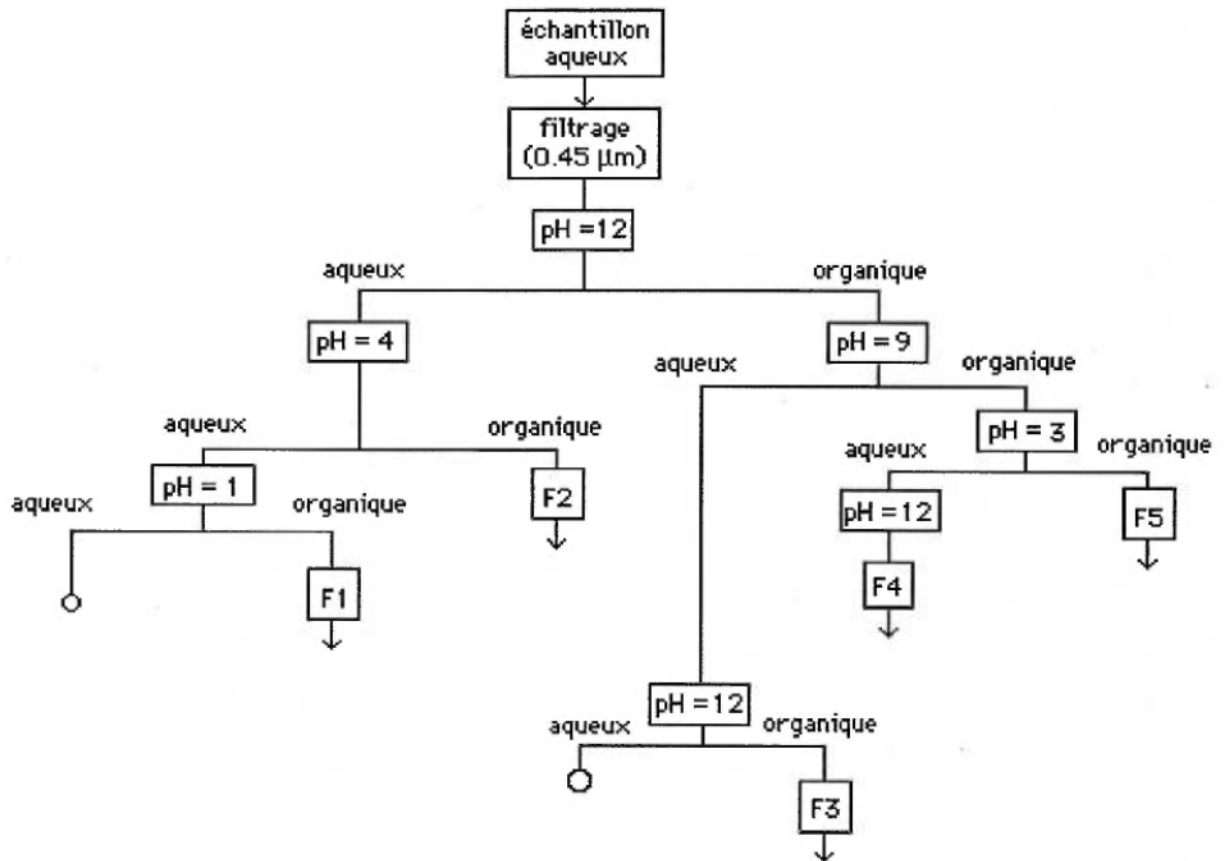


Figure 16: Schéma de fractionnement liquide-liquide des échantillons.

Les taux de recouvrement ont été mesurés pour différents composés du tableau 1. Les résultats obtenus sont compilés aux tableaux 16 et 17. Ces derniers représentent le pourcentage de recouvrement des composés à l'intérieur des différentes fractions du schéma d'extraction. Pour les fractions F2 et F4 les étalons internes utilisés lors de ces essais sont respectivement l'acide benzoïque et la diphenylamine. Pour les fractions F1, F3 et F5, l'étalon externe utilisé est l'acide p-méthoxyphénylacétique.

Tableau 16: Taux de recouvrement des composés des fractions à caractère acide lors de l'extraction liquide-liquide avec 50/50 dichlorométhane/acétate d'éthyle

Substances	F1 (%)	F2 (%)
acide picolinique	---	44 (6)
alcool salicylique	---	89 (1)
acide t-cinnamique	---	95 (2)
acide p-hydroxybenzoïque	---	86 (1)
umbelliférone	---	76 (5)
acide p-coumarique	---	79 (6)

() = coefficients de variation sur trois essais

L'examen des tableaux montre que la méthode d'extraction est efficace pour l'ensemble des produits étudiés car les recouvrements sont presque tous supérieurs à 70%. On peut, de plus, remarquer que les rendements sont plus

faibles comparativement à ceux obtenus lors des tests de solvants. Cet écart s'explique par le fait que des manipulations supplémentaires, nécessaires au bon déroulement du fractionnement chimique, sont exécutées pour séparer les fractions les unes des autres. Dans le tableau 16, on peut remarquer l'absence de composés dans la fraction 1. Ce phénomène s'explique avec les pKa des composés. Dans notre mélange, aucun composé à caractère acide n'a un pKa inférieur à 3.5. Dans ce contexte, les composés à caractère acide ne sont pas ionisés totalement à pH 4 et sont récupérés quantitativement dans la phase organique pour former la fraction 2. Cette fraction contient des acides faibles ionisés à pH alcalin.

Tableau 17 : Taux de recouvrement des composés des fractions à caractère neutre et basique lors de l'extraction liquide-liquide au dichlorométhane.

Substance	F3 (%)	F4 (%)	F5 (%)
cinéole	---	---	86 (7)
thymol	---	---	83 (4)
géraniol	---	---	82 (4)
gramine	---	61 (4)	---
caféine	---	---	88 (6)
théophylline	---	---	43 (9)

() = coefficients de variation sur trois essais

Avec le même raisonnement, on explique l'absence de composés dans la fraction 3. Aucun des composés à caractère basique n'a un pKa supérieur à 10. Ces composés ne sont donc pas ionisés en phase aqueuse mais extraits quantitativement dans la phase organique lorsque la phase aqueuse est ajustée à pH 9 pour former la fraction 5 et la fraction 4. Les composés de la fraction 4 sont des bases faibles ionisées à pH acide. Les composés de la fraction 5 sont des composés neutres non dissociés à pH alcalin ou acide.

6.3 Fractionnement chimique par extraction solide-liquide.

Il est possible de favoriser les interactions des composés avec la phase mobile ou la phase stationnaire en travaillant sur les propriétés acido-basiques des composés présents tel que discuté dans la section 5.3.1.1 et la section 5.3.3. Le contrôle du pH de la phase aqueuse permet de modifier le partage des composés entre la phase stationnaire et la phase mobile. Dans ce contexte, un schéma d'extraction solide-liquide utilisant des cartouches d'extraction peut être développé pour répondre aux exigences de la procédure de fractionnement chimique. En utilisant l'extraction solide-liquide, il est possible de combiner la préconcentration développée précédemment avec la procédure de fractionnement chimique pour les échantillons aqueux. Cette combinaison réduit le temps de préparation des échantillons aqueux pour l'analyse et l'identification des substances allélopathiques d'intérêt. La figure 17, présente un schéma qui est en mesure d'effectuer le fractionnement chimique des échantillons obtenus à partir des procédures d'échantillonnage et de récupérations des substances à potentiel allélopathique. Les cartouches utilisées pour le fractionnement chimique sont conditionnées tel que décrit dans le chapitre précédent.

Dans ce schéma de fractionnement sur phase solide, l'échantillon aqueux est initialement filtré à l'aide d'un filtre de 45 μm . Le pH de l'échantillon est

ensuite ajusté à une valeur de 11 à l'aide d'une solution de NaOH 1 N. L'échantillon aqueux préparé passe dans une cartouche de type octadécyl C18. Dans ces conditions, les substances à caractère basique et neutre sont adsorbées sur la cartouche. La cartouche C18 contenant les substances à caractère basique et neutre est transférée vers l'étape 2 du schéma de la figure 17. La cartouche est rincée avec 3 mL d'eau ajustée à pH 3 à l'aide d'une solution de HCl 2 N. Les substances à caractère neutre dans ces conditions demeurent retenues sur la phase stationnaire tandis que les substances à caractère basique passent dans l'éluat. La cartouche, contenant les substances à caractère neutre est séchée avec un jet d'azote et éluee avec 3 mL d'acétate d'éthyle. Par la suite, le solvant est évaporé à sec et la fraction est reconstituée dans 100 µL d'acétonitrile pour former la fraction F3.

L'éluat, obtenu de la première cartouche d'extraction de type C18 lors de l'étape 2, est amené à un pH aux environs de 11 à l'aide d'une solution de NaOH 5 N. Cet éluat, contenant les composés à caractère basique, est passé sur un autre adsorbant solide de type C18. Après le passage de l'échantillon, la cartouche est rincée avec 2 mL d'eau ajustée à pH 11, séchée avec un jet d'azote et éluee avec 3 mL d'acétate d'éthyle. Par la suite, le solvant est évaporé à sec et la fraction est reconstituée dans 100 µL d'acétonitrile pour former la fraction F4.

Au niveau de l'étape 1 de l'extraction présentée à la figure 17, la solution aqueuse recueillie, formant l'éluat de l'extraction initiale, est ajustée à un pH aux environs de 6 à l'aide d'une solution de HCl 1 N. La phase aqueuse obtenue passe dans une cartouche adsorbante de type C18 pour adsorber les substances glucosidiques. Cette dernière cartouche est rincée avec 6 mL d'une solution aqueuse à pH 6, séchée avec un jet d'azote et éluee avec 3 mL d'acétate d'éthyle. Par la suite, le solvant est évaporé à sec et la fraction est reconstituée dans 100 µL d'acétonitrile pour former la fraction F1 contenant les substances glucosidiques.

L'éluat aqueux résultant de l'extraction des substances glucosidiques est acidifié à pH 2 à l'aide d'une solution de HCL 2 N. L'éluat est introduit dans une cartouche de type C18 afin d'adsorber les acides non dissociés en phase aqueuse. La cartouche est rincée avec 2 mL d'eau ajustée à pH 2, séchée avec un jet d'azote puis éluee avec 3 mL d'acétate d'éthyle. L'éluat recueilli lors de l'extraction des acides non dissociés en phase aqueuse sur la cartouche C18 est amené à un pH de 9 à l'aide d'une solution de NaOH 5 N. Dans ces conditions de pH, les substances à caractère acide sont dissociées en phase aqueuse. L'éluat ainsi préparé est passé sur une cartouche échangeuse d'anions de type amine quaternaire (QMA). La cartouche de type QMA est ensuite rincée avec 2 mL d'eau ajustée à pH 9, séchée avec un jet d'azote et éluee avec 3 mL de méthanol/HCl (90/10, V/V).

Il est à noter que l'élution de la cartouche C18 contenant les acides non dissociés en phase aqueuse et l'élution de la cartouche QMA sont effectuées dans un même tube. Ceci nous permet de récupérer les substances à caractère acide dans une même fraction afin d'éviter le chevauchement d'un composé à l'intérieur de deux fractions différentes. Les volumes d'élution combinés sont évaporés à sec. Par la suite, l'échantillon est repris dans 100 μ L d'acétonitrile pour former la fraction F2.

Les fractions f1 à f4 sont analysées par chromatographie en phase liquide ou en phase gazeuse selon la nature et la stabilité des composés.

De façon à évaluer le rendement de cette deuxième approche de fractionnement chimique, les taux de recouvrements ont été mesurés pour différents composés du tableau 1. Les résultats sont présentés aux tableaux 18 et 19. Les taux de recouvrement ont été mesurés à l'aide de deux étalons internes. Les étalons internes sont ajoutés avant chacune des étapes du fractionnement chimique. Pour la fraction F2, l'étalon est l'acide benzoïque tandis que pour l'ensemble des autres fractions l'étalon utilisé est la diphénylamine.

Tableau 18 : Taux de recouvrements obtenus lors d'extractions sur phase solide pour les composés des fractions F1 et F2 du schéma d'extraction.

Substances	F1 (%)	F2 (%)
acide picolinique	----	94 (2)
alcool salicylique	----	32 (6)
acide t-cinnamique	----	98 (3)
acide p-hydroxybenzoïque	----	91 (4)
umbelliférone	----	87 (5)
acide p-coumarique	----	83 (5)
théophylline	----	71 (1)
esculine	52 (7)	----
rutine	45 (8)	----

() = coefficients de variation sur trois essais

On peut constater à l'examen des résultats présentés dans le tableau 18 que les taux de recouvrement sont acceptables pour les composés des fractions

F1 et F2. Les composés retenus sur la cartouche C18 de la fraction 1 sont les composés non dissociés à pH 6. Tel que montré dans le tableau 9, les composés à caractère acide ont un faible taux de recouvrement lorsque le pH de la phase aqueuse est près de 7 avec des phases stationnaires non-polaires. Par contre, il est nécessaire d'augmenter le volume d'eau de lavage afin de lessiver les composés à caractère acide de la cartouche. Selon l'équation 2 discutée précédemment, l'augmentation du volume de phase mobile réduit le facteur de capacité et de ce fait la rétention des composés. Ce lavage de 6 mL d'eau à pH 6, diminue le chevauchement de la théophylline et de l'umbelliférone entre les fractions 1 et 2. Le chevauchement de ces substances s'explique par un pKa au-dessus de 6 pour ces composés. Les autres composés ne présentent pas de chevauchement dans la fraction 1 puisqu'ils ont des pKa inférieurs à 6 où présentent une faible rétention dans cette cartouche (alcool salicylique). Suite à cette extraction, les composés à caractère acide se retrouvent dans l'éluat aqueux et sont extraits quantitativement avec une cartouche C18 et une cartouche QMA tel que décrit dans le chapitre précédent à la section 5.5.

Les résultats obtenus pour les fractions F3 et F4, présentés dans le tableau 19, montrent un taux de recouvrement élevé pour l'ensemble des composés. La cartouche C18 utilisée pour l'extraction initiale de la phase aqueuse ajustée à pH 11 contient des composés non dissociés à ce pH. Ces composés sont des composés à caractère basique avec un pKa inférieur à 11 et des composés à caractère neutre non dissociés en phase aqueuse. La fraction 3 contient les composés de la cartouche de l'extraction initiale non dissociés à pH 3, les composés neutres. Les composés à caractère basique se retrouvent dans l'éluat aqueux de la fraction 3 et sont récupérés à un pH supérieur à leur pKa tel que décrit à la section 5.5 du chapitre précédent pour former la fraction 4. Il est à noter que si des composés fortement basiques sont introduits, une fraction 5 peut-être optimisée à l'aide d'une extraction sur phase échangeuse de cations pour les composés avec un pKa supérieur à 11. Par contre, cette

phase n'a pas été utilisée pour notre étude puisqu'aucun composé du tableau 1 ne possède un pKa aussi élevé.

Tableau 19 : Taux de recouvrement obtenus lors d'extractions sur phase solide pour les composés des fractions F3 et F4 du schéma d'extraction.

Substance	F3 (%)	F4 (%)
cinéole	84 (2)	---
thymol	92 (2)	---
géraniol	94 (5)	---
caféine	98 (1)	---
gramine	9 (6)	55 (6)

() = coefficients de variation sur trois essais

6.4 Choix de la méthode de fractionnement chimique

Les taux de recouvrement, la facilité d'opération et le temps d'analyse sont des éléments à considérer pour le choix de la méthode de fractionnement chimique. L'examen des résultats et des méthodes utilisés dans la présente étude permettent de déterminer les principaux points distinguant les méthodes de fractionnement chimique.

Les taux de recouvrement des deux méthodes de fractionnement chimique sont comparables. Dans les deux cas, les taux de recouvrement pour la

plupart des composés sont supérieurs à 70%. Un rendement d'extraction de 70% jumelé à des coefficients de variation inférieurs à 15% permettent une analyse quantitative des composés.

Les dissimilitudes entre les deux méthodes de fractionnement chimique sont surtout perceptibles au niveau des manipulations expérimentales. La différence entre les méthodes est le temps d'analyse et la facilité d'opération. Dans le premier cas, soit pour l'extraction liquide-liquide, le temps nécessaire à l'exécution complète du schéma d'extraction est d'environ une journée. Durant cette journée, le nombre d'échantillons que l'on peut analyser simultanément est restreint. De plus, on doit composer avec l'émulsion de certains échantillons lors des extractions.

L'extraction sur phase solide est par contre une méthode rapide et très peu gourmande en solvant organique. Le temps d'analyse de cette méthode d'extraction est court, soit une demi-journée. De plus, il est possible de rendre la méthode semi-automatique à l'aide d'un échantillonneur multiple de Waters qui permet d'utiliser près d'une vingtaine de cartouches à la fois. Cette méthode permet aussi d'économiser des coûts puisque la méthode de récupération et le fractionnement chimique peuvent être combinés pour les échantillons aqueux.

À la vue des différents résultats, le choix de la méthode de fractionnement chimique est l'extraction solide-liquide. Les travaux subséquents seront donc effectués essentiellement à l'aide d'extraction sur phase solide.

6.5 Conclusion

Les résultats obtenus dans ce chapitre ont permis de développer une procédure de fractionnement chimique adaptée aux besoins du projet qui

s'intègre aux autres étapes d'échantillonnage et de récupération des substances à potentiel allélopathique.

Le schéma de fractionnement chimique offre la possibilité de fractionner la plupart des familles chimiques d'intérêt avec un pourcentage de recouvrement adéquat. Le fractionnement chimique permet de réduire le nombre de composés dans chacune des fractions afin de simplifier les analyses. De plus, le fractionnement chimique permet de regrouper les composés avec des groupes fonctionnels (fonction acide ou basique) similaires dans une même fraction. Il est donc possible d'obtenir de l'information préliminaire sur le type de substances dans les fractions. Chacune des fractions pourra être soumise à des tests d'activités biologiques afin de déterminer les fractions possédant une activité allélopathique. Cette étape permet d'identifier les fractions actives et de concentrer les travaux d'identification sur ces fractions.

De plus, l'utilisation de l'extraction sur phase solide combinée à un échantillonneur permettra d'automatiser une certaine partie des analyses afin d'accélérer l'étude des échantillons. Cette combinaison permet également d'uniformiser les analyses et les résultats qui en découlent.

CHAPITRE 7

ÉCHANTILLONNAGE

7.1 Introduction

L'échantillonnage des composés à potentiel allélopathique est la troisième étape dans le schéma de la stratégie analytique (cf. section 2.8). L'échantillonnage des substances allélopathiques à partir d'espèces végétales sélectionnées est un élément critique dans toute étude visant à caractériser ces substances. Tel que discuté à la section 2.6, il y a deux approches pour effectuer l'échantillonnage des composés à potentiel allélopathique.

La première approche est l'extraction directe des substances par des extractions de la plante (tige, feuilles, etc..) à l'aide de solvants organiques. Cette méthode permet d'obtenir une quantité suffisante de composés pour caractériser leur structure chimique. Par contre, cette approche a pour effet de perturber le milieu naturel et peut donner des résultats biaisés par rapport à la réalité². Dans des études de ce genre, on retrouve certains composés parmi la liste des substances identifiées, qui ne sont généralement pas émises par les plantes dans des conditions normales. Les résultats tirés de ces études sont donc entachés par la présence d'éléments causés par la méthode expérimentale².

La deuxième approche est la récolte des eaux de lavage ou de percolation d'une plante en croissance afin d'en extraire les composés à potentiel allélopathique. Cette deuxième approche présente certaines difficultés sur le plan expérimental, par exemple les propriétés d'adsorption du sol, mais offre l'avantage de s'approcher de la réalité en perturbant peu le système.

Les méthodes d'échantillonnage directes sont étudiées dans une étude en parallèle. Dans la présente étude, une méthode de récolte des eaux de percolation d'une plante est étudiée. Le montage expérimental, le protocole d'échantillonnage ainsi que l'analyse des échantillons recueillis seront discutés dans ce chapitre.

7.2 Montage

La méthode de récupération des substances à potentiel allélopathique développée dans la présente étude est basée sur les travaux de Tang². Ce dernier utilise une méthode de récupération à l'intérieur de laquelle une plante vit dans un milieu artificiel où y circule en continu une solution nutritive. Les substances récupérées de la solution nutritive sont étudiées. Cette méthode permet l'étude des exsudats racinaires, mais néglige les substances émises par les autres modes de libération des substances allélopathiques énumérées à la section 2.2. De plus, la présence d'un milieu artificiel peut perturber la plante et les substances qu'elle émet.

Le montage expérimental de la présente étude est développé en recréant le plus fidèlement possible le milieu naturel de la plante. Le montage expérimental présenté à la figure 18 permet de recueillir les eaux de percolation du *Kalmia Angustifolia*. Dans ce montage, on y distingue une enceinte de verre de 20 litres. Dans cette enceinte se trouvent 18 litres de terre prélevée sous l'emprise du réseau de distribution d'électricité d'Hydro-Québec. Un *Kalmia Angustifolia* y est planté et entretenu par le Jardin Botanique de Montréal. Le plant est arrosé périodiquement. Lors des arrosages, l'eau est appliquée sur l'ensemble du plant de façon à favoriser la récupération des substances à potentiel allélopathique par lessivage. De plus, les substances émises par volatilisation et exsudation racinaire se retrouvant à

la surface du sol ou dans le sol peuvent être entraînées par les eaux d'arrosage.

Le montage expérimental reproduit le milieu naturel de la plante. Par contre, compte tenu de l'activité bactérienne et de la présence d'une multitude de substances organiques naturelles dans l'environnement végétal, la procédure d'échantillonnage doit tenir compte des éléments susceptibles d'altérer les résultats. Dans ce sens, le montage expérimental doit isoler l'échantillon des éléments extérieurs, afin de limiter l'activité biologique et biochimique pouvant nuire à son intégrité physique et chimique.

Dans le montage de la figure 18, une attention particulière est portée à la protection de l'intégrité chimique et biochimique des échantillons. L'échantillon et l'enceinte contenant la plante doivent éviter tout contact avec les radiations lumineuses pour éliminer les réactions photochimiques. Comme on peut le constater sur la figure 18, le contenant de verre dans lequel réside la terre, est maintenu dans une chambre en bois munie d'une porte et d'un couvercle qui permet d'isoler l'ensemble de la lumière extérieure. De façon similaire, le pot utilisé pour la récupération a été enduit de peinture noire à l'extérieur de façon à bloquer la lumière.

Le deuxième phénomène à surveiller est la dégradation de l'échantillon. Parmi les facteurs causant la dégradation, on retrouve l'activité bactérienne accrue à la suite d'une exposition à une source de chaleur ou tout simplement un contact avec des micro-organismes provenant de d'autres milieux. De façon à protéger l'échantillon contre une chaleur excessive, la chambre de bois abritant l'échantillon est peinte. L'extérieur de la chambre de bois est peint en blanc pour réfléchir les radiations externes et l'intérieur de la chambre est peint en noir pour éviter toute réflexion sur le pot d'échantillonnage. De plus, tout au long de la période d'échantillonnage, le pot est maintenu à basse température à l'aide d'une enveloppe refroidissante contenant de la glace

concassée. Le fait de maintenir les eaux récupérées à basse température, (4°C) a pour effet de ralentir la vitesse des procédés de dégradation qui pourraient être actifs dans le milieu. Les échantillons prélevés ne sont pas analysés immédiatement et doivent être conservés dans des conditions évitant leur altération chimique ou biochimique. Dans la procédure, les échantillons aqueux récupérés à froid sont congelés à -20°C immédiatement après leur collection. Dans ces conditions, les chances de dégradation de l'échantillon sont minimisées, étant donné que l'activité bactérienne est généralement interrompue sous ces conditions. Ainsi, le montage devrait réduire substantiellement la dégradation due à la lumière et à la chaleur.

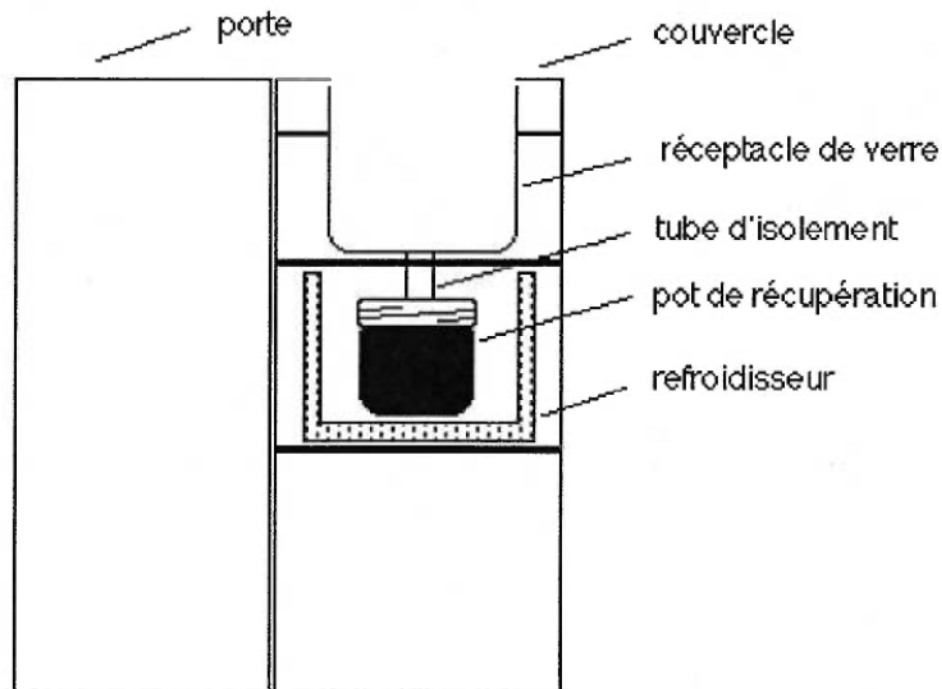


Figure 18: Montage expérimental pour la récupération des eaux de percolation dans les expériences effectuées sous conditions contrôlées.

De plus, dans la conception du montage des efforts sont déployés afin de limiter le contact des échantillons avec l'air ambiant. Cette isolation du système est effectuée à l'aide d'un dispositif simple qui permet de changer les pots de récupération, tout en empêchant l'écoulement d'eau entre les périodes de collection. Le dispositif de la figure 19, montre l'interface de collection entre l'enceinte de verre et les pots de récupération. Le système assure l'étanchéité à l'aide de deux adaptateurs situés de part et d'autre du couvercle du pot. L'adaptateur à réceptacle permet de visser l'ensemble au réceptacle de verre et l'adaptateur à couvercle permet de maintenir le couvercle en contact avec l'adaptateur à réceptacle et de le maintenir en position. Lors de l'échantillonnage, le pot est vissé au couvercle de l'intérieur, puis la gaine refroidissante est glissée autour du pot. Un bouchon permet d'arrêter l'écoulement lors du changement de pot.

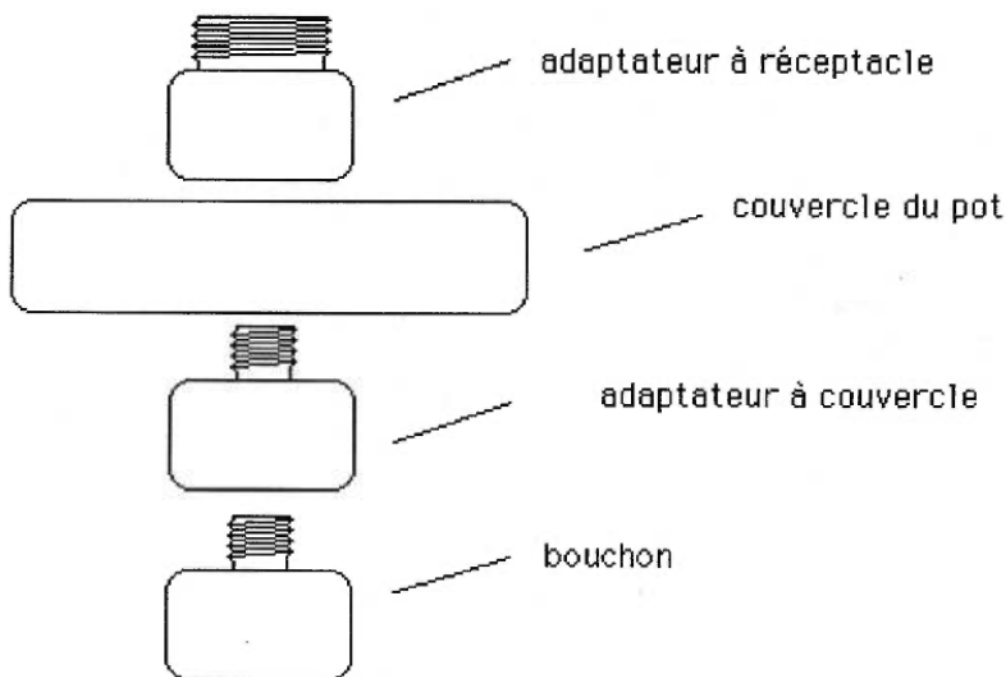


Figure 19: Système d'interface de récupération des eaux de percolation pour isoler les éluats récupérés de l'air ambiant.

En résumé, le montage élaboré devrait permettre de récupérer des échantillons contenant des composés à potentiel allélopathique. Ces composés sont issus de trois modes d'émission des substances allélopathiques qui sont la volatilisation, le lessivage et l'exsudation racinaire. De plus, le montage isole l'échantillon des éléments extérieurs pouvant altérer sa composition.

7.3 Protocole d'échantillonnage

Un protocole d'échantillonnage a été développé lors des expériences utilisant des systèmes maintenus sous conditions contrôlées. Ce protocole assure l'efficacité maximale du système d'échantillonnage et évite l'influence de phénomènes aléatoires comme les arrosages irréguliers. Ainsi, un certain nombre d'exigences doivent être respectées. Ce protocole d'échantillonnage complète le travail effectué au niveau du montage en ce qui a trait à la récupération d'échantillons les plus intègres possible. Le protocole d'échantillonnage se déroule comme suit :

1. Prendre un pot et l'identifier de la façon suivante: Plante, jour/mois/année, volume récupéré. Ex: Kalmia-11/12/92-250mL
2. Retirer le bouchon de Téflon™ et le remplacer par le support à couvercle;
3. Fixer le pot au support de Téflon™;
4. Placer l'isoloir à pot à l'intérieur du refroidisseur;
5. Remplir de glace concassée l'espace entre le refroidisseur et l'isoloir à pot;
6. Installer le refroidisseur de polystyrène sous le pot;
7. Arroser la plante avec un volume d'eau approprié;
8. Vérifier périodiquement l'état du refroidisseur et le contenu du pot;

9. Retirer le pot et remettre le bouchon;
10. Si le contenu du pot est d'environ 250 mL, le congeler, par contre si le volume est inférieur à 250 mL, le réutiliser jusqu'à ce que le volume total soit de 250 mL;
11. Si au cours d'un même arrosage, le volume récupéré excède 250 mL, changer de pot et continuer l'échantillonnage;
12. Tenir une liste détaillée des échantillons prélevés de la façon suivante: date, plante, volume d'arrosage et volume récupéré.

7.4 Analyse des échantillons

L'échantillonnage est une étape cruciale au bon déroulement de l'étude des substances allélopathiques. Selon le rendement de la procédure d'échantillonnage, l'analyse des substances allélopathiques sera facilitée ou limitée. Dans le cas de l'échantillonnage direct des composés à potentiel allélopathique, il est facile d'obtenir un niveau de concentration suffisant pour les analyses. Par contre, la dégradation des composés par des micro-organismes, la rétention des composés dans le sol et plusieurs autres facteurs peuvent limiter le recouvrement des substances allélopathiques lors de l'analyse des eaux de percolation. Il est donc très important de vérifier la capacité de récupération de la procédure d'échantillonnage et de modifier ou changer la procédure de récupération des substances allélopathiques, si les résultats en démontrent la nécessité.

L'analyse des eaux de ruissellement obtenues de la procédure d'échantillonnage des eaux de percolation du *Kalmia Angustifolia*, permet de déterminer si les extraits contiennent des substances à potentiel

allélopathique. La méthodologie analytique utilisée pour l'analyse des échantillons recueillis est basée sur celle décrite dans le chapitre 5 traitant de la récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillon aqueux. Par contre, si la quantité de composés à potentiel allélopathique détectée dans les échantillons est très grande, les échantillons seront analysés de nouveau avec la méthode de fractionnement des composés à potentiel allélopathique décrite dans le chapitre 6.

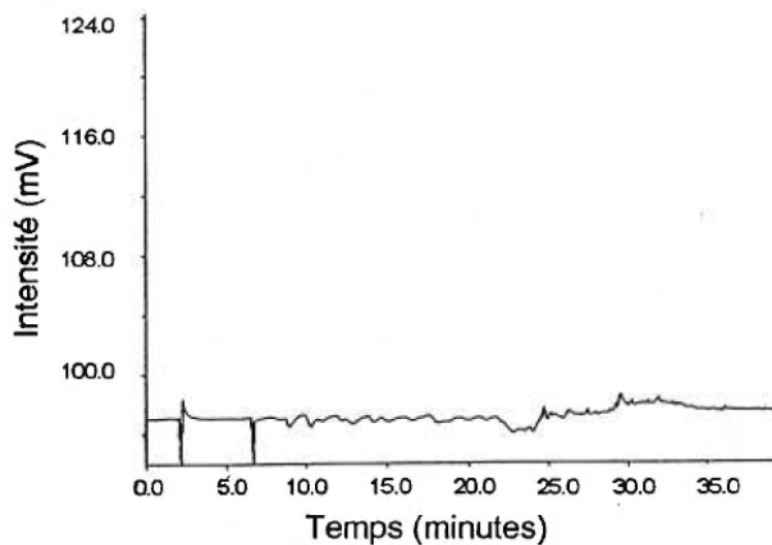
Les échantillons sélectionnés pour les analyses appartiennent à trois périodes de croissance de la plante. La période de pousse des feuilles, le mois de mai ou l'activité est très grande dans la plante, la période de croissance de la plante, juin et juillet et la période de pré-hibernation, août et septembre. Un échantillon témoin ne contenant aucune plante est extrait avec chaque échantillon d'eau de percolation du *Kalmia Angustifolia* afin de contrôler les interférences. On peut, à l'aide de ces échantillons, couvrir l'ensemble des périodes propices à l'émission de substances allélopathiques.

Avant son analyse l'échantillon aqueux doit être préparé afin d'être compatible avec la méthode analytique employée. Premièrement, l'échantillon est filtré, à l'aide d'un système de filtration Millipore équipé d'un filtre de 45 μm . La filtration permet d'éliminer les particules insolubles susceptibles d'obstruer les cartouches servant à l'extraction des composés. L'échantillon issu de la procédure d'échantillonnage est d'un volume approximatif de 250 mL. Cet échantillon est séparé en cinq aliquotes afin de limiter le lessivage des cartouches par une trop grande quantité d'eau éluant la cartouche. En effet, lorsque la quantité de phase mobile augmente, le facteur de capacité des composés est réduit (équation 2, section 5.3.1). Une diminution du facteur de capacité implique que la rétention des composés est aussi réduite (équation 3, section 5.3.1). Finalement, chaque aliquote est enrichie avec 100 μL d'une solution contenant 10 mg/L d'acide t-cinnamique et de diphénylamine. Ces

composés sont les étalons internes pour les fractions résultantes de l'extraction.

Pour l'analyse des échantillons naturels issus de la procédure d'échantillonnage, la méthode de récupération décrite à la section 5.5 est légèrement modifiée. La première cartouche d'extraction de type octadécyl (C18) servant à l'extraction à pH 10 est éluée seule selon la procédure décrite à la section 5.4.1 de la présente étude. La cartouche de type octadécyl (C18) servant à l'extraction à pH 2 et celle de type amine quaternaire (QMA), sont éluées ensemble selon la procédure décrite à la section 5.4.1 et 5.4.2 de la présente étude. La première fraction, résultat de la première extraction à pH 10 sur cartouche de type octadécyl (C18) contient les substances à caractère basique et neutre. La deuxième fraction obtenue à l'aide de la phase aqueuse restante contient les substances à caractère acide. Les éluats de chaque aliquote représentant les mêmes fractions sont combinés, évaporés et l'échantillon final est repris dans 100 μ L d'acétonitrile pour être analysé par chromatographie en phase liquide selon les conditions décrites dans le tableau 3. Les figures 20 et 21 représentent des chromatogrammes en phase liquide des extractions effectuées sur les eaux de percolation.

A)



B)

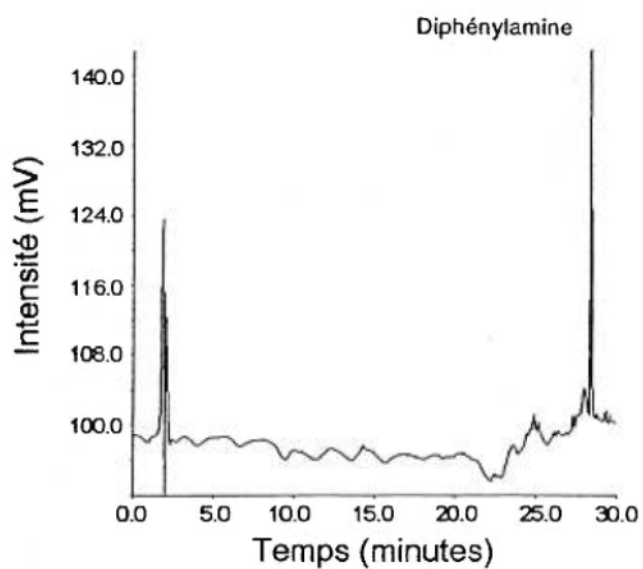
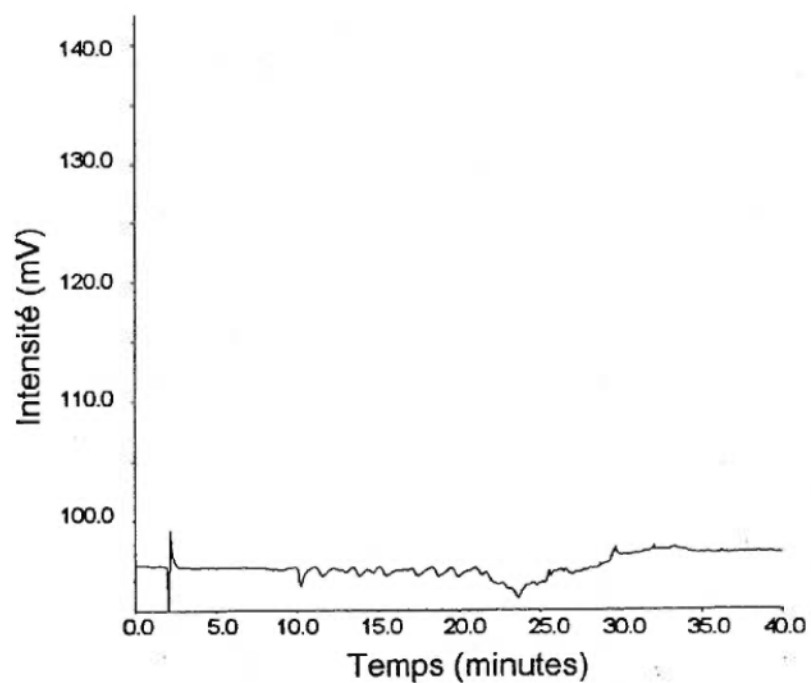


Figure 20: Chromatogrammes en phase liquide de la fraction à caractère neutre et basique.

A) Blanc de matrice, B) Fraction à caractère neutre et basique des eaux de percolation du *Kalmia Angustifolia*

A)



B)

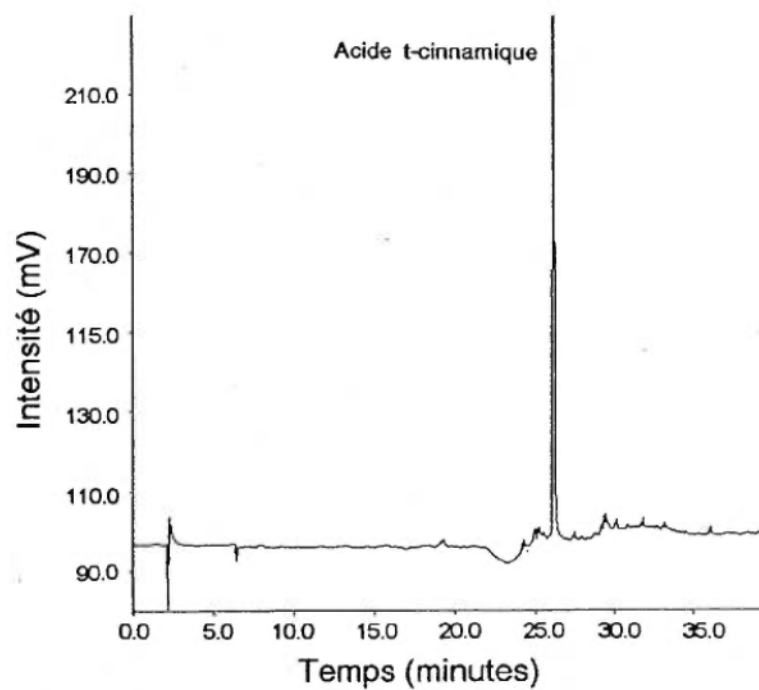


Figure 21: Chromatogrammes en phase liquide de la fraction à caractère acide.

A) Blanc de matrice, B) Fraction à caractère acide des eaux de percolation du *Kalmia Angustifolia*

Les résultats obtenus de l'analyse des eaux de percolation se sont avérés peu concluants puisqu'aucun pic chromatographique autre que les pics des standards internes ne sont détectés (figures 20 et 21). Un certain nombre d'hypothèses peuvent alors être formulées afin d'expliquer les résultats obtenus. Premièrement, le volume de phase aqueuse déterminé par les botanistes afin de conserver la plante en santé peut ne pas être suffisant pour éluer les substances adsorbées dans le sol. Selon cette hypothèse, l'affinité des composés pour le sol est très grande. Dans ce cas, la procédure de récupération est déficiente et doit être remplacée par des méthodes alternatives. Deuxièmement, notre procédure d'échantillonnage utilise un sol naturel à l'intérieur duquel les composés à potentiel allélopathique sont métabolisés ou détruits par décomposition bactérienne. Troisièmement, la concentration des composés à potentiel allélopathique émis par la plante est insuffisante.

Dans une autre étude de ce genre², l'auteur utilise un débit continu d'une solution nutritive afin d'accumuler les substances sur sa résine adsorbante. De plus, la plante vit dans un sol artificiel négligeant les interactions entre celui-ci et les composés émis par la plante. Il est certain que cette méthode offre des avantages au point de vue des concentrations attendues mais à l'inconvénient de ne pas recréer totalement le milieu naturel des plantes et de poser des problèmes expérimentaux tel que l'émission de substances liées au stress de la plante².

7.5 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons parcouru la procédure d'échantillonnage à partir de l'élaboration du montage pour la récupération des échantillons jusqu'aux analyses des échantillons recueillis.

Le montage expérimental est développé afin d'éviter tout contact de l'échantillon avec la lumière, la chaleur, l'air ambiant pour éviter sa dégradation. De plus, la procédure de collecte des échantillons évite l'influence des phénomènes aléatoires.

La procédure d'échantillonnage est développée de façon à éliminer la récupération des composés émis à la suite de perturbations du milieu de la plante. De plus, la procédure d'échantillonnage cible la récupération de substances à potentiel allélopathique provenant de plusieurs modes d'émission de substances allélopathiques. Les principaux modes d'émissions des substances à potentiel allélopathique visés sont l'émission par volatilisation, par lessivage de la plante et par exsudation racinaire. On dénombre par contre certains désavantages. Par exemple, les composés doivent être partiellement solubles dans l'eau pour être récupérés en concentration suffisante dans les échantillons.

L'analyse des échantillons recueillis a démontré que les méthodes d'analyses ne permettent pas de détecter des composés à potentiel allélopathique. Des hypothèses ont été posées afin d'expliquer l'absence de composés à potentiel allélopathique. L'hypothèse traitant des propriétés d'absorption du sol sera vérifiée afin d'expliquer l'absence de composés à potentiel allélopathique.

CHAPITRE 8

ÉVALUATION DE LA CAPACITÉ DE RÉCUPÉRATION DE LA PROCÉDURE D'ÉCHANTILLONNAGE

8.1 Introduction

L'évaluation de la capacité de récupération de la procédure d'échantillonnage vient compléter l'étude de l'échantillonnage des substances allélopathiques à partir des eaux de percolation du *Kalmia Angustifolia*. L'évaluation de la procédure d'échantillonnage s'avère nécessaire afin d'expliquer les résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons recueillis avec la procédure d'échantillonnage.

L'évaluation de la procédure d'échantillonnage peut s'effectuer en déterminant la capacité d'adsorption de la terre contenue dans le montage expérimental. Selon les résultats, nous pourrions expliquer l'absence de composés dans les échantillons analysés. Une faible capacité d'adsorption de la terre indique que la concentration des substances dans les échantillons est faible et qu'un volume d'échantillon plus grand est nécessaire. Par contre, une capacité d'adsorption importante indique que la procédure d'échantillonnage n'est pas adéquate et que de nouvelles procédures doivent être développées.

La capacité d'adsorption de la terre peut être évaluée en effectuant un échantillonnage à l'aide d'une reproduction à petite échelle du système d'échantillonnage. La réduction du modèle expérimental permet de diminuer l'ampleur des manipulations à effectuer. La terre contenue dans ce système d'échantillonnage est enrichie avec un mélange de composés de concentration connue. Par la suite, l'échantillonnage est simulé par un

arrosage de la terre. Les eaux de percolation sont recueillies et analysées afin de déterminer la concentration des substances cibles recueillies. De plus, la terre est prélevée et analysée afin de déterminer la concentration des composés cibles adsorbés. Avec ces résultats, la capacité d'adsorption de la terre est évaluée.

L'analyse des eaux de ruissellement obtenues de l'échantillonnage jumelée aux résultats de l'évaluation de la procédure d'échantillonnage permettront de vérifier le potentiel de récupération de la procédure d'échantillonnage. C'est à la lumière de ces travaux que nous pourrons conclure et orienter les travaux futurs dans le but d'étudier les substances allélopathiques émises par les plantes. À l'intérieur de ce chapitre, nous traiterons de la reproduction du système d'échantillonnage, de l'analyse des eaux de percolation, de la méthode d'extraction de terre et de l'analyse de la terre contenue dans le système d'échantillonnage.

8.2 Reproduction du système d'échantillonnage

Le montage de la figure 22 est utilisé dans le but de recréer l'échantillonnage des substances allélopathiques. Ce montage est composé d'une enceinte de verre de 125 mL et d'une union permettant la récolte des eaux de percolation. À l'intérieur de cette enceinte, on retrouve de la laine de verre pour la rétention des grosses particules de terre et une série de filtres permettant la rétention des fines particules de terre. Un volume de 60 mL de terre y est aussi ajouté.

L'enceinte de même que la laine de verre sont silanisées de façon à limiter les interactions des composés avec la surface de silice. La méthode employée est la désactivation au contact d'une solution de 10 % dichlorodiméthylsilane dans l'hexane pendant une période de 60 minutes. Les pièces traitées sont ensuite rincées avec de l'acétone et placées à l'étuve jusqu'à utilisation⁴⁴.

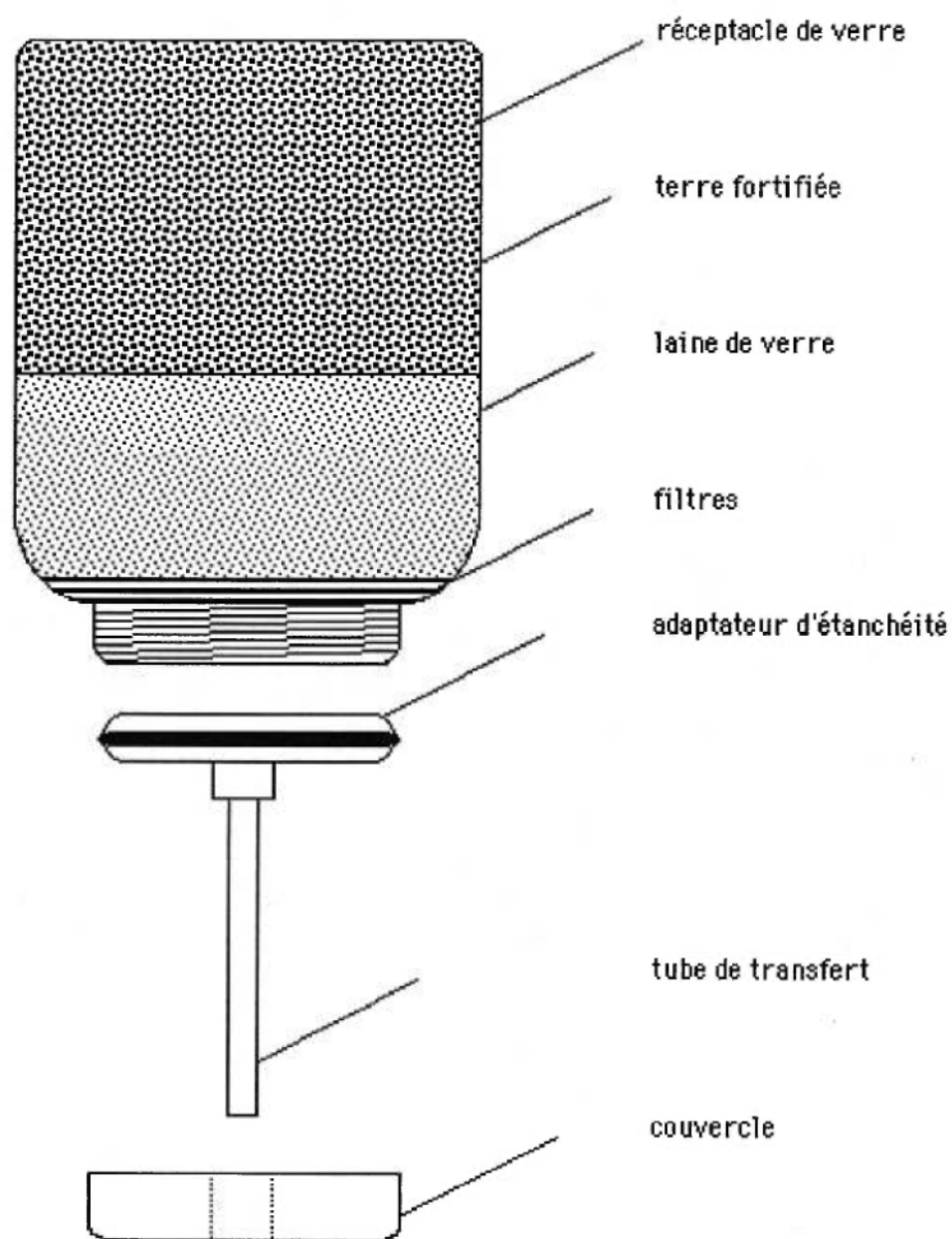


Figure 22: Montage pour la simulation de la récupération des substances alléopathiques

8.3 Simulation de la procédure d'échantillonnage

La simulation de la procédure d'échantillonnage est effectuée de façon à recréer l'arrosage et la récolte des eaux de percolation décrites au chapitre 7 de la présente étude. L'évaluation de la concentration des composés recueillis dans les eaux de percolation versus la concentration des composés retenus dans la terre permettra d'évaluer la capacité de récupération de la procédure d'échantillonnage. Une méthode d'extraction de terre est nécessaire afin d'évaluer la quantité de composés retenus dans la terre. La simulation de la procédure d'échantillonnage s'effectue selon le protocole suivant à l'aide du montage présenté à la figure 22.

1. La terre est arrosée avec de l'eau purifiée à l'aide d'un système Millipore™. Le débit d'arrosage doit permettre la récupération de 0.5 à 1 mL d'eau par minute.
2. L'eau est récupérée par portion de 60 mL dans des contenants différents jusqu'à récupération de l'équivalent de trois volumes d'élution de terre.
3. Chaque volume d'eau de percolation récupéré est extrait.
4. Le volume de terre résultant de la simulation de la procédure d'échantillonnage est récupéré et séché à l'air pendant 5 heures.
5. L'échantillon de terre est extrait.

8.3.1 Préparation de l'échantillon

Un échantillon de terre est nécessaire pour l'optimisation de la méthode d'extraction de terre et pour la simulation de la procédure d'échantillonnage à

l'aide du montage présenté à la figure 22. Pour ces expériences, l'échantillon de terre prélevé sous les lignes de transport d'électricité est préparé de la même façon. Chaque échantillon de 60 ml de terre doit être débarrassé des roches et fibres végétales à l'aide d'un tamis afin d'obtenir une fine poudre du sol à utiliser. La terre est ensuite séchée à l'air pendant 48 heures et stérilisée à 120 °C pendant 30 minutes⁴³. Par la suite, la terre est enrichie avec quelques substances tirées du tableau 1. Au volume de terre formant l'échantillon, on ajoute 100 µL d'une solution d'acétonitrile contenant 50 mg/L de chacun des composés du tableau 20 au moyen d'une seringue. Les substances sélectionnées et énumérées dans le tableau 20 appartiennent à quatre familles de composés répertoriées comme étant les plus susceptibles d'être présentes dans les extraits naturels et de produire des effets allélopathiques^{1,7}.

Tableau 20: Substances sélectionnées pour l'enrichissement des sols

Familles	Substances
acides carboxyliques:	acide p-coumarique acide p-hydroxybenzoïque acide benzoïque
phénol	thymol
lactone	umbelliférone
xanthine	caféine

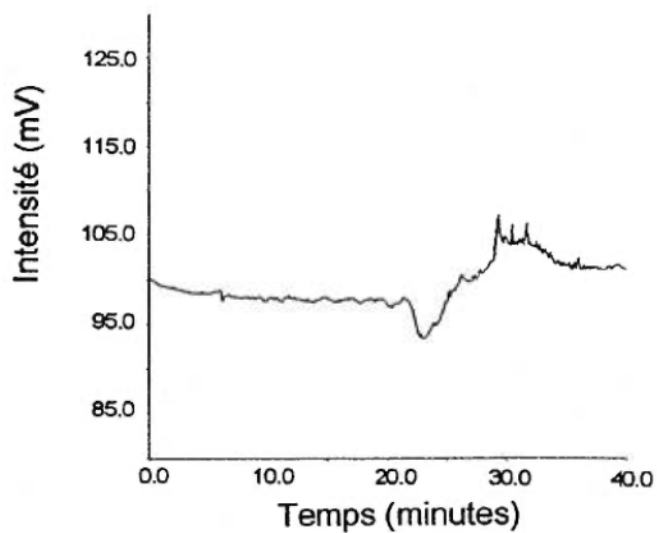
8.3.2 Analyse des eaux de ruissellement du montage expérimental

L'arrosage du sol à la suite de la simulation de la procédure d'échantillonnage donne trois volumes de 60 mL d'eau de percolation. Chaque volume d'eau représente un volume d'élution complet de la terre. L'analyse des eaux de percolation issues de la simulation de la procédure d'échantillonnage donne la concentration des composés élués par volume d'élution de la terre.

Puisque le nombre de substances est limité lors de cette expérience, la méthode analytique utilisée pour l'extraction et l'analyse des extraits est basée sur celle décrite dans le chapitre 5 traitant de la récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillons aqueux. L'extraction des eaux de percolation est effectuée telle que décrite à la section 5.5 du chapitre 5. Avant son insertion dans la procédure de récupération, l'échantillon aqueux est préparé afin d'être compatible avec la méthode analytique employée. La procédure suivie est la filtration de l'échantillon à l'aide d'un système Millipore™ équipé d'un filtre de 45 μm pour éliminer les particules insolubles susceptibles d'obstruer les cartouches d'extraction. Une fois la préparation terminée, les échantillons sont extraits par volume d'élution. Par la suite, les éluats de chaque échantillon sont évaporés et les échantillons sont repris dans 100 μL d'acétonitrile puis analysés par chromatographie en phase liquide.

Deux chromatogrammes sont illustrés sur la figure 23. Premièrement, un chromatogramme représentant un extrait des eaux de percolation d'un échantillon de terre témoin. Deuxièmement, un chromatogramme représentant un extrait des eaux de percolation issues de la simulation du montage expérimental. L'analyse des eaux de percolation ne permet pas d'identifier les substances ayant servi à l'enrichissement du sol, seule la caféine est récupérée à 7% à la suite d'un volume d'élution complet de la terre. Pour obtenir des résultats similaires avec le montage réel, un volume d'échantillon de 18 L serait nécessaire.

A)



B)

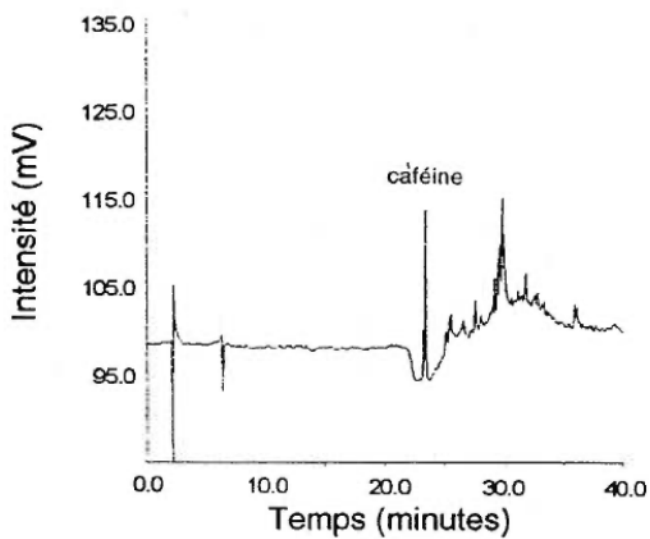


Figure 23: Chromatogrammes en phase liquide représentant l'analyse des eaux de percolation de la simulation du modèle expérimental.

A) Terre témoin B) Terre enrichie

Lors de l'analyse des échantillons issus de la procédure d'échantillonnage au chapitre 7, des hypothèses ont été formulées pour expliquer l'absence de composés dans les échantillons. Une des hypothèses était que le volume d'élution est insuffisant afin de désorber les échantillons de la terre. Lors de la simulation de la procédure d'échantillonnage, un volume d'eau équivalent à trois volumes d'élution de la terre contenue dans l'enceinte est utilisé. L'analyse de l'eau recueillie indique que seule la caféine est détectée. Les échantillons recueillis à partir du montage réel contiennent 250 mL d'eau. Pour le montage réel, un volume de 250 mL d'eau représente seulement 1.5% d'un volume d'élution complet de la terre contenue dans l'enceinte de verre. Il est donc évident, à partir de cette expérience, que les eaux obtenues du Jardin Botanique ne devraient pas contenir de substances à potentiel allélopathique en concentration suffisante. Les substances ne sont pas assez solubles dans l'eau et demeurent adsorbées dans la terre. Il est nécessaire d'extraire la terre contenue dans l'enceinte de verre afin de compléter les analyses sur la simulation de la procédure d'échantillonnage. La détermination de la concentration des composés dans la terre permet de calculer le ratio entre les composés recueillis dans les eaux de percolation et les composés retenus dans le sol. Le ratio obtenu déterminera la constante de partage entre les deux composantes du montage expérimental. Plus la constante de partage est élevée, plus la méthode d'échantillonnage est efficace. Selon les résultats obtenus des extraits de terre, il sera possible de terminer l'évaluation de la procédure d'échantillonnage.

8.3.3 Méthode d'extraction des composés retenus dans la terre

Le développement d'une procédure d'extraction nécessite l'optimisation de plusieurs paramètres tels que le solvant d'extraction et le traitement de l'échantillon. L'extraction d'échantillons de terre est étudiée depuis plusieurs années. Par contre, les études citées dans la littérature ne décrivent pas un

schéma général d'extraction pour un grand nombre de familles de composés^{7,45}. Dans le cas de la présente étude, plusieurs familles de substances sont utilisées. La méthode expérimentale doit donc être flexible afin de permettre l'extraction de plusieurs familles de composés. Whale⁴³ a effectué une recherche globale afin de déterminer les conditions d'extraction pour de nombreuses familles de composés chimiques. Whale a évalué les solvants les plus efficaces pour l'extraction de la majorité des classes de composés et ce pour des extractions au soxhlet, dans un bain ultrasonique et par agitation.

Les solvants utilisés par Whale⁴³ pour effectuer les tests de recouvrement couvrent une vaste gamme de forces éluotropiques et de polarités. Parmi les solvants évalués par Whale, les solvants d'extraction offrant le meilleur compromis pour l'ensemble des composés sont le dichlorométhane et l'acétone. Les recouvrements obtenus à l'aide de ces solvants varient entre 50% pour les amines à plus de 70% pour les cétones, les esters, les phénols et les composés halogénés. Par contre, ces rendements sont obtenus seulement lorsque l'échantillon de terre est combiné à de l'eau afin de pouvoir contrôler le pH de la terre et du même coup favoriser l'extraction des composés. L'extraction d'un échantillon de terre combiné avec de l'eau ajustée à pH 2 donne des recouvrements acceptables pour l'ensemble des composés. D'un autre côté, le recouvrement des phénols et des acides organiques est réduit en milieu alcalin. Selon ces résultats, une extraction en milieu acide pour nos composés est souhaitable. Le milieu acide combiné à un bon solvant d'extraction permet de combattre les interactions polaires et les liens hydrogène entre la terre et les composés. De plus, le milieu acide empêche la dissociation des composés à caractère acide et favorise leur extraction tel que discuté précédemment.

8.3.3.1 Choix du solvant d'extraction

La méthode d'extraction est développée dans le but de vérifier la présence de substances allélopathiques demeurées retenues dans le sol. Pour cette raison, l'élaboration d'une méthode analytique complète pour l'extraction de composés dans les sols n'est pas nécessaire. Le choix des solvants d'extraction est effectué en considérant les résultats obtenus par Whale et les résultats de la méthode de fractionnement chimique à l'aide d'extractions liquide-liquide. Dans le chapitre 6, traitant du fractionnement chimique, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle ont été utilisés comme solvants pour les extractions liquide-liquide des substances allélopathiques. De son côté, Whale obtient de bons résultats d'extraction avec le dichlorométhane et l'acétone qui est un solvant de polarité similaire à l'acétate d'éthyle. La combinaison des résultats des deux études nous incite à développer notre méthode d'extraction en utilisant comme solvant de départ l'acétone ou le dichlorométhane pour les substances du tableau 20.

L'optimisation des solvants d'extraction est effectuée en utilisant des échantillons de terre enrichie avec les substances du tableau 20. Un volume de 10 mL d'eau ajustée à pH 2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique est ajouté à l'échantillon de terre enrichie afin d'en contrôler le pH. L'échantillon de terre enrichie est extrait avec un soxhlet afin de faciliter les manipulations de l'échantillon. L'échantillon de terre est introduit dans le soxhlet dans une cartouche de cellulose perméable aux solvants. L'extraction est effectuée pendant une période de 12 heures à raison de 3 cycles à l'heure pour un total de 36 cycles. Trois tests d'extraction sont effectués. Premièrement, une extraction simple avec de l'acétone. Deuxièmement, une extraction simple avec le dichlorométhane. Finalement, une extraction combinée comportant 36 cycles à l'acétone suivi de 36 cycles au dichlorométhane. Pour chaque extraction, le volume de solvant requis à l'exécution d'un cycle complet est de 250 mL de solvant. À la suite de l'extraction, les solvants sont évaporés à

l'aide d'un évaporateur rotatif. Par contre, la phase aqueuse acheminée avec les solvants au cours des différents cycles de l'extraction ne peut être évaporée. Ce volume d'eau est alors préparé pour être extrait selon la procédure de récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillon aqueux décrite dans le chapitre 5. La préparation de l'échantillon consiste à sa filtration à l'aide d'un système de filtration Millipore™ équipé d'un filtre de 45 µm. La filtration permet d'éliminer les particules insolubles susceptibles d'obstruer les cartouches d'extraction.

L'analyse des échantillons aqueux issus de l'extraction de la terre est effectuée selon la méthode décrite à la page 99. Par contre, les éluats de chaque fraction sont évaporés et les échantillons finaux sont repris dans 100 µL d'acétonitrile pour être analysés par chromatographie en phase liquide selon les conditions décrites dans le tableau 4. Les résultats sont présentés à l'intérieur de la figure 24 où l'on démontre que la combinaison des deux solvants est la plus efficace.

Selon les résultats illustrés sur la figure 24, l'acétone extrait plus facilement les composés ayant des fonctions hydroxyles. L'acétone est un solvant polaire qui permet de combattre les liens hydrogène entre les composés et la terre. D'un autre côté, le dichlorométhane permet d'augmenter le recouvrement des composés ayant des fonctions amines moins solubles dans l'acétone. La combinaison des deux extractions favorise l'extraction de tous les composés. L'extraction combinée est donc la méthode choisie pour effectuer les extractions des échantillons de terre.

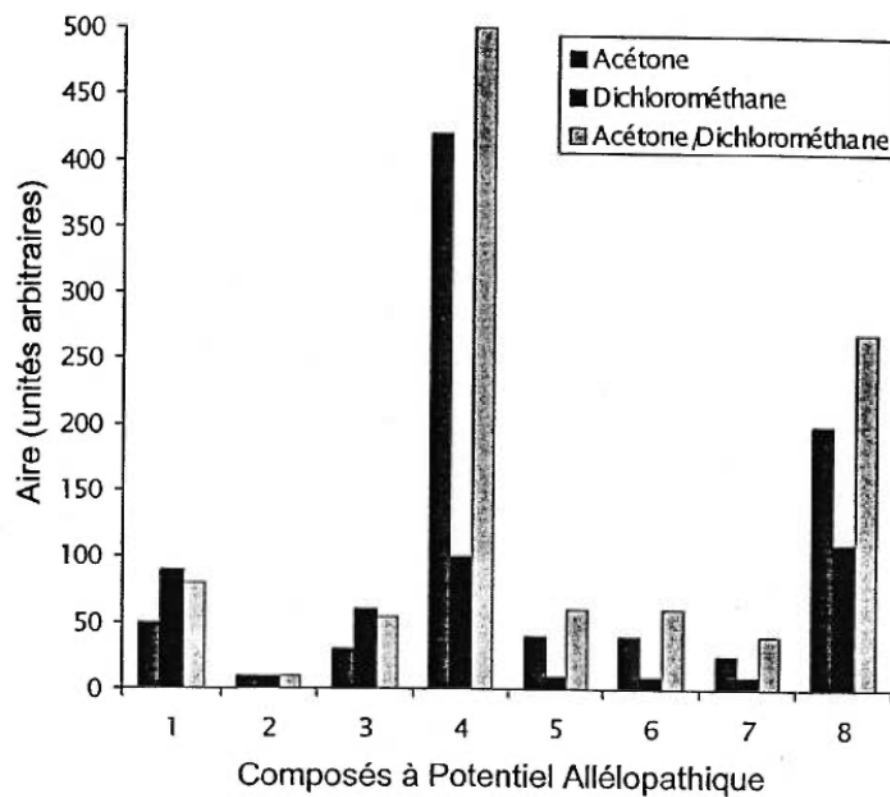


Figure 24: Aire des substances allélopathiques obtenue selon le solvant d'extraction utilisé pour des échantillons de terre enrichie.

1.caféine, 2.thymol, 3.diphénylamine, 4.acide p-hydroxybenzoïque, 5.acide p-coumarique, 6.umbelliférone, 7.acide benzoïque, 8.acide t-cinnamique

8.3.3.2 Évaluation des taux de recouvrement pour l'extraction d'échantillons de terre

Une extraction au soxhlet comportant 36 cycles d'acétone suivie de 36 cycles de dichlorométhane a été effectuée pour un échantillon de terre enrichie avec les composés du tableau 20 préparé tel que décrit à la section 8.3.3.1. L'échantillon aqueux ainsi obtenu, est enrichi avec 100 µL d'une solution contenant 10 mg/L d'acide t-cinnamique et de diphénylamine. Ces composés sont les standards internes. La méthode d'extraction utilisée est décrite à la section 8.3.3.1. Les résultats de cette extraction sont obtenus par chromatographie en phase liquide et sont utilisés pour évaluer l'efficacité des solvants d'extraction pour les composés d'intérêt. Des mesures de taux de recouvrement ont été effectuées en comparant le ratio de l'aire des composés extraits sur le standard interne de l'échantillon enrichi au ratio de l'aire des composés sur le standard interne obtenu d'un mélange étalon de concentration identique. Les résultats sont présentés dans le tableau 21.

Tableau 21: Taux de recouvrement observés pour des substances à potentiel alléopathique enrichies dans un échantillon de terre suite à une extraction au soxhlet avec une combinaison d'acétone et de dichlorométhane.

Composés	% de recouvrement
caféine	61
thymol	56
acide p-hydroxybenzoïque	67
acide p-coumarique	72
umbelliférone	65
acide benzoïque	69

Il est à noter que le rendement moyen que nous avons obtenu oscille autour de 60% tandis que les rendements d'extraction obtenus par Whale dépassent 75 %. Malgré ces faibles taux de recouvrement, les résultats obtenus sont adéquats pour l'évaluation de la procédure d'échantillonnage.

8.3.4 Extraction des échantillons de terre issus de la simulation de la procédure d'échantillonnage

L'extraction des échantillons de terre issus de la simulation de la procédure d'échantillonnage vient terminer l'évaluation de la procédure d'échantillonnage des substances à potentiel allélopathique. Les résultats obtenus de l'extraction des échantillons de terre sont utilisés afin de déterminer la constante de partage entre la concentration des composés recueillis dans la phase aqueuse et la concentration des composés retenus dans la terre.

L'échantillon de terre issu de la simulation de la procédure d'échantillonnage est utilisé. Après la période de séchage (cf section 8.3), l'échantillon de terre est traité et analysé selon la méthode décrite à la section 8.3.3.2. Les résultats obtenus représentent les quantités de substances retenues dans la terre après un arrosage avec un volume d'eau équivalent à trois volumes d'élution de l'échantillon de terre. Des chromatogrammes, résultant de l'analyse des extraits d'échantillons de terre, sont présentés dans les figures 25 et 26. Les résultats représentant le pourcentage des substances retenues dans le sol sont présentés dans le tableau 22.

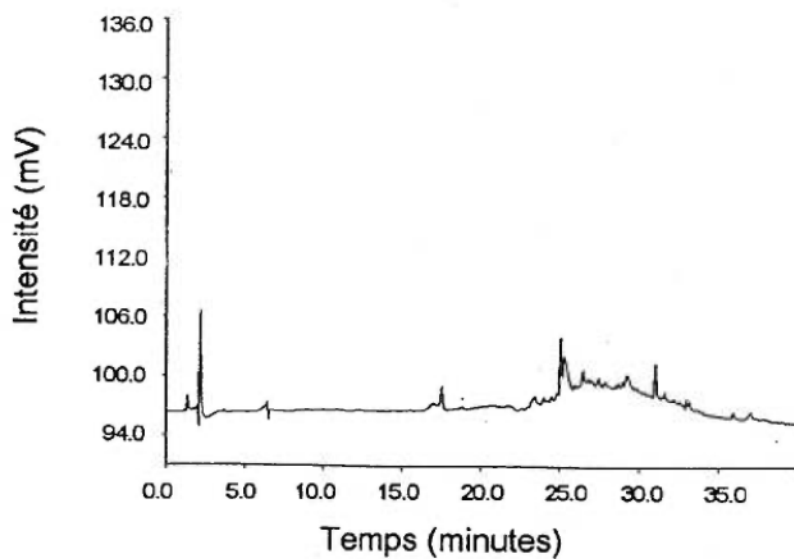
Les chromatogrammes des figures 25 et 26 montrent que nous sommes en mesure d'extraire des composés retenus dans les échantillons de terre après un lessivage de la terre avec un volume d'eau équivalent à trois fois le volume de l'échantillon de terre. De plus, les résultats du tableau 22 montrent que les composés sont retenus dans la terre avec un très haut pourcentage. En

comparant les résultats du tableau 22 avec les résultats du tableau 21, on obtient le pourcentage, corrigé en fonction des rendements d'extraction, des composés retenus dans la terre. Après un arrosage avec un volume équivalent à trois fois le volume d'élution près de 75 % des composés sont toujours présents dans le sol. En transposant ces résultats au montage réel, un volume de 54 litres d'eau ajouté au montage expérimental permettrait de recueillir 20 % des composés contenus dans la terre. Les composés se retrouvent alors dilués dans une grande quantité d'eau. Il est donc évident que les substances recueillies à l'aide de la procédure de récupération actuelle ne sont pas en concentration suffisante et se retrouvent sous les limites de détection de la méthode d'analyse. La constante de partage des substances recueillies entre les eaux de percolation et le sol est très faible. Ce résultat signifie que la procédure d'échantillonnage est inadéquate.

Tableau 22: Pourcentage des substances retenues dans le sol après un arrosage équivalent à trois volumes d'élution de l'échantillon de terre

Substances	Recouvrement (%)
acide p-coumarique	55
acide p-hydroxybenzoïque	59
acide benzoïque	61
thymol	47
umbelliférone	53
caféine	38

A)



B)

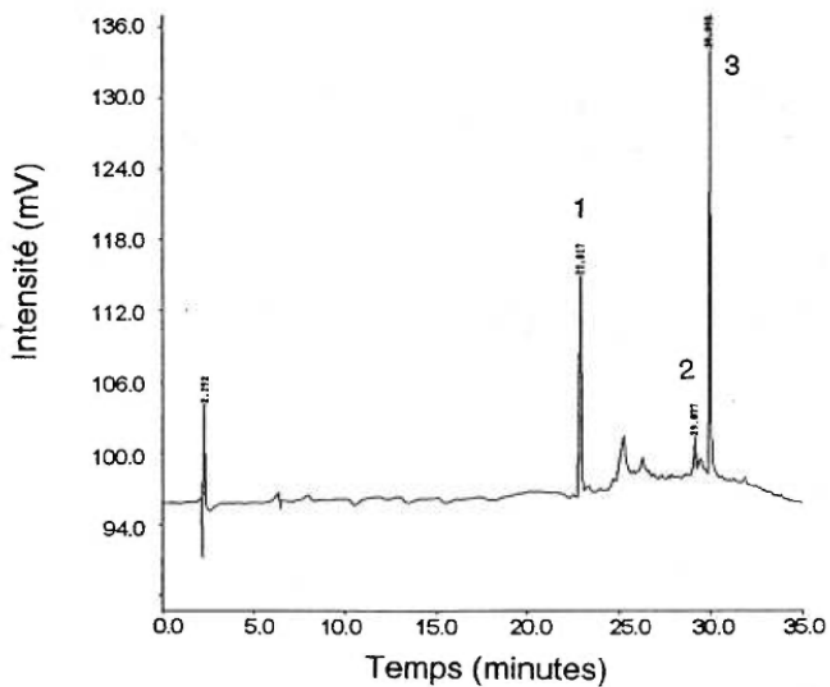


Figure 25: Chromatogrammes en phase liquide représentant des extraits d'échantillons de terre pour la fraction à caractère neutre et basique.

A) Blanc de terre B) Terre enrichie. 1.caféine, 2.thymol, 3.diphénylamine

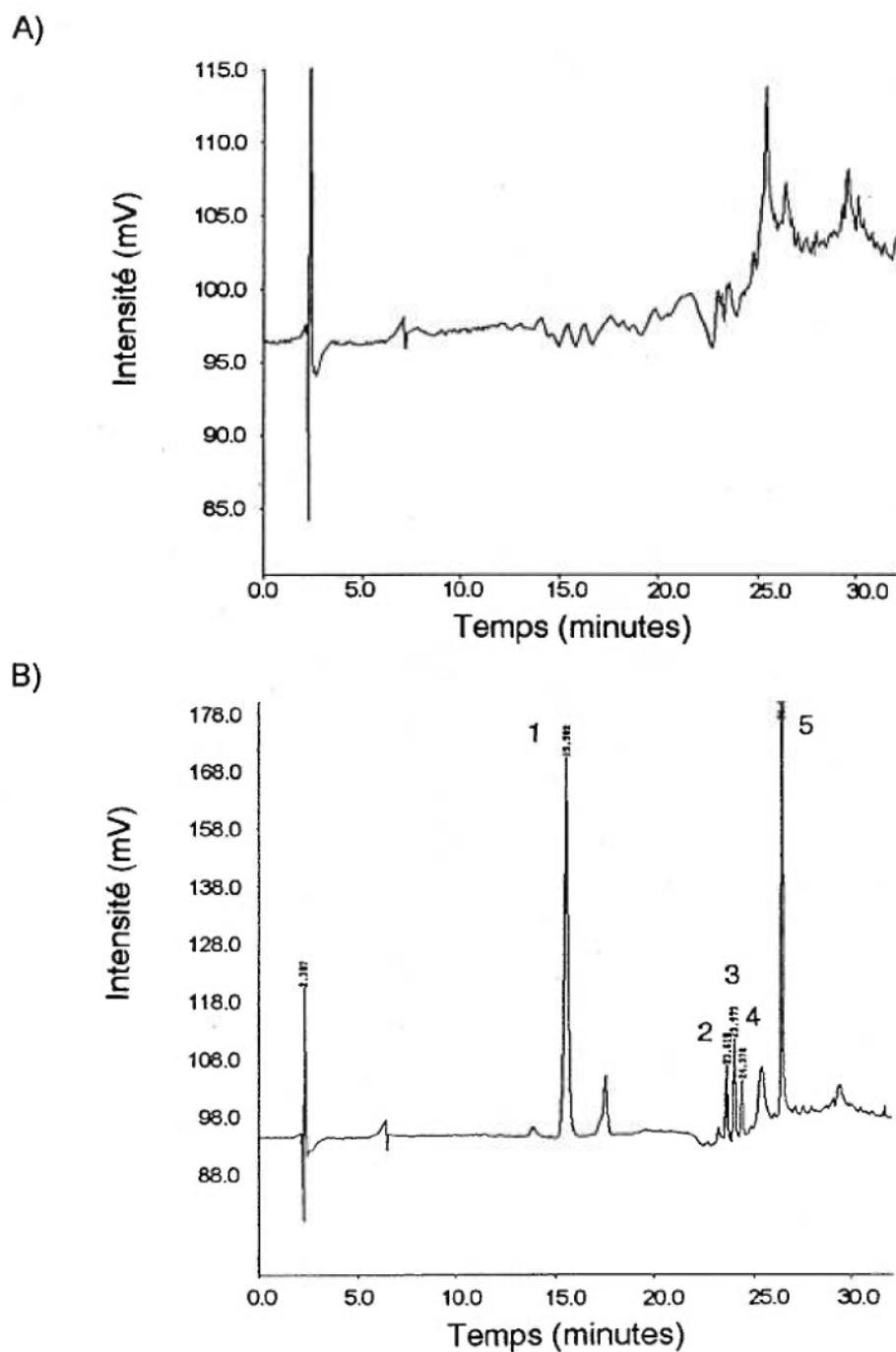


Figure 26: Chromatogrammes en phase liquide représentant des extraits d'échantillons de terre pour la fraction à caractère acide:

A) Blanc de terre B) Terre enrichie.

1.acide p-hydroxybenzoïque, 2.umbelliférone, 3.acide p-coumarique, 4.acide benzoïque, 5.acide t-cinnamique

8.4 Conclusion

Les résultats obtenus de l'analyse des eaux de percolation et des échantillons de terre ont permis de constater que la constante de partage entre les substances recueillies dans les eaux de percolation et les substances retenues dans la terre est très faible. À la lumière des résultats obtenus pour la constante de partage, il est possible d'affirmer que la méthode d'échantillonnage des substances à potentiel allélopathique décrite dans le chapitre 7 n'est pas adéquate. L'eau ne possède pas une force éluotropique suffisante pour entraîner les substances à potentiel allélopathique.

La récupération des substances allélopathiques devra donc s'effectuer sous une autre approche afin de récolter une quantité suffisante de composés à potentiel allélopathique. Les méthodes d'extraction directes semblent appropriées pour l'étude des composés à potentiel allélopathique. Par contre, l'étude de systèmes de récoltes sous conditions contrôlées peut aussi être envisagée. Par exemple, l'utilisation d'une boîte à vapeur afin d'isoler les exsudats racinaire d'une plante tel que suggéré par Clayton et Lamberton².

CHAPITRE 9

CONCLUSION

Dans le cadre de la présente étude, les travaux effectués ont porté sur trois points. Premièrement le développement d'une méthode de récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillons aqueux. Deuxièmement, le développement d'une méthode de fractionnement chimique des échantillons issus des méthodes d'échantillonnage et de la procédure de récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillons aqueux. Troisièmement, le développement d'une procédure d'échantillonnage des eaux de percolation du *Kalmia Angustifolia* et l'évaluation de la méthode d'échantillonnage développée.

La procédure de récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillons aqueux permet de récupérer quantitativement des composés de différentes familles chimiques tout en effectuant une préconcentration des échantillons avant l'analyse. Cette méthode s'applique aux échantillons issus de la procédure d'échantillonnage des eaux de percolation du *Kalmia Angustifolia*. De plus, la procédure de récupération s'applique aux échantillons aqueux issus des autres procédures d'échantillonnage développées dans des études en parallèle. Cette procédure de récupération sera donc utilisée pour l'ensemble des travaux liés à l'étude des substances allélopathiques.

À la procédure de récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillons aqueux peut se jumeler une méthode de fractionnement chimique. La méthode de fractionnement chimique développée permet de distribuer les composés à potentiel allélopathique en quatre fractions afin de

faciliter leur analyse. La méthode de fractionnement chimique combine la récupération et le fractionnement chimique des échantillons aqueux en une seule étape. Les résultats obtenus à partir d'échantillons aqueux enrichis montrent le bon rendement de la procédure de fractionnement chimique. De plus, cette méthode de fractionnement n'est pas limitée aux échantillons aqueux. Les échantillons de solvant organique peuvent être évaporés et repris dans de l'eau afin d'être soumis à la procédure de fractionnement chimique. De cette façon, la procédure de fractionnement chimique peut être utilisée pour d'autres échantillons reliés à l'étude des substances allélopathiques. Par exemple, la procédure de fractionnement pourra être utilisée pour le traitement des échantillons issus des procédures d'échantillonnage obtenus par extraction directe des plantes avec des solvants organiques. Ces procédures sont développées dans une étude en parallèle.

Finalement, la méthode d'échantillonnage des eaux de percolation du *Kalmia Angustifolia* a été développée. Le montage expérimental permettant l'échantillonnage des eaux de percolation et le protocole d'échantillonnage ont été élaborés en portant une attention particulière sur l'isolement de l'échantillon recueilli afin de conserver son intégrité chimique. Les échantillons recueillis à l'aide du montage expérimental pour l'échantillonnage des substances à potentiel allélopathique ont été analysés selon la procédure de récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillons aqueux. Malgré le fait que la méthode de récupération des substances à potentiel allélopathique à partir d'échantillons aqueux donne un bon rendement lors de l'utilisation d'échantillons enrichis, il nous a été impossible de détecter des pics chromatographiques qui auraient pu suggérer la présence de substances à potentiel allélopathique. Dans le but d'expliquer ces résultats, la capacité de récupération de la procédure d'échantillonnage a été évaluée.

Une simulation de la procédure d'échantillonnage à l'aide d'une reproduction à petite échelle (1/300) du montage réel a permis d'évaluer la procédure d'échantillonnage. Un échantillon de terre enrichie avec des substances à potentiel allélopathique a été utilisé dans ce montage. La constante de partage entre la concentration des substances à potentiel allélopathique recueillies dans les eaux de percolation et la concentration des substances retenues dans la terre après arrosage a permis d'évaluer l'efficacité de la procédure d'échantillonnage. Les résultats ont clairement démontré que la force éluotrope de l'eau ne permet pas d'éluer les substances à potentiel allélopathique adsorbées dans la terre.

Les résultats obtenus de la simulation de la procédure d'échantillonnage montrent qu'une autre approche de l'échantillonnage doit être utilisée. Les procédures d'échantillonnage par extraction directe des plantes développées dans une étude en parallèle seront peut-être en mesure de récupérer quantitativement les substances à potentiel allélopathique. Par contre, il est important de développer une méthode d'extraction pour toutes les parties de la plante et de son environnement afin de couvrir tous les modes d'émission des substances allélopathiques.

Les méthodes de récupération et de fractionnement chimique des substances à potentiel allélopathique développées dans la présente étude permettront de traiter les échantillons recueillis par les procédures d'échantillonnage. Des tests d'activités biologiques sur les fractions obtenues du fractionnement chimique permettront d'identifier les fractions contenant des composés actifs et de concentrer les efforts pour l'identification des substances à potentiel allélopathique sur les fractions contenant des composés actifs seulement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rice E.L., Allelopathy, Academic Press Inc., Orlando Florida, 2^{ème} édition, 422 p., 1984
2. Putnam A.L. et Tang C.S., The Science of Allelopathy, Wiley Interscience, New-York, pp.113 à 131, 1986
3. McNeely R.N., Neimans V.P. et L Douyer, Référence sur la Qualité des Eaux, Direction Générale des Eaux Intérieures, Environnement Canada, Ottawa, Canada, .100p, 1980
4. Ramade F., Eléments d'Écologie, McGraw-Hill, Paris, 579p, 1989
5. Mandava, Handbook of Natural Pesticides Methods, Vol. 1, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 161 à 200, 1985
6. Muller C.H., Inhibitory Terpenes Volatilized from Salvia Shrubs, Bull. Torrey Bot. Club, 92, p.38, 1965
7. Muller, W.H. et Muller C.H., Volatile Growth Inhibitors Produced by Salvia Species, Bull. Torrey Bot. Club, 91, p.327, 1984
8. Halligan J.P., Toxic Terpenes from Artemisia California, Ecology, 56, p.999, 1975
9. McCahan C.B., Kelsey R.G., Shéridan P.P. et Shafezodeh F., Physiological Effects of Compounds Extracted from Sajebrush, Bull. Torrey Bot. Club, 100, p.23, 1973

10. Del Moral R. et Muller C.H., Fog Drip: a Mechanism of Toxin Transport from *Eucalyptus Globulus*, *Bull. Torrey Bot. Club*, 96, p.467, 1969
11. Halligan J.P., Toxicity of *Artemisia California* to Four Associated Herbs Species, *Am., Midl., Nat.*, 95, p.406, 1976
12. Chou C.H. et Muller C.H., Allelopathic Mechanism of *Arctostaphylos Glandulosouvar Zacaensis*, *Am., Midl., Nat.*, 88, p.324, 1972
13. Tukey H.B.Jr., Implications of Allelopathy in Agricultural Plant Science, *Bot. Review*, 35, p.1, 1969
14. Tukey H.B.Jr., The Leaking of Substances from Plants, *Ann. Review, Plant Physiol.*, 21, p.305, 1970
15. Woods F. U., Biological Antagonism Due to Phytotoxic Root Exudates, *Bot. Review*, 26, p.546, 1960
16. Rovira A. D., Plant Root Exudates, *Bot. Review*, 35, p.35, 1969
17. Wilson R.E. et Rice E. L., Allelopathy as Expressed by *Helianthus Annuus* et it's Role in Old Field Succession, *Bull. Torrey Bot. Club*, 95, p.432, 1968
18. Tang C.S. et Young C.C., Collection and Identification of Allelopathic Compounds from the Undistributes Root System of *Bigalra Limpogress*, *Plant., Physiol.*, 69, p.155, 1982
19. Chou C.H. et Patrick Z.A., Identification and Phytotoxic Activity of Compounds Produced During Decomposition of Corn and Rye Residues in Soil, *J. Chem. Ecol.*, 2, p.369, 1976

20. Patrick Z. A. et Kock L. W., Inhibition of Respiration, Germination and Growth by Substances Arising During the Decomposition of Certain Plant Residues in the Soil, *Can. J. Bot.*, 36, p.621, 1958
21. Whittaker R.H. et Fenny P.P., Allelochemicals Chemical Interactions Between Species, *Sciences*, 171, p.757, 1971
22. Bell R. G. et Newman K. L., Carbohydrate Analysis of Fermentation Broth by High-Performance Liquid Chromatography Utilizing Solid-Phase Extraction, *Journal of Chromatography*, 632 , p.87, 1993
23. Wiegand H. et Wichtl M., High-performance Liquid Chromatographic Determination of Cardenolides in Digitalis Leaves after Solid-Phase Extraction, *Journal of Chromatography*, 630, p.402, 1993
24. Baltas M., Benbakkar M., Gorrichon L. et Zedde C, Synthesis, Extraction and Determination of Leaf Content in Eucalyptus Grandis, *Journal of Chromatography*, 600, p.323, 1992
25. Zeng L., Zhang R-Y., Meng T. et Lou Z.C., Determination of Nine Flavonoids and Coumarins in Licorice Root by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, 513, p.247, 1990
26. Harmala P. et Vuorela H., Optimization of the High-Performance Liquid Chromatography of Coumarins in Angelica Archangelica with Reference to Molecular Structure, *Journal of Chromatography*, 507, p.367, 1990
27. Bernardi M., Uberti E., Vidari G. et Servettaz O., High-performance Liquid Chromatography of Flavonoid Glycosides from Dryas Octopetala, *Journal of Chromatography*, 284, p.269, 1984

28. Wolfender J.L. et Hostettmann K., Liquid Chromatographic-UV Detection and Liquid Chromatographic-Thermospray Mass Spectrometric Analysis of *Chironia* (Gentianaceae) Species, *Journal of Chromatography*, 647, p.191, 1993
29. Lin Y. Y., Ng K. J. et Yang S., Characterization of Flavonoids by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography*, 629, p.389, 1993
30. Auriola S. et Naaranlahti T., Determination of Caranthus Alkaloids in Plant Cell Cultures by Thermospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, vol 19, p.609, 1990
31. Maillard M. P., Wolfender J-L et Hostettmann K., Use of Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry in Phytochemical Analysis of Crude Plant Extracts, *Journal of Chromatography*, 647, p.147, 1993
32. Wolfender J.L., Maillard M. et Hostettmann K., Liquid Chromatographic-Thermospray Mass Spectrometric Analysis of Crude Plant Extracts Containing Phenolic and Terpene Glycosides, *Journal of Chromatography*, 647, p.183, 1993
33. Maillard M.P. et Hostettmann K., Determination of Saponins in Crude Plant Extracts by Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography*, 647, p.137, 1993
34. GRHSLEM, Le Contrôle Biologique de la Végétation Incompatible sous les Lignes de Transport d'Électricité d'Hydro-Québec, Hydro-Québec, 65p., Juin 1989

35. Pierce A. E., Silylation of Organic Compounds, Pierce Chemical Co., 487p., 1968
36. Knapp D. R., Handbook of Analytical Derivatization Reactions, Wiley Interscience, New-York, 741p., 1979
37. Snyder et Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley Interscience, New-York, p.129, 1979
38. Bertrand M.J., Contrôle Biologique de la Végétation: Développement d'une Méthodologie Analytique pour l'Étude des Substances Allélopathiques Phase III, Université de Montréal, 120p, Janvier 1992
39. D'Amboise M., Chromatographie, Librairie de l'Université de Montréal, Montréal, pp.1 à 95, 1992
40. Simpson N. et Van Horne K.C., Handbook for Sorbent Extraction, Varian Sample Preparation Products, California, 2^{ième} Edition, 138p., 1993
41. Weast R.C., CRC Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press Inc., Boca Raton Florida, 64^{ième} Édition, D-167-168, 1984
42. Christian G.D., Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, New-York, Quatrième Édition, 676p., 1986
43. Whale U. et Al., Methodology for The Exposure Assesment of Soil for Organic Chemicals, Inter. J. Environ. Anal. Chem., 39, p.121, 1990
44. Dumont S. N., Méthodologie Analytique pour l'Analyse d'Amines Aromatiques en Milieux Biologiques et Non-Biologiques par GC-MS, Mémoire de Maîtrise, Dept. de Chimie, Université de Montréal, 140p., 1993

45. Smith A.E., A Review of the Extraction of Herbicide Residues From Aged Saskatchewan Field Soils, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 46, p.111, 1992