

50376
1986
135

50376
1986
135

T H E S E

N° d'ordre 1345

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE

par

Hubert HENN

INTERFERENCES ENTRE HIERACIUM PILOSELLA
ET ARRHENATHERUM ELATIUS SUR LES
TERRILS HOUILLERS DU NORD DE LA FRANCE:
ALLELOPATHIE OU COMPETITION



SOUTENUE LE 26 JUIN 1986 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Président
Rapporteur
Examineur

Ph. VERNET
D. PETIT
P. JACQUART

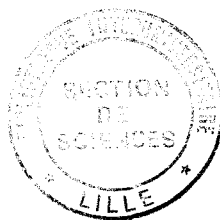
Professeur Lille I
Maître de conférences, Lille I
Directeur de Recherches, Centre
Emberger, Montpellier

Examineur

M. JAY

Maître de conférences, Lyon I

PLAN

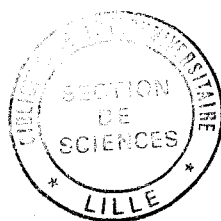


pages

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. GENERALITES	3
I. L'ALLELOPATHIE	3
I.1 DEFINITION	3
I.2 LA REALITE DE L'ALLELOPATHIE	7
I.3 LES TRAVAUX SUR L'ALLELOPATHIE	10
II. LES RECHERCHES SUR LA TELETOTOXICITE DE LA PILOSELLE	12
II.1 LES DIFFERENTS TRAVAUX	12
II.2 DISCUSSION	16
III. LES PLANTES UTILISEES ET LE MILIEU D'ETUDE	18
III.1 <u>ARRHENATHERUM ELATIUS</u>	18
III.2 <u>HIERACIUM PILOSELLA</u>	19
III.3 LE MILIEU D'ETUDE	21
IV. OBJECTIFS DU TRAVAIL ENVISAGE	23
CHAPITRE II. INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE SUR L'ELONGATION RACINAIRE DE L' <u>ARRHENATHERUM ELATIUS</u> ET SUR CELLE DU RADIS	25
I. MATERIELS ET METHODES	25
I.1 LES PLANTES TESTS	26
I.2 LES SOLUTIONS UTILISEES POUR TESTER L'EFFET DE LA PRESSION OSMOTIQUE : NATURE ET MODE DE PREPARATION	26
I.3 LES EXTRAITS AQUEUX DE PILOSELLE ET DE SOL A TESTER: MODE DE PREPARATION.....	27
I.4 METHODE ET MESURE DE LA PRESSION OSMOTIQUE	27
II. RESULTATS	28

II.1 INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE SUR LES PLANTES TESTS.	29
II.2 LA PRESSION OSMOTIQUE DES EXTRAITS AQUEUX DE PILOSELLE ET DE SOLS	33
III. DISCUSSION	33
IV. CONCLUSION	37
CHAPITRE III. LES SUBSTANCES PHYTOTOXIQUES DE LA PILOSELLE VIS A VIS DE L' <u>ARRHENATHERUM ELATIUS</u>	39
I. MATERIELS ET METHODES	40
I.1 LES EXTRAITS AQUEUX DE RACINES DE PILOSELLE	40
I.2 PHYTOTOXICITE DE L'OMBELLIFERONE, DE L'ACIDE CAFEIQUE ET DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE	43
II. RESULTATS	43
II.1 LES EXTRAITS AQUEUX DE PILOSELLE	43
II.2 PHYTOTOXICITE DE L'OMBELLIFERONE, DE L'ACIDE CAFEIQUE ET DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE	53
III. DISCUSSION	53
IV. CONCLUSION	55
CHAPITRE IV. ETUDE DES EXSUDATS RACINAIRES DE <u>HIERACIUM PILOSELLA</u>	57
I. MATERIELS ET METHODES	57
I.1 CULTURE HYDROPONIQUE STERILE DE <u>HIERACIUM PILOSELLA</u>	57
I.2 ANALYSE DE LA SOLUTION DE CULTURE	57
II. RESULTATS	59
II.1 MISE EN EVIDENCE DE SUBSTANCES DE NATURE PHENOLIQUE	59
II.2 DETERMINATION DES COMPOSES PHENOLIQUES PRESENTS DANS LA SOLUTION DE CULTURE	61
II.3 IDENTIFICATION DES SUBSTANCES ISOLEES DE LA SOLUTION CONCENTREE DE CULTURE DE PILOSELLE	67
III. DISCUSSION	69

IV. CONCLUSION	69
CHAPITRE V. LA PHYTOTOXICITE DU SOL SOUS <u>HIERACIUM PILOSELLA</u>	71
I. MATERIELS ET METHODES	71
I.1 TESTS DE PHYTOTOXICITE A PARTIR D'ECHANTILLONS DE SOL	71
I.2 LES EXTRAITS AQUEUX DE SOL SOUS <u>HIERACIUM PILOSELLA</u>	72
II. RESULTATS	73
II.1 EFFET DU SOL DE LA PELOUSE A PILOSELLE SUR LA GERMINATION DE L' <u>ARRHENATHERUM ELATIUS</u>	73
II.2 LES EXTRAITS AQUEUX DE SOL SOUS <u>HIERACIUM PILOSELLA</u>	75
III. DISCUSSION	79
IV. CONCLUSION	81
CHAPITRE VI. CULTURES EXPERIMENTALES DE PILOSELLE ET D' <u>ARRHENATHERUM ELATIUS</u>	83
I. MATERIELS ET METHODES	84
II. RESULTATS	84
II.1 ETUDE DES INTERFERENCES ENTRE LA PILOSELLE ET L' <u>ARRHENATHERUM ELATIUS</u>	84
II.2 CULTURES MIXTES DE PILOSELLE ET D' <u>ARRHENATHERUM ELATIUS</u> ..	87
III. DISCUSSION	88
IV. CONCLUSION	89
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE	91
ANNEXES	95
BIBLIOGRAPHIE	115



INTRODUCTION

La colonisation des pentes des terrils houillers du Nord de la France, par des espèces herbacées, se réalise suivant un schéma précis. Après une phase pionnière fixatrice de la pente, une friche à Arrhenatherum elatius se met en place, puis après un certain nombre d'années celle-ci est remplacée par une pelouse rase à Hieracium pilosella. Pour expliquer cette seconde substitution, Petit (1980) avance diverses hypothèses et évoque la question de la télétoxicité de la piloselle. En effet, Becker et col. (1950, 1951) et Guyot (1957) ont trouvé que la piloselle était télétoxique envers un certain nombre de plantes.

Le but de notre travail a été d'explorer l'hypothèse "télétoxicité" dans cet exemple du remplacement d'une population d'Arrhenatherum elatius par celle de Hieracium pilosella. Nous avons plus particulièrement étudié la potentialité de la piloselle à rejeter dans son environnement des substances inhibitrices pour l'Arrhenatherum elatius sans qu'il y ait intervention d'autres facteurs (la microflore par exemple). Nous avons également élaboré et discuté une méthodologie pour l'étude des phénomènes de télétoxicité ou allélopathie, sujet qui continue à faire l'objet de nombreux travaux et qui est actuellement fortement controversé, en tenant compte des critiques émises sur les travaux existants.

CHAPITRE I

GENERALITES

I.- L'ALLELOPATHIE

Au cours de leur développement, les plantes présentes dans un même habitat interagissent entre elles. Muller (1969) utilise le terme interférence pour désigner ce phénomène [terme déjà utilisé par Harper (1961)].

L'interférence regroupe toutes les interactions possibles pouvant se produire entre les végétaux : compétition, allélopathie, symbiose, parasitisme...

I.1- Définition

De Candolle (1832) fut le premier à émettre l'hypothèse de la phytotoxicité de certaines espèces sur d'autres plantes. Molish (1937) introduisit le terme allélopathie, mot formé à partir du grec "allêlo" (l'un, l'autre: marque de réciprocité) et pathos (souffrir) (in Fischer, 1979), pour désigner toute interaction biochimique, bénéfique ou néfaste, entre plantes (en y incluant les microorganismes). L'allélopathie a été redéfinie ensuite par plusieurs auteurs (Martin et Rademacher 1960, Muller 1970) qui la limitent aux effets néfastes. Cependant, nous préférons prendre l'allélopathie dans son sens le plus large selon la définition de Molish (1937) bien que le mot allélopathie signifie

souffrir (pathos); ce phénomène est alors à diviser en deux catégories pour séparer les effets bénéfiques ou néfastes (figure n°1).

Une distinction essentielle doit être faite : une plante peut influencer sur le développement d'une autre plante par le rejet de substances actives sans l'intervention d'aucun autre facteur, dans ce cas on parle d'allélopathie directe ou d'allélopathie vraie; l'allélopathie indirecte ou allélopathie fonctionnelle (in Hunter, 1980) qualifie les cas dans lesquels il y a intervention d'autres facteurs (figure n°1).

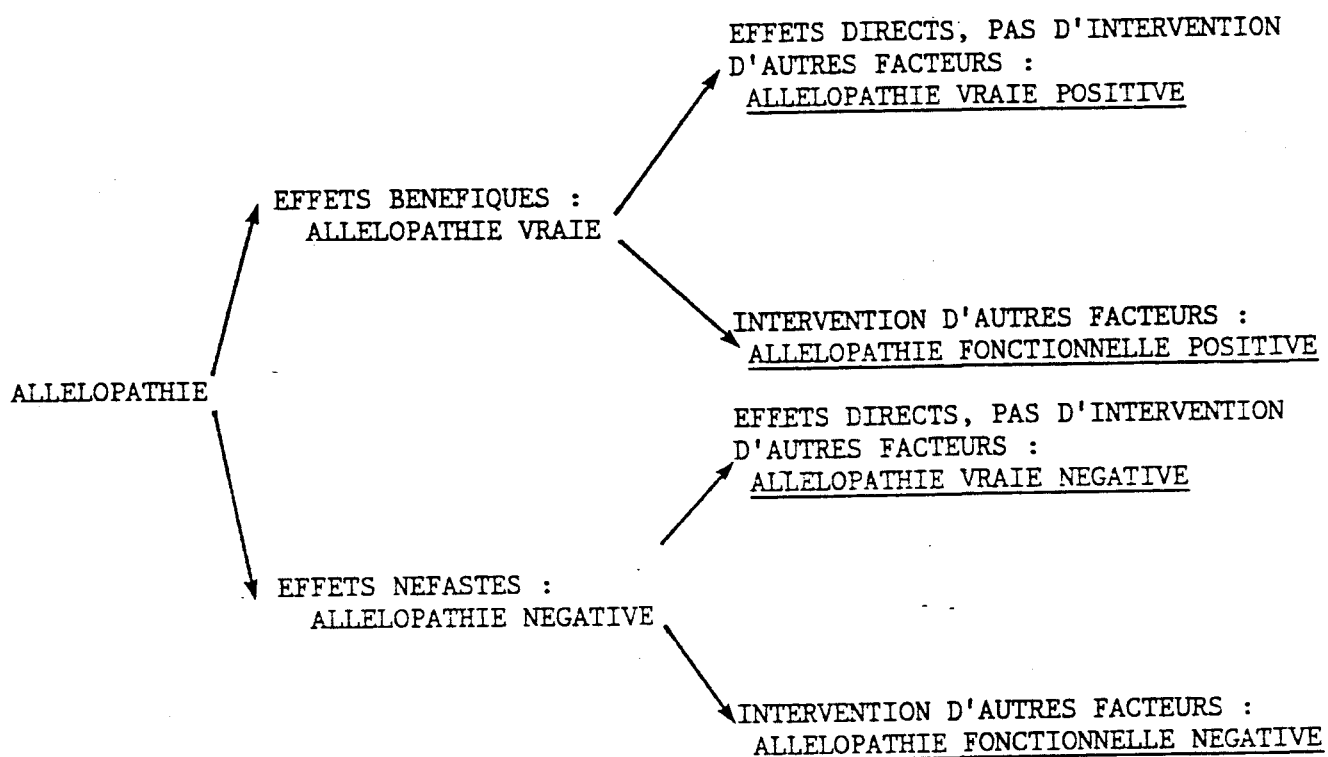


Figure 1 : DIFFERENTS TYPES D'ALLELOPATHIE (in HUNTER, 1980)

Le phénomène allélopathique

Dans ce phénomène, un ou plusieurs métabolites (actifs ou inactifs) de la plante émettrice sont libérés dans le milieu. Rice (1974) décompose la plante en six parties pouvant contenir et libérer ces substances : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs ou inflorescences, les fruits et les graines. Tukey (1971), Rice (1974), Fischer (1979) voient quatre modes d'évacuation des composés (étape 2, figure n°2) : le lessivage, la volatilisation, l'exsudation racinaire et la dégradation du matériel végétal. Dans le milieu les substances doivent être actives et cette activité doit se maintenir (étape 3, figure n°2). Fischer (1979) dans un schéma (figure n°3) illustre bien la complexité du maintien de cet effet dans le sol. Ces substances doivent ensuite aller vers la plante cible (étape 4 de la figure 2, transit par le sol ou passage direct par les parties aériennes) et être en concentration suffisante pour influencer sur le développement de la plante cible.

PLANTE EMETTRICE

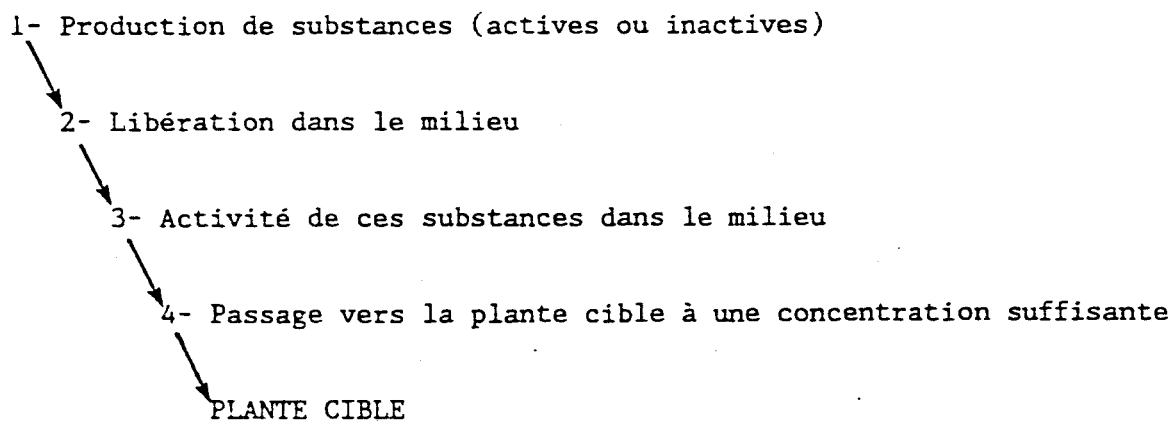


Figure 2 : LE PHENOMENE ALLELOPATHIQUE

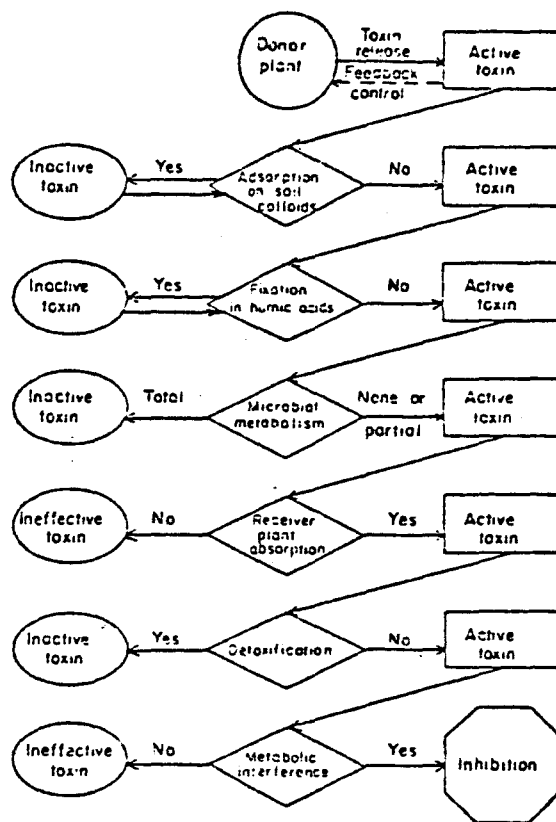


Figure 3 : LE DEVENIR D'UN AGENT ALLELOPATHIQUE DANS L'ENVIRONNEMENT
(in FISCHER, 1979)



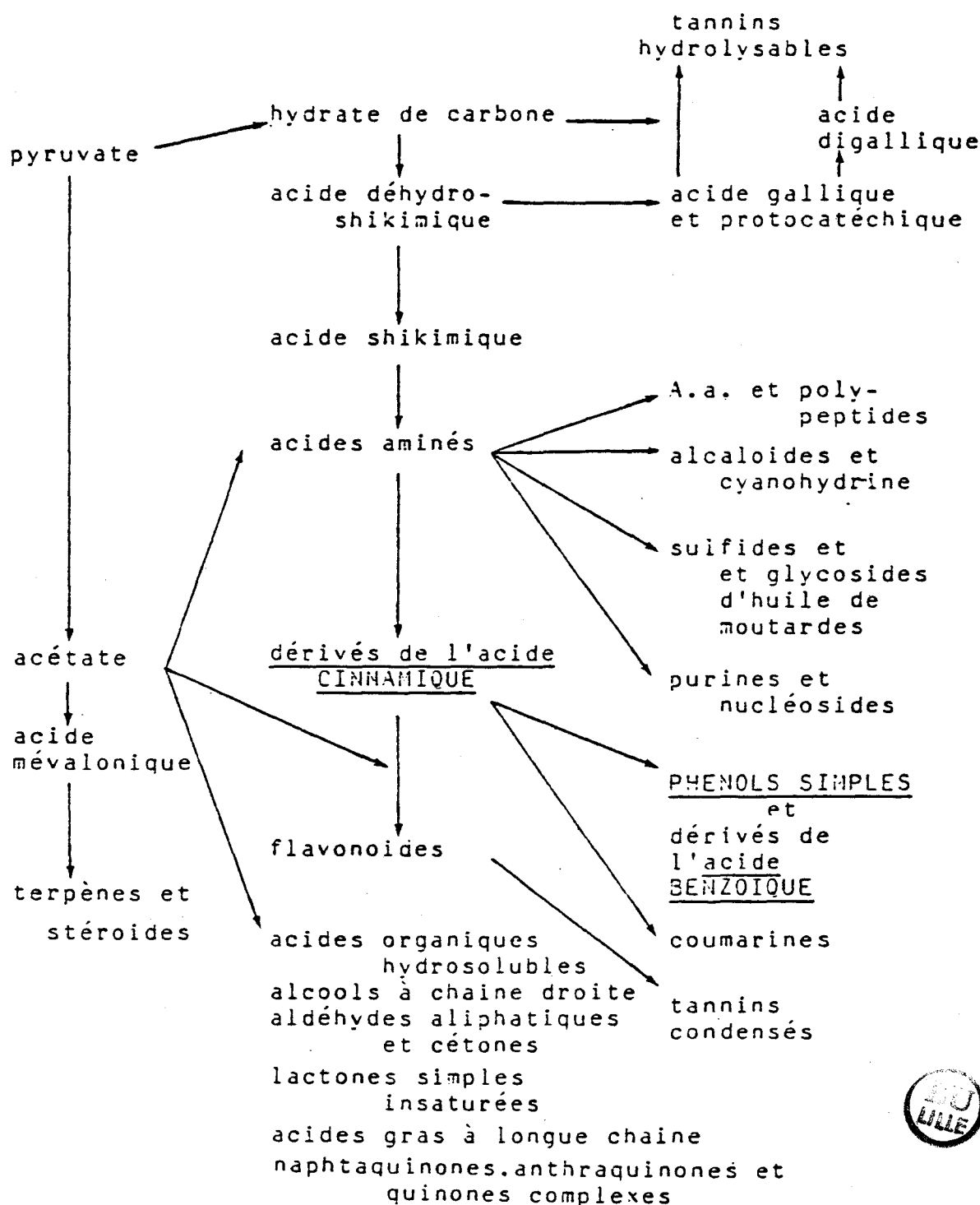


Figure 4 : LES CLASSES DE COMPOSES ALLELOPATHIQUES ET LEURS VOIES PROBABLES DE BIOGENESE (d'après Rice, 1974) In Perradin 1982.

Les plantes annuelles sont habituellement absentes des zones dominées par Salvia leucophylla dans les landes herbeuses californiennes; une aire dénudée (60 à 90 cm) entoure ces arbustes. L'espèce Salvia contient des terpènes. Muller (1965) émet l'hypothèse que ces terpènes sont responsables de ce phénomène. Des essais de toxicité avec Salvia, réalisés sur des plantes trouvées à proximité, montrent qu'un grand nombre de ces espèces sont sensibles; des analyses permettent d'isoler et de caractériser les terpènes. Des échantillons de l'atmosphère prélevés à l'intérieur des buissons de Salvia contiennent des quantités détectables des terpènes les plus toxiques. Ces résultats amènent Muller à proposer que les terpènes sont responsables de la zone dénudée autour de Salvia leucophylla.

Bartholomew (1970) étudie l'influence de l'activité animale sur les zones autour de Salvia leucophylla. Il compte le nombre d'excréments de lapin par unité de surface : les densités les plus fortes sont situées à un mètre des buissons. Bartholomew place des graines de millet dans les zones dénudées et dans la prairie autour de ces zones, 24 heures plus tard 86% des graines placées dans les zones nues ont disparues contre 12% dans la prairie. Suspectant les petits mammifères d'être responsables de ceci, des pièges sont installés dans les deux zones : 28 souris sont capturées dans les zones dénudées contre 1 seule à l'extérieur de ces zones. L'activité animale doit être importante autour des buissons de Salvia leucophylla. Afin de tester le rôle des petits mammifères des parcelles sont isolées par un grillage dans les zones dénudées. Dans certaines parcelles, une ouverture est faite pour laisser entrer les mammifères, elles offrent les mêmes conditions de microclimat que les parcelles complètement fermées et servent de témoin. Bartholomew constate que la végétation se développe uniquement dans les parcelles fermées, les mammifères interviennent

donc dans la composition de la végétation. La zone dénudée apparaît donc être essentiellement, sinon totalement, le fait d'une activité élevée de divers herbivores autour des buissons de Salvia. On peut se demander si l'allélopathie joue un rôle.

De nombreux auteurs comme Miles (1981) reprochent aux recherches existantes de ne réaliser que des essais biologiques in vitro, sans corrélation, ou très peu, avec la croissance des plantes sur le terrain. Affirmer qu'une plante est allélopathique par le seul fait d'isoler une substance toxique à partir d'une plante est insuffisant : on peut extraire de n'importe quel organisme vivant une substance inhibitrice pour une plante.

Dans le cadre d'une allélopathie vraie négative, comme celle qui a été retenue dans le cadre de notre recherche, la plante devrait agir seule. Nous devons donc montrer qu'il existe une substance toxique dans la plante, que cette substance est libérée dans le milieu et qu'elle n'y est pas inactivée. Il est indispensable de démontrer ensuite que sur le terrain cette substance est en concentration suffisante pour agir et jouer un rôle. Il faut aussi replacer l'allélopathie dans le contexte des interférences existantes.

I.3- Les travaux sur l'allélopathie

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'allélopathie (surtout sur les effets négatifs, rarement sur les effets positifs), tenter de les décrire tous est impossible, de même que vouloir établir une classification de ces travaux; mais tous ceux dont nous avons eu connaissance ont un point commun : ils ne prouvent pas de façon claire et indiscutable l'existence de l'allélopathie.

L'obstacle majeur, pour prouver l'existence de ce phénomène, est la difficulté voire l'impossibilité de le séparer des autres interactions, dans la nature. Plusieurs auteurs ont, pour contourner cette difficulté, utilisé des dispositifs expérimentaux "en escaliers" en serre (Walters et Gilmore 1976, Lovett et Kari Jokinen 1984). Ce dispositif, initialement décrit par Börner (1958), est séduisant en théorie : il permet de séparer la compétition et l'allélopathie. Cependant il n'offre aucune relation avec les plantes dans la nature et est critiquable : toutes les plantes ne reçoivent pas la même quantité de lumière, ni la même solution nutritive, des bactéries peuvent se développer dans la solution de culture, quel est leur impact sur les toxines rejetées par les plantes ?

Pour étudier l'allélopathie de 3 variétés de blé, Prasad et Rajeswaru (1981) réalisent des cultures pures et mixtes (binaires) avec ces trois cultivars. Un tel protocole ne permet pas de mettre en évidence l'allélopathie d'une plante vis à vis d'une autre plante mais indique seulement l'existence, dans les conditions expérimentales, d'une interférence entre les deux végétaux étudiés.

Le seigle se développe mal en présence d'Ambrosia psilastachya. Dalrymple et Rogers (1983) supposent l'existence d'un phénomène allélopathique entre ces deux plantes ; ils réalisent des extraits aqueux d'Ambrosia qu'ils testent vis à vis de plusieurs plantes dont le seigle, ces extraits se révèlent être toxiques dans la plupart des cas. Les auteurs concluent à l'allélopathie d'Ambrosia psilastachya. De tels travaux ne permettent pas d'affirmer la réalité de l'allélopathie : un extrait aqueux toxique ne prouve pas qu'une plante soit toxique. Souvent, dans de telles expériences, le phénomène "pression osmotique" des extraits n'est pas pris en compte et peut être responsable de la toxicité constatée.

Tang et Young (1982) isolent, à partir d'une culture expérimentale, des exsudats racinaires de Hemarthria altissima. Ils identifient ensuite dans ces exsudats plusieurs composés qui sont, pour eux, allélopathiques. Des travaux comme celui-ci ne prouvent pas l'allélopathie de certaines substances : dans la nature, dans le sol sous Hemarthria altissima retrouve-t-on ces composés ? sont-ils en concentration suffisante pour agir in situ sur le développement des végétaux présents ?

II.- LES RECHERCHES SUR LA TELETOXICITE DE LA PILOSELLE

II.1- Les différents travaux

Guyot et Massenot (1950) remarquent que, sur les affleurements calcaires de Picardie, les annuelles des jachères et des friches voisines se rencontrent rarement, et de façon très disséminée, dans la pelouse stabilisée à Brachypodium pinnatum qui représente le stade ultime du peuplement des terres incultes. Leurs observations montrent que cette absence n'est pas due à un manque de semences dans le sol : dans des prélèvements de terre, ils identifient de nombreuses plantules dont 57 espèces ne participant pas à la structure floristique normale de la pelouse herbeuse. Ces semences ne germent pas et persistent dans le sol pendant de longues années, vivantes mais inertes.

Becker et al (1950) réalisent des extraits aqueux de terre prélevée dans la pelouse à brachypode, au contact des racines de Brachypodium pinnatum ou des

racines de Hieracium pilosella. Ils testent ensuite la toxicité de ces extraits vis à vis de certaines plantes :

- l'extrait aqueux de terre sous le brachypode ne montre aucune toxicité vis à vis des plantes expérimentées (le pourcentage de germination et la morphologie des plantules ne sont pas altérés). Pour eux, l'absence de thérophytes dans les taches à brachypode de la pelouse est due au recouvrement total du terrain par la graminée s'opposant ainsi au développement d'autres plantes;

- l'extrait aqueux sous la piloselle perturbe la germination des graines et la croissance des plantules, certaines montrent une torsion de la tigelle et une boursouffure du limbe, d'autres sont chétives, la hauteur moyenne des plantules traitées est réduite. Pour eux, l'effet toxique constaté explique la rareté et le rabougrissement de la végétation dans les taches à piloselle de la pelouse malgré sa taille basse et un recouvrement du sol souvent incomplet. Dans un dernier essai, ils comparent la croissance de plantules arrosées avec un extrait aqueux de racines fraîches de piloselle avec celle de plantules arrosées avec de l'eau pure et trouvent une diminution de la hauteur moyenne des plantules traitées.

Becker et Guyot (1951a, 1951b) étudient la toxicité de quinze espèces végétales participant à la structure floristique des divers groupements végétaux des terres incultes vis à vis de la germination et de la croissance d'annuelles (blé, radis, lin, vesce). Pour tester la toxicité, ils arrosent des graines disposées sur du sable ou du papier filtre avec les eaux de lavage des racines, les extraits aqueux de racines séchées ou les extraits de terre. Dans tous les cas, y compris Hieracium pilosella, ils constatent que l'extrait aqueux de racines séchées est le plus toxique et l'eau de lavage la moins toxique. L'effet inhibiteur constaté est d'autant plus marqué que l'extrait est plus concentré. Cet effet varie dans le temps; les maxima sont atteints lors des prélèvements

des mois de printemps et d'été. Ces auteurs constatent par ailleurs dans certains essais un effet stimulant se substituant à l'inhibition observée lors de la dilution des extraits. Cet effet stimulant fréquent dans le cas des labiées (Origanum, Thymus) est rare dans le cas des composés (Hieracium).

Becker et al (1951a) trouvent la piloselle autotoxique. Le pourcentage de germination des graines de Hieracium pilosella est diminué de 24% lorsque celles-ci sont placées au contact de jeunes plantules de piloselle et de 71% lorsqu'elles sont arrosées avec un extrait aqueux de racines fraîches de piloselle. L'élimination de la piloselle au centre des vieilles cuvettes à piloselle est pour eux la conséquence de son autotoxicité.

Becker et al (1951b) sèment des graines de Vicia sativa sur de la terre prélevée au contact des racines de Brachypodium pinnatum à laquelle ils ont incorporé de la poudre de racines séchées de piloselle. Ils constatent une exaltation de l'activité phytopathologique de certains éléments bactériens ou fongiques contenus dans la terre ou apportés par la semence.

Guyot (1959) établit pour quelques plantes un rapport entre la toxicité des eaux de lavage des racines et la richesse des extraits aqueux des organes aériens en substances dissoutes. Les plantes possédant des extraits riches en matières dissoutes ont une aptitude à éliminer par la voie des racines des substances éventuellement phytotoxiques, Hieracium pilosella fait partie de ces plantes.

Widera (1978) dans ses travaux sur la compétition entre Hieracium pilosella et Festuca rubra étudie les effets des extraits de sol de piloselle (extrait à 30%) et des extraits de cette plante (extrait à 4% de plante fraîche) sur la

germination et la croissance des deux plantes; l'auteur conclut que la piloselle est toxique pour Festuca rubra et aussi pour elle-même.

Hieracium pilosella et Hieracium praealtum, introduits en Nouvelle Zélande dans les années 1920, se sont rapidement développés dans les pelouses rases des régions sèches de l'île sud. Dans le but d'expliquer ce développement rapide, Makepeace, Dobson et Scott (1985) ont étudié l'allélopathie et la compétition chez ces deux plantes.

Les extraits aqueux de feuilles mortes non lessivées inhibent la germination du trèfle blanc; cette inhibition diminue lorsque l'on utilise des feuilles lessivées et elle est minimale avec des extraits aqueux de feuilles vivantes. L'acide caféique et l'acide chlorogénique ont été identifiés dans les extraits de feuilles et de racines de Hieracium pilosella et de Hieracium praealtum. L'ombelliférone, identifiée comme le principal agent phytotoxique, a été trouvée uniquement dans les feuilles de piloselle.

La croissance racinaire de Festuca novae-zelandiae, en culture hydroponique, est inhibée en présence d'ombelliférone.

Des mesures, effectuées sur le site de Cave Stream, montrent des différences entre les fétuques et les trèfles des pelouses à piloselle et ceux à l'extérieur de ces pelouses :

- les fétuques sont plus petites dans les pelouses à piloselle et la teneur en azote des feuilles est plus faible;
- la densité, le poids sec, la longueur des racines et le nombre de feuilles des trèfles sont plus faibles dans les pelouses à piloselle.

Les jeunes trèfles sur le terrain et ceux au laboratoire mis en présence d'ombelliférone ou de lessivats de feuilles mortes présentent les memes dommages. Mais il n'a jamais été possible de déceler sur le terrain la présence d'ombelliférone dans le sol.

Dans des séries de remplacements, Hieracium praealtum ne montre aucune supériorité vis à vis des plantes testées, excepté avec le trèfle blanc dans des conditions de faible fertilité du substrat. Hieracium pilosella se montre supérieur à la plupart des plantes testées sauf pour Trifolium hybridum qui domine la piloselle en culture mixte.

II.2 - DISCUSSION

Comme pour les autres travaux sur l'allélopathie, ceux sur la télétoxicité de la piloselle nous suggèrent quelques réflexions.

Becker et al (1950), Widera (1978) utilisent pour démontrer la phytotoxicité de la piloselle des extraits aqueux de terre ou de plante. Dans leurs tests de germination l'influence de la pression osmotique de ces extraits n'est pas étudié, Bell (1974) montre pourtant qu'au delà d'une valeur de 50 milliosmoles les résultats doivent être interprétés avec soin.

Becker et al (1950) notent dans leurs essais de télétoxicité, réalisés en laboratoire, une déformation du limbe et une torsion de la tigelle des plantes testées. Ils ne mentionnent pas si ces observations se retrouvent dans la pelouse à Brachypodium pinnatum.

Becker et Guyot (1951a, 1951b) utilisent le blé, le lin, le radis et la

vesce comme plantes tests dans les essais de toxicité. Les graines dormantes de thérophytes présentes dans la pelouse manifestent-elles les mêmes symptômes que ces plantes ? Les tests auraient dû être faits sur les thérophytes et non sur le blé, le lin, le radis et la vesce.

Petit (1980) constate que dans la pelouse à Hieracium pilosella, la friche se maintient dans les cuvettes mais est inhibée sur les replats où la piloselle s'est installée. Ceci est en désaccord avec Becker qui trouve la végétation rare et chétive à l'intérieur des cuvettes à piloselle.

Les recherches de Becker et col. ne prouvent pas, de façon indiscutable, que la piloselle soit allélopathique pour d'autres plantes. La corrélation entre le laboratoire et le terrain n'est pas étudiée; le sol contient-il ces substances à une dose suffisante pour agir ? Les travaux suggèrent seulement une télétoxicité possible de la piloselle (extraits, de sol et de plante, toxiques).

Makepeace et al (1985) trouvent les extraits de piloselle toxiques pour certaines plantes sans qu'il y ait influence de la pression osmotique. Ce qui confirmerait les travaux de Widera et ceux de Becker et al.

Ces mêmes auteurs constatent sur le terrain que les trèfles présentent des dommages identiques à ceux causés par l'ombelliférone mais ils ne retrouvent pas cette substance dans le sol. Les dommages constatés sont-ils spécifiques de l'ombelliférone ou peuvent-ils être attribués à d'autres facteurs ?

Les mesures effectuées sur le site de Cave Stream suggèrent une interférence, dans les pelouses à piloselle, entre les fétuques, les trèfles et les piloselles. Les auteurs ne précisent pas si les sols des pelouses à

piloselle et ceux à l'extérieur de ces pelouses sont identiques, les différences constatées sur les fétuques et les trèfles pourraient être dues, en totalité ou en partie, à un effet de mosaïque.

Les travaux de Makepeace et col. ne prouvent donc pas d'une façon indiscutable que la piloselle soit allélopathique, in situ, pour les fétuques et les trèfles.

III.- LES PLANTES UTILISEES ET LE MILIEU D'ETUDE

Notre travail a porté sur l'étude de la télétoxicité de la piloselle afin d'expliquer le passage d'une friche haute à Arrhenatherum elatius à une pelouse rase à Hieracium pilosella. Nous avons donc utilisé comme plantes l'Arrhenatherum elatius et Hieracium pilosella.

Les graines de Hieracium pilosella proviennent de la pelouse rase. Celles d'Arrhenatherum elatius ont été récoltées dans la pelouse rase, dans la friche; nous avons même utilisé un lot provenant d'une friche située sur le Campus universitaire (chapitre 2 et 3).

III.1- Arrhenatherum elatius

Le genre Arrhenatherum fait partie de la famille des Poaceae. La flore française possède deux variétés d'Arrhenatherum elatius :

- Arrhenatherum elatius var bulbosum (Willd) Spenner.
- Arrhenatherum elatius var vulgare.

Dans notre travail seule cette seconde variété a été utilisée.

III.2- Hieracium pilosella

C'est une espèce vivace que l'on rencontre dans les pelouses et les prairies sèches, les landes, les friches et les roches à l'affleurement.

Phytochimie de la piloselle

Des composés phénoliques ont été détectés chez Hieracium pilosella (figure n°5). Certains sont connus pour être phytotoxiques.

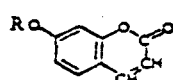
Duquenois et Greib (1953, 1956), Greib (1957) ont isolé de cette plante une substance possédant une activité antibiotique vis à vis de certains Brucella et l'ont identifiée à l'ombelliférone (7-hydrocoumarine). Deux acides phénoliques ont été décelés en même temps : l'acide caféique et l'acide chlorogénique (ou analogue).

Un hétéroside de l'ombelliférone (7-(glucosyloxy)coumarine ou skimmine), localisé en majeure partie dans les feuilles, a été trouvé dans cette plante (Haag-Berrurier, 1958 et 1964). Les organes souterrains en contiennent de faibles quantités. Une variation saisonnière de la teneur en cet hétéroside et en ombelliférone a été montrée par Duquesnois et Haag-Berrurier (1961), le maxima se trouve en septembre et le minima en avril.

Ces mêmes auteurs (1962, 1963) ont décelé dans les fleurs la présence de la lutéoline (3', 4', 5,7 tétrahydroxyflavone) et dans les parties vertes celle d'un hétéroside de cette substance (7-monoglucoside lutéoline).

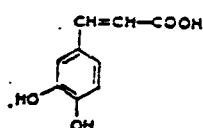
Un hétéroside de l'apigénine, contenant du glucose et de l'arabinose fixés

en position 7, a été trouvé par Haag-Berrurier (1964).

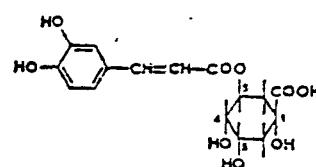


R = H ; ombelliférone

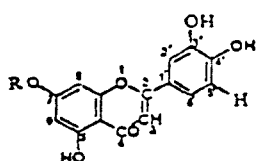
R = glucose ; skimmine



acide caféique

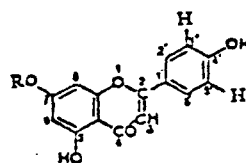


acide chlorogénique



R = H ; lutéoline

R = glucose ; 7-monoglucoside
lutéoline



R = reste osidique (glucose+arabinose) ;
hétéroside de l'apigénine

Figure 5 : LES COMPOSES PHENOLIQUES DE LA PILOSELLE



III.3.1. Les pelouses à Hieracium pilosella

Ces groupements sont caractérisés par leur faible représentation en thérophytes, par contre les hémicryptophytes sont bien développés notamment Hieracium pilosella.

Le déterminisme écologique de ces différents groupements à piloselle est lié aux conditions nutritionnelles, magnésienne et calcique (figure n°6) (Petit, 1977):

- sur substrat acide, pauvre en bases échangeables, se développe le groupement à Hieracium pilosella et Catapodium tenellum;
- sur substrat moins acide et plus riche se rencontre le Hieracium Poetum compressae cerastietosum;
- sur substrat proche de la neutralité s'installe l'Airo-Festucetum pimpinelletosum, l'Airo-Festuceum rumicetum est plus acidophile.

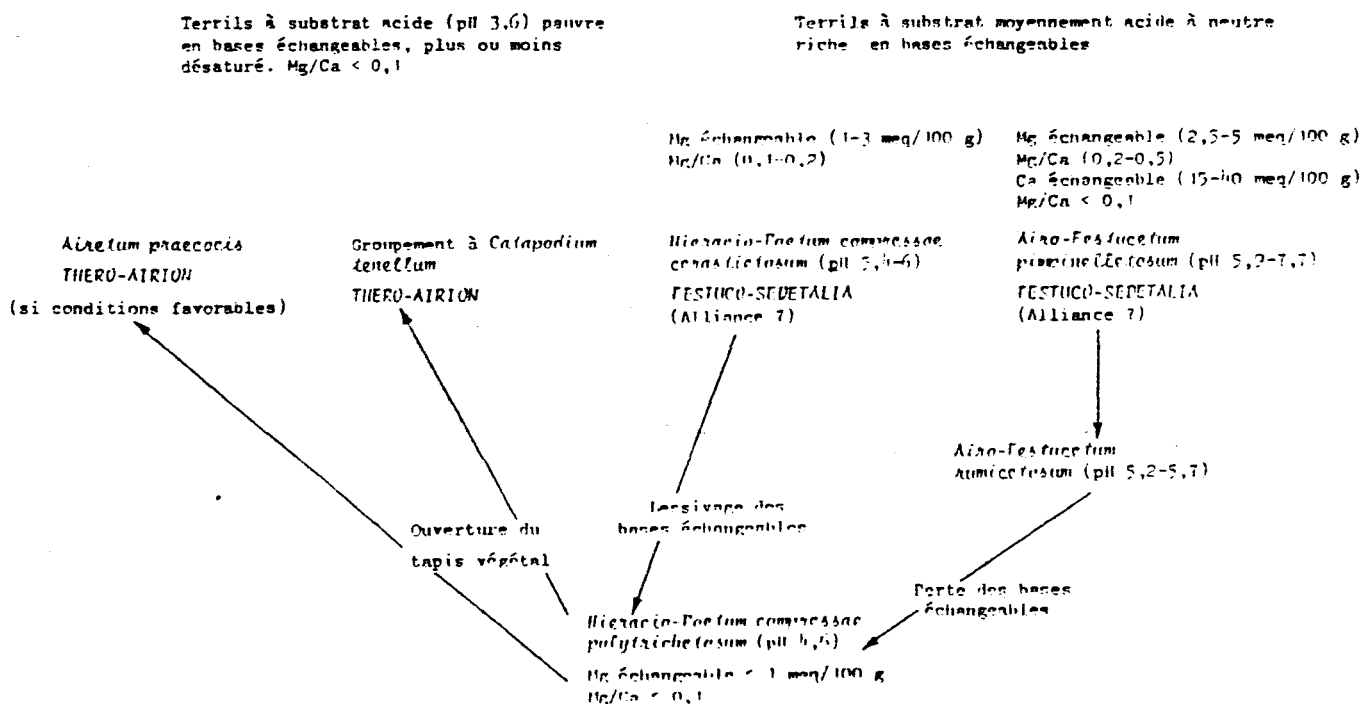


Figure 6 : DETERMINISME ECOLOGIQUE DES GROUPEMENTS DE PELOUSES A Hieracium pilosella SUR LES TERRILS DU NORD DE LA FRANCE (EXTRAIT DE PETIT, 1977).

III.3.2. De la friche à la pelouse rase

Petit (1980) constate qu'au cours de la dynamique de la colonisation des terrils du Nord de la France une friche à Arrhenatherum elatius peut se développer. Certaines de ces friches possédant un environnement favorable (exposition nord, proximité de porte-graines) conduisent à une formation arbustive à Crataegus monogyna, mais la plupart évolue vers une pelouse rase à Hieracium pilosella. Certains facteurs peuvent accélérer le processus (piétinement, présence des lapins, xéricité). Dans la pelouse, la friche se maintient dans les cuvettes et favorise la croissance de l'aubépine (figure 7). L'installation de la pelouse n'est pas sous la seule dépendance de facteurs nutritionnels : sur le terril 31 de Estrée Blanche la pelouse se développe sur un substrat possédant les conditions nutritionnelles de friches élevées d'autres terrils.

Petit (1980), invoquant les travaux de Becker et Guyot sur la télétoxicité de la piloselle, émet l'hypothèse d'un rôle possible de cette dernière dans l'installation de la pelouse.

Développement de fourrés à Crataegus monogyna à la faveur de l'existence d'une végétation en mosaïque : dans les cuvettes la friche à Arrhenatherum elatius se maintient et favorise la croissance de l'aubépine qui est au contraire inhibée sur les replats où la pelouse rase s'est installée.

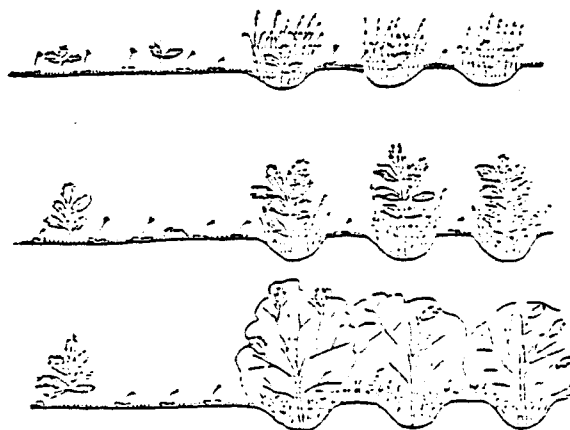


Figure 7 : EXTRAIT DE PETIT (1980)

III.3.3. Le terril de Haveluy

Les récoltes de sols, de plantes et de graines ont été effectuées sur le terril n°157 sis sur le territoire de la commune de Haveluy. Celle-ci est située à l'Est du bassin minier, à 2km au Nord de la ville de Denain. Le terril est conique et boisé en certains endroits (bouleaux et chênes). Le pH du sol varie de 4,5 à 6 et le rapport Mg/Ca de 0,2 à 1,0; la somme des bases échangeables est faible ainsi que le taux de saturation (indices de milieux pauvres).

La pelouse rase peut se présenter sous différentes formes :

- une forme riche en espèces végétales. Le *Sedum acre* est présent dans une pelouse située sur un replat le long de la rampe de chargement (indice de xéricité du milieu);
- le haut du terril est colonisé par une formation pauvre en espèces avec principalement *Hieracium pilosella*, *Polytrichum piliferum* et *Catapodium tenellum*.

IV.- OBJECTIFS DU TRAVAIL ENVISAGE

Le but de notre travail a été abordé dans l'introduction. Il consiste à élucider les questions suivantes :

- l'allélopathie intervient-elle dans l'évolution de la friche à *Arrhenatherum elatius* vers la pelouse rase à *Hieracium pilosella* ?
- la piloselle agit-elle seule (cas de l'allélopathie vraie négative) ?

Dans le cas de l'allélopathie vraie négative, la plante doit contenir une ou des substances toxiques, les rejeter dans l'environnement et ces substances doivent y être actives. Nous avons donc tenté de répondre, dans l'ordre, aux

questions suivantes :

- la piloselle possède-t-elle des substances toxiques ? Compte tenu des techniques à utiliser pour traiter ce point, une étude préalable est indispensable afin de différencier les effets toxiques d'éventuels effets dus à la pression osmotique.

- la plante rejete-t-elle ces substances (l'étude a porté sur les exsudats racinaires)?

- le sol sous la piloselle est-il toxique ? Trouve-t-on les mêmes substances que celles isolées de la plante ?

CHAPITRE II

INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE SUR L'ELONGATION RACINAIRE DE L'ARRHENATHERUM ELATIUS ET SUR CELLE DU RADIS

Dans leurs travaux sur l'allélopathie de Hieracium pilosella, Becker et al n'ont pas vérifié si la pression osmotique des extraits de racines et de sols utilisés intervenait dans l'inhibition de la croissance des plantes testées. Or, postérieurement à leurs études, BELL (1974) montre sur Bromus rigidus qu'au delà d'une valeur de 1,12 atm la pression osmotique réduit la croissance racinaire ; par conséquent, dans l'étude de l'allélopathie, les tests réalisés doivent permettre de séparer les effets inhibiteurs liés à des substances toxiques de ceux résultant d'une pression osmotique élevée. Nous avons donc :

1°) testé l'influence de la pression osmotique sur l'élongation racinaire de Arrhenatherum elatius et du radis (plante test utilisée par Becker et col).

2°) mesuré la pression osmotique des extraits aqueux de piloselle et de sol provenant de la pelouse à piloselle et de la friche à Arrhenatherum elatius afin de vérifier si ceux-ci n'étaient pas inhibiteurs du fait d'une pression osmotique trop élevée.

I.- MATERIELS ET METHODES

I.1.- Les plantes tests

Nous avons utilisé comme plantes tests l'Arrhenatherum elatius et le radis (plante test utilisée par Becker et al). Afin de déterminer la toxicité des solutions retenues, le taux de germination et l'accroissement racinaire au stade plantule (4 à 5 jours) ont été étudiés. Le protocole expérimental est décrit en annexe 1.

Les tests ont été répétés trois fois.

I.2.- Les solutions utilisées pour tester l'effet de la pression osmotique: nature et mode de préparation

Pour les tests sur l'Arrhenatherum elatius, nous avons utilisé 3 types de solutions :

- 5 concentrations en mannitol (100 mM, 80mM, 60mM, 40mM et 20mM) qui correspondent respectivement à des pressions osmotiques de 2,24 atm, 1,792 atm, 1,344 atm, 0,896 atm et 0,448 atm. Nous avons utilisé le mannitol pour étudier l'influence de la pression osmotique car ce composé organique glucidique est une substance inerte qui ne pénètre pas dans la cellule végétale; il ne peut intervenir que par la pression osmotique qu'il crée;

- 4 concentrations en solution trois fois normale de Hoagland (annexe 2), dilution : 0, 1/4, 1/2, 3/4) qui possèdent respectivement des pressions osmotiques de : 1,792 atm, 1,344 atm, 0,896 atm et 0,448 atm;

- 3 concentrations en NaCl (30 mM, 20mM, 10mM) qui ont respectivement des pressions osmotiques de : 1,344 atm, 0,896 atm, 0,448 atm.

La pression osmotique est engendrée suivant les solutions par une substance inerte, par des éléments nutritifs et par une substance supposée toxique. L'effet spécifique de la pression osmotique pourra, par conséquent, être séparé d'autres effets positifs ou négatifs.

Pour le radis, nous avons uniquement testé l'effet pression osmotique en utilisant le mannitol aux concentrations suivantes : 40mM, 80mM, 120mM, 160mM, et

utilisant le mannitol aux concentrations suivantes : 40mM, 80mM, 120mM, 160mM, et 200mM. Elles correspondent respectivement à des pressions osmotiques de : 0,896 atm, 1,792 atm, 2,688 atm et 3,584 atm.

I.3.- Les extraits aqueux de piloselle et de sol à tester : mode de préparation

Dans leurs tests de toxicité, Becker et col utilisent des extraits aqueux de racines de piloselle. Nous avons utilisé dans nos tests des extraits aqueux du même type ainsi que des extraits du mélange rhizome-racine de piloselle ; les pressions osmotiques de ces deux extraits ont donc été évaluées.

I.4.- Méthode et mesure de la pression osmotique

La pression osmotique des solutions tests a été évaluée avec l'osmomètre automatique de Roebling et par la mesure du point de congélation d'une solution.

La pression osmotique des solutions tests a été vérifiée avec l'osmomètre automatique de Roebling.

I.4.1. Mesure de la pression osmotique des extraits avec l'osmomètre automatique de Roebling

Cet appareil ne nous a pas permis de mesurer la pression osmotique des extraits, il n'a jamais affiché de valeurs. Croyant à une défaillance de l'instrument de mesure nous avons essayé un autre appareil de la même marque, les résultats ont été identiques.

Par contre, si les extraits sont portés à ébullition pendant un instant très court, la mesure est ensuite possible.

Remarque :

Dans les solutions chauffées aucun trouble ni précipité n'apparaissent. Afin de visualiser des modifications de substances, des chromatographies sur colonne

d'extraits aqueux de mélange rhizome-racine frais de piloselle, avant et après chauffage, ont été réalisées. Le gel Sephadex LH20 (Pharmacia) a été choisi, il est stable de pH2 à pH10. Ce gel permet une séparation de substances par tamisage moléculaire et absorption, mais il ne peut pas être utilisé avec des gradients de solvants, son volume dépendant de ces derniers. Nous avons utilisé une colonne de diamètre égal à 2,6cm et haute de 33cm, le solvant eau-éthanol (50-50, v-v) à un débit de 42ml par heure. Les substances furent détectées par U.V. (Uvicard 4700, LKB).

I.4.2. Détermination de la pression osmotique par la mesure du point de congélation d'une substance.

Le point de congélation des extraits est mesuré à l'aide d'un cryomètre (thermomètre gradué en 1/50 de degré) et la pression osmotique calculée grâce à la formule suivante :

$$\pi = \frac{22,4 (T_0 - T')}{1,86}$$

T_0 = zéro vrai du thermomètre

T' = point de congélation de la solution

π = pression osmotique de la solution en atmosphère

T_0 et T' = sont exprimés en degré centigrades

Nous avons effectué cinq mesures sur chaque type d'extraits.

II.- RESULTATS

II.1. Influence de la pression osmotique sur les plantes-tests

- l'Arrhenatherum elatius

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°1. La figure n°8 en donne une représentation graphique ; dans celle-ci l'allongement racinaire est exprimé en pourcentage par rapport au témoin "eau distillée" qui représente 100% de croissance racinaire.

Le mannitol n'a aucun effet sur l'élongation racinaire jusqu'à 0,896 atm et l'inhibe significativement (test de Student) à partir de 1,344 atm.

Le NaCl provoque une diminution significative de l'allongement racinaire dès 0,448 atm.

La solution de Hoagland montre un effet intermédiaire. Les dilutions à 0,448 atm et 0,896 atm ont une action semblable : l'élongation racinaire est diminuée dans des proportions proches mais cette diminution n'est pas significative. A partir de 1,344 atm elle le devient et la courbe suit celle du mannitol avec un décalage.

Aucune des solutions testées n'a d'influence sur le nombre de graines germées d'Arrhenatherum elatius (tableau n°1).

- le radis

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°2. La figure n°9 en donne une représentation graphique, celle-ci montre une allure similaire à celle obtenue précédemment sur l'Arrhenatherum elatius avec le test mannitol (figure n°8).

Le mannitol est sans effet sur l'élongation racinaire du radis jusqu'à 1,792 atm et l'inhibe significativement (test de Student) au delà de 2,688 atm.

Les solutions de mannitol testées ne montrent aucune influence sur la germination des graines de radis.

La comparaison des tableaux n°1 et n°2 montre que le radis supporte des pressions osmotiques plus élevées que l'Arrhenatherum elatius : le mannitol est

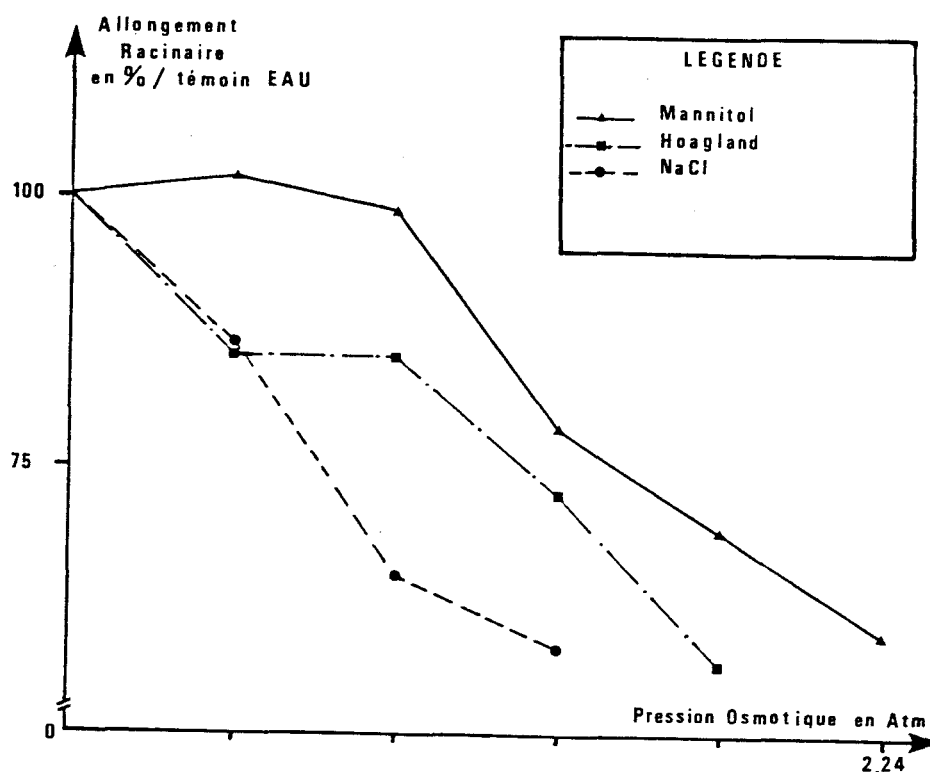


Figure 8 : Influence de la pression osmotique sur l'allongement racinaire de l'*Arrhenatherum elatius*

Pression osmotique en atmosphère	NaCl			Hoagland			Mannitol		
	n	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ
0 (témoin H ₂ O)	28	27,04	4,46	30	36,16	12,25	25	31,80	11,32
0,448	28	23,43*	7,17	30	31,07	11,79	30	32,27	14,95
0,896	27	17,63*	7,74	28	30,78	11,03	25	31,28	8,70
1,344	30	15,80*	6,08	27	26,22*	10,17	25	24,96*	8,97
1,792	--	--	--	28	20,50*	8,30	29	22,00*	9,32
2,240	--	--	--	--	--	--	25	19,00*	9,05

TABEAU 1 : Résultats des tests de pression osmotique sur l'*Arrhenatherum*

n : nombre de graines germées

$\bar{x}$: moyenne de l'élongation racinaire en mm

σ : écart-type

* : au niveau de $\alpha=0,05$ le t (test de Student) observé est supérieur au t théorique, la moyenne est donc différente de celle du témoin



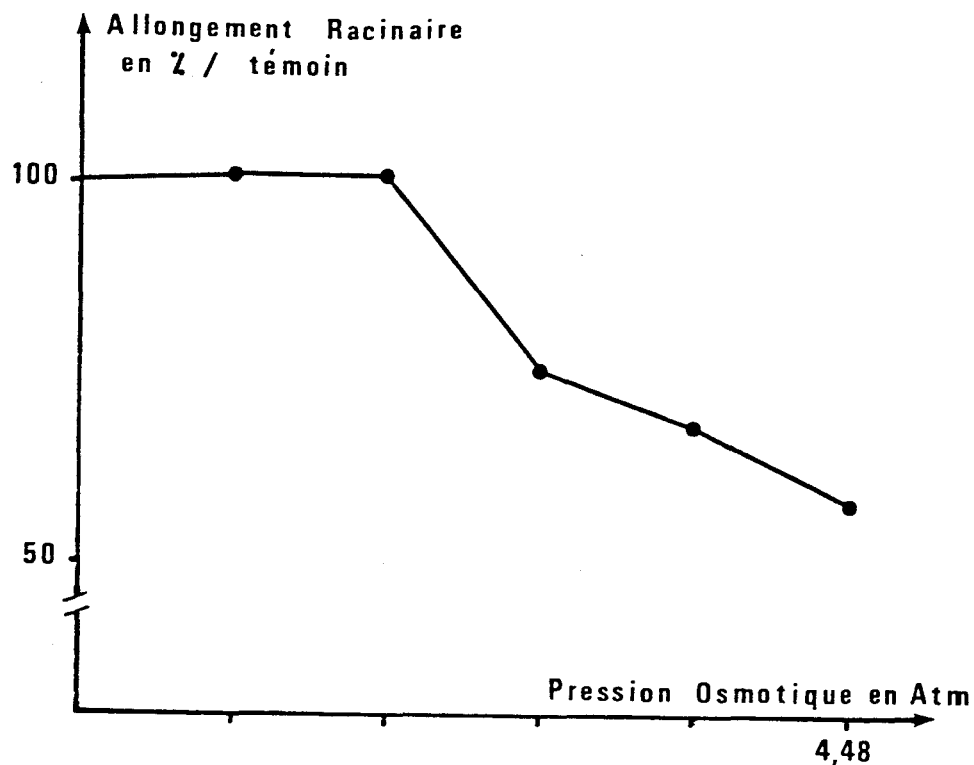


Figure 9 : Influence de la pression osmotique sur l'élongation racinaire du radis

P	0	0,8696	1,792	2,688	3,584	4,48
$\bar{x}$	21,44	21,70	21,63	16,23*	14,60*	12,39*
σ	9,53	11,78	8,68	6,55	5,65	4,69
n	25	25	27	26	25	23

TABEAU 2 : Résultats des tests de pression osmotique sur le radis

P : pression osmotique en atmosphère

$\bar{x}$: moyenne en mm

σ : écart-type

n : nombre de graines germées

* : au niveau de $\alpha=0,05$ le t (test de Student) observé est supérieur au t théorique, la moyenne est donc différente de celle du témoin (P=0).



Tableau 3 : Pression osmotique (en atmosphère) des différents extraits aqueux de piloselle et de sols, évalués par cryométrie et par le milliosmètre de Roebling

EXTRAIT AQUEUX	Point de congélation			Milloosmomètre		
	Valeur moyenne	Valeur extrême	N	Valeur moyenne	Valeur extrême	N
Sol de piloselle	0,3612	0,6021(M) 0,2408(m)	5	0,3808	0,5152(M) 0,2688(m)	5
Sol d' <u>Arrhenatherum</u>	0,2408	0,4817(M) 0,1204(m)	5	0,2016	0,4256(M) 0,1568(m)	5
Racines sèches de piloselle	3,1312*o	3,2516(M) 2,649(m)	5	3,248*o	3,584 (M) 2,912 (m)	5
Racines fraîches de piloselle	1,9269*	2,4986(M) 1,8063(m)	5	1,792*	2,016 (M) 1,7472(m)	5
Rhizome-racine séché de piloselle	3,6125*o	3,8537(M) 3,131 (m)	5	3,4272*o	4,032(M) 3,136 (m)	5
Rhizome-racine frais de piloselle	2,1677*	2,649(M) 1,9269(m)	5	2,307*	2,688(M) 1,904(m)	5

N : nombre de mesures

M : valeur maximale

m : valeur minimale

(*) extrait pour lequel la pression osmotique est inhibitrice de l'Arrhenatherum

(o) : extrait pour lequel la pression osmotique est inhibitrice du radis



sans effet sur le radis jusqu'à 1,792 atm tandis que pour l'Arrhenatherum cette valeur est de 0,896 atm.

II.2. La pression osmotique des extraits aqueux de piloselle et de sols

Les résultats sont résumés dans le tableau n°3.

La pression osmotique des extraits de sols est très faible; elle ne peut pas intervenir dans des tests de toxicité réalisés avec ces extraits.

Par contre, la pression osmotique des extraits aqueux de piloselle est nettement plus élevée; il n'est pas possible de réaliser des tests de toxicité sur l'Arrhenatherum avec ces solutions, les pressions osmotiques élevées (supérieures à 1,792 atm) pourraient expliquer à elles seules l'inhibition de croissance racinaire.

Les figures n°10 et n°11 montrent respectivement les chromatogrammes obtenus avec des extraits du mélange rhizome-racine frais de piloselle non chauffés et chauffés.

La solution non chauffée présente deux pics (A et B), par contre le pic B a disparu dans la solution chauffée tandis que la taille du pic A a augmenté. Il y a donc eu transformation d'une substance en une autre lors du chauffage.

La mesure de la pression osmotique avec le milliosmomètre de Roelling est possible quand le pic B est absent, ce pic semble donc responsable de la non intégration des mesures par l'appareil. Quant à savoir pourquoi l'appareil n'intègre pas les mesures, nous n'avons, à ce sujet, aucune réponse.

III. DISCUSSION

Les résultats obtenus sur l'influence de la pression osmotique sur

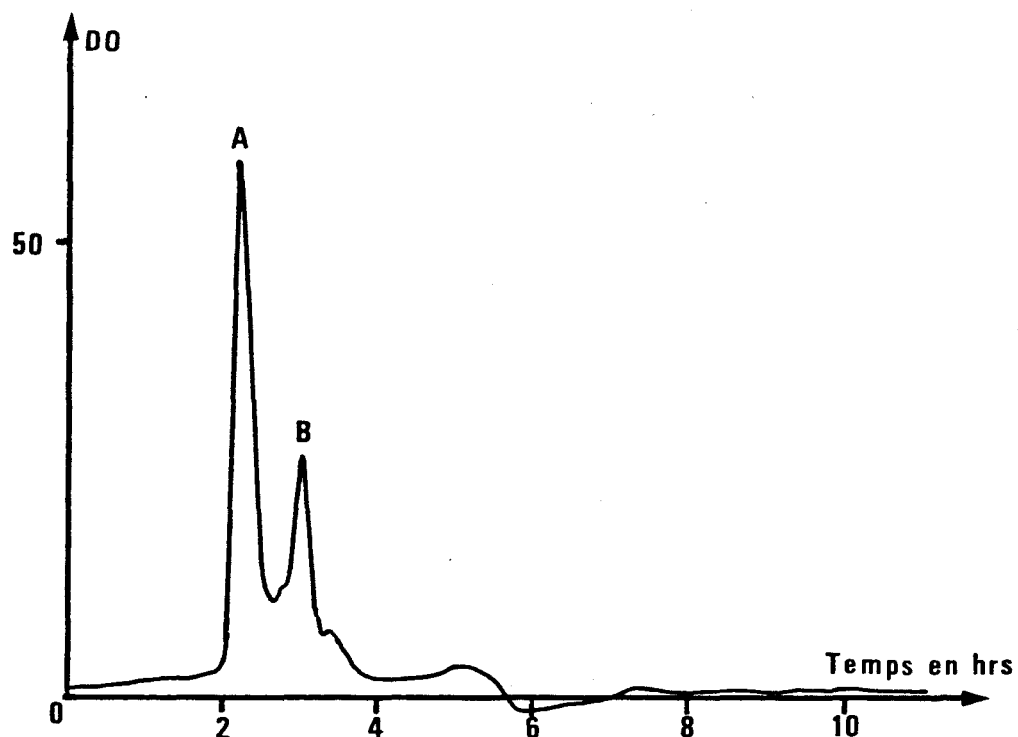


Figure 10 : Chromatographie sur colonne (gel LH 20) de la solution aqueuse du mélange racine-rhizome de piloselle non chauffée

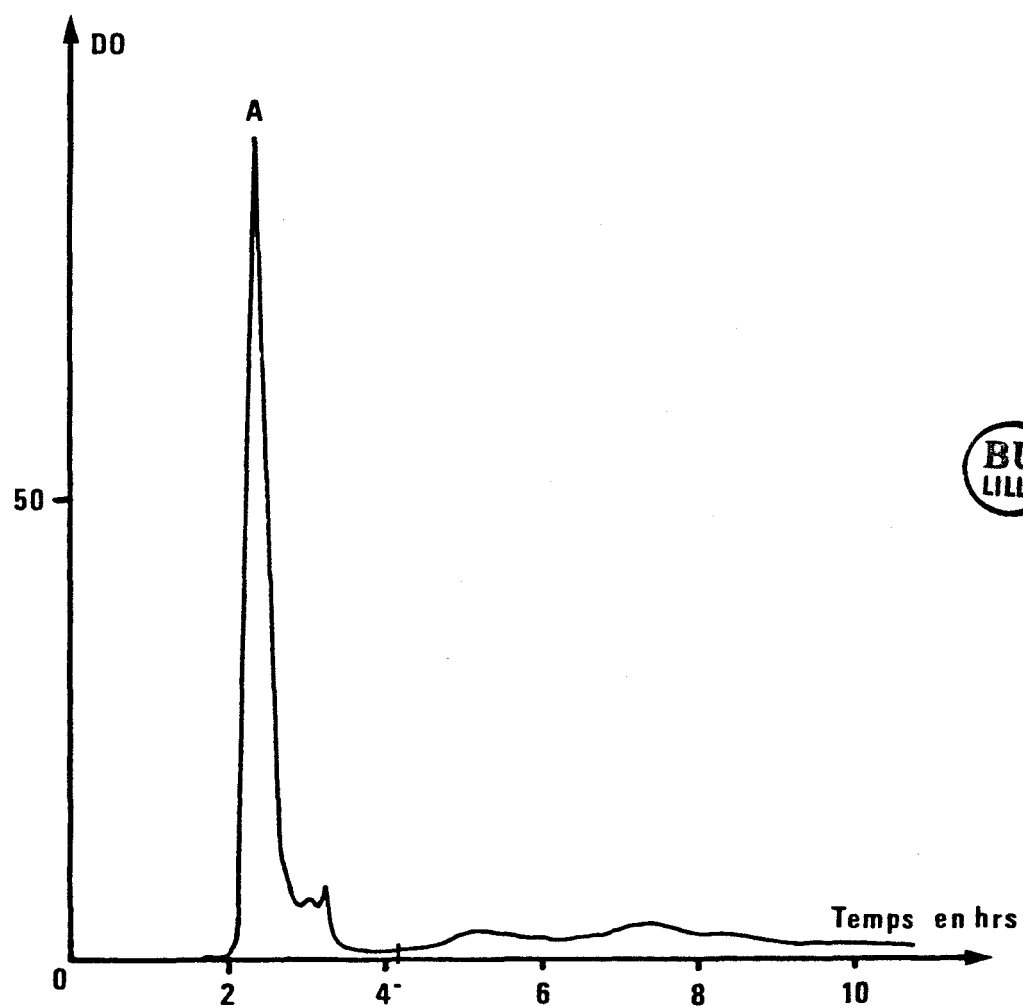


Figure 11 : Chromatographie sur colonne (gel LH 20) de la solution aqueuse du mélange racine-rhizome de piloselle chauffée



l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum sont en accord avec ceux de Bell (1974) obtenus avec Bromus rigidus, cet auteur conclut :

- l'élongation racinaire est inversement proportionnelle à la pression osmotique,

- au delà de 50 milliosmoles (1,12 atm), la pression osmotique peut interférer avec la croissance ; les résultats doivent être interprétés avec soin,

- au dessus de 75 milliosmoles (1,68 atm), l'élongation racinaire est significativement inhibée.

L'effet pression osmotique a été apprécié par rapport au mannitol ; son effet toxique, dépressif sur la croissance est net à partir de 1,34 atmosphère. La réduction de croissance observée avec NaCl dès 0,44 atm est, par conséquent, attribuable à la toxicité du NaCl.

On peut aussi remarquer que les éléments nutritifs de la solution de Hoagland n'atténuent pas l'effet de la pression osmotique : elle est également toxique à partir de 1,34 atm.

Le radis se montre plus tolérant que l'Arrhenatherum vis à vis de la pression osmotique. Les pressions osmotiques que nous avons mesurées sur des solutions de racines de piloselle fraîches et séchées sont respectivement de 1,9269 atm et de 3,1312 atm. Pour tester l'effet toxique d'extraits de piloselle sur le blé, le lin, le radis et la vesce, Becker et Guyot (1951a) ont utilisé des solutions de racines quatre fois plus concentrées. Selon nos estimations ci-dessus la pression osmotique de leurs extraits devrait atteindre une valeur d'environ 7,7 atm, cette pression est fortement inhibitrice de l'élongation racinaire du radis. Cette constatation nous amène à supposer que la toxicité des extraits de Becker et al pourrait être en partie ou en totalité due à la pression osmotique.

Dans un autre essai, Becker et Guyot (1951b) ont utilisé des extraits de

Tableau 4 : Résultats des tests de toxicité de Becker et Guyot et estimation à l'aide de nos résultats des pressions osmotiques d'après les données expérimentales de Becker et Guyot.

RACINES	fraîches	séchées		
		1/4	1/20	1/40
Concentration des extraits en g/cm ³ d'eau	1/2,5	1/4	1/20	1/40
Indice moyen de croissance (témoin = 100)	82	6	76	121
Pression osmotique estimée en atm	3,083	4,5156	0,9031	0,4516



racines fraîches et séchées, leurs résultats sont résumés dans le tableau n°4. L'effet inhibiteur des solutions ne présente pas de relation linéaire avec la pression osmotique estimée de leurs extraits. Néanmoins, la réduction de croissance faible (concentration 1/2,5) et forte (concentration 1/4) pourrait être attribuée à la pression osmotique. Seule une expérience (concentration 1/20) pourrait indiquer une phytotoxicité de l'extrait aqueux de racines de piloselle (inhibition de 24%), mais le degré de signification statistique de cet écart par rapport à l'indice 100 du témoin n'est pas précisé.

Les résultats que nous avons obtenus avec les extraits du mélange rhizome-racine de piloselle aboutissent aux mêmes conclusions que précédemment.

Pour les extraits de sols nos résultats, bien qu'obtenus sur du matériel d'origine différente de celui de Becker et al (chapitre I), ne laissent pas supposer l'influence de la pression osmotique, ce qui n'infirme pas la phytotoxicité possible des extraits utilisés.

IV. CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus montrent combien il est important d'estimer le facteur pression osmotique dans les extraits aqueux de plantes et sols utilisés dans les tests de toxicité, et de prendre en compte la sensibilité de la plante testée vis à vis de ce facteur.

Dans les expériences menées par Becker et al :

- pour la plupart des extraits de piloselle la pression osmotique pourrait être le seul facteur inhibiteur (excepté peut-être l'extrait 1:20 ; Becker et Guyot, 1951b)

- la toxicité des extraits de sol, par contre, devrait avoir une autre origine que la pression osmotique. Seuls ces résultats sont en faveur de la

toxicité possible des extraits utilisés. Cependant, il est difficile de parler de phytotoxicité uniquement à partir d'extrait de sol.

Dans les tests de toxicité sur l'Arrhenatherum elatius, afin d'éliminer l'influence de la pression osmotique, les extraits à tester devront être préparés de manière à ce que leur pression osmotique soit inférieure à 1,34 atm.

CHAPITRE III

LES SUBSTANCES PHYTOTOXIQUES DE LA PILOSELLE VIS A VIS DE

L'ARRHENATHERUM ELATIUS

D'une part, sur l'ensemble des expériences réalisées par Becker et al une seule pourrait indiquer une phytotoxicité d'un des extraits aqueux de piloselle vis à vis du radis (chapitre II). Des extraits aqueux de piloselle ont-ils une action inhibitrice sur le développement de l'Arrhenatherum elatius ?

D'autre part, il a été montré que l'ombelliférone (Goodwin et Taves, 1950), l'acide caféique (Evenari, 1949) et l'acide chlorogénique (Rice, 1969), présents dans les organes aériens et souterrains de la piloselle, sont des substances phytotoxiques vis à vis de certaines espèces. Ces composés sont-ils toxiques pour l'Arrhenatherum elatius ? Interviennent-ils dans la toxicité des extraits aqueux de piloselle ?

Nous avons donc dans ce chapitre :

(a) étudié la phytotoxicité des extraits aqueux de racine ainsi que celle du mélange rhizome-racine de piloselle vis à vis du développement de l'Arrhenatherum elatius,

(b) déterminé l'influence de l'ombelliférone, de l'acide caféique et de l'acide chlorogénique vis à vis de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum

elatus.

I.- MATERIELS ET METHODES

I.1.- Les extraits aqueux de racines de piloselle

I.1.1. La toxicité des extraits aqueux de piloselle

Les extraits aqueux de piloselle, utilisés dans les tests de toxicité, ont été obtenus suivant le protocole décrit dans l'annexe 4. Deux types d'extraits ont été réalisés : les uns à partir de racines seules, les autres à partir d'un mélange racine - rhizome. Les dilutions ont été réalisées de façon à ce que la pression osmotique ne limite pas la croissance racinaire ; une vérification en a été faite en mesurant la pression osmotique par la méthode du point de congélation.

I.1.2. Tests de toxicité

La toxicité de ces extraits aqueux de piloselle a été testée suivant le protocole décrit en annexe 1.

I.1.3. Mise en évidence des composés phénoliques dans les extraits de piloselle.

- spectre U.V.

Les composés phénoliques montrent une absorption, entre 200nm et 400nm, due aux conjugaisons des doubles liaisons du noyau benzénique. Des spectres U.V., entre 200 et 400nm, ont donc été réalisés sur une partie aliquote de l'extrait aqueux du mélange racine-rhizome de piloselle afin de visualiser la présence de ces composés.

- dosage des composés phénoliques (annexe 5)

I.1.4. Isolement des substances toxiques

I.1.4.1. Fractionnement de l'extrait aqueux du mélange racine-rhizome de piloselle (annexe 6)

L'extrait aqueux de ce mélange est affronté dans une ampoule à décanter avec de l'éther de pétrole (élimination des substances de nature lipidique et des pigments) puis avec des solvants de polarité croissante (chloroforme et éthyl acétate) afin de le fractionner. Des tests de toxicité sont réalisés avec chacune des fractions obtenues afin de déterminer dans quelles fractions se trouvent des substances toxiques.

I.1.4.2 Isolement des substances inhibitrices de la fraction toxique (annexe 7)

- chromatographie sur colonne

Plusieurs essais de fractionnement de la fraction toxique ont été réalisés par chromatographie sur papier Whatman n°3, sur plaque de cellulose et de silice. La résolution n'étant pas satisfaisante nous avons préféré recourir à la méthode suivante : la fraction toxique est évaporée à l'évaporateur sous vide (Température = 35°C) puis elle est reprise par 4ml d'éthanol à 95°C. L'ensemble est laissé au repos une nuit à 5°C. Une partie non soluble cristallise au fond du récipient, la phase éthanolique est prélevée puis la partie cristallisée (symbolisée NS : non soluble) est alors dissoute dans du chloroforme.

Une première séparation des substances présentes dans la solution éthanolique a été effectuée par chromatographie sur colonne.

- chromatographie sur couche mince

Des chromatographies bidimensionnelles sur cellulose de la fraction toxique, obtenue par chromatographie sur LH20, ont été réalisées dans les conditions décrites dans l'annexe 7.

Après chromatographie préparative de la fraction toxique (LH20) sur cellulose dans le solvant acide acétique à 15%, les bandes correspondant aux deux composés ont été repérées en U.V. et reprises dans du chloroforme. Des tests de

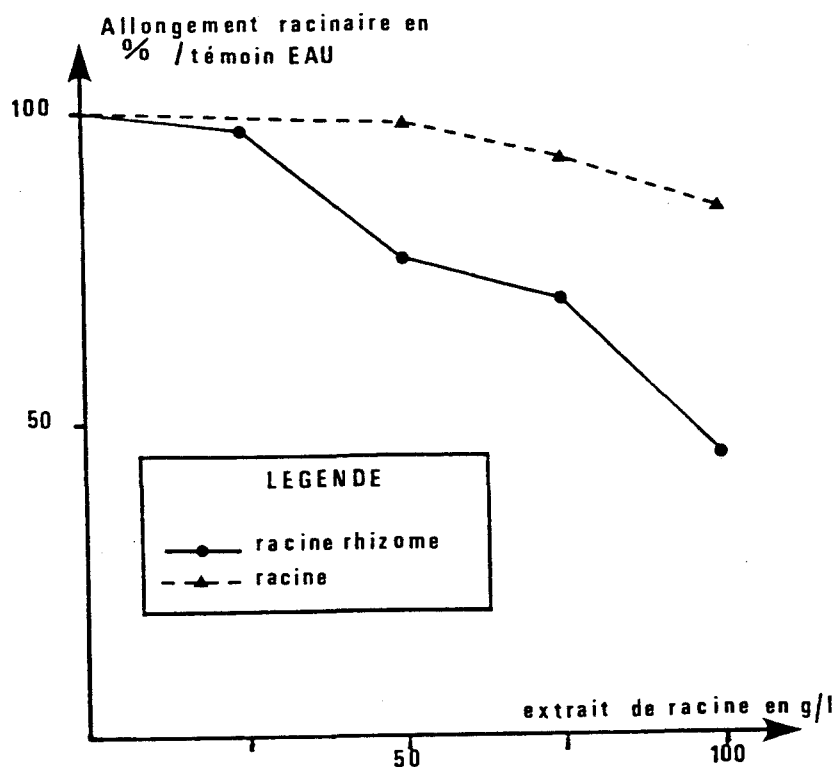


Figure 12 : Influence d'extraits aqueux de piloselle sur l'allongement racinaire de l' Arrhenatherum elatius

concentration des extraits en g/l	0			25			50			75			100		
	n	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ
racine- rhizome	27	27,72	9,87	28	26,93	11,53	29	21,22*	10,55	26	19,34*	9,39	26	12,57*	7,47
racine	28	21,79	8,97	--	--	--	25	21,24	8,13	24	20,08	8,73	30	18,40	6,80

Tableau 5 : TESTS DE TOXICITE DES EXTRAITS AQUEUX DE PILOSELLE VIS A VIS DE L'ELONGATION RACINAIRE DE L'Arrhenatherum.

n = nombre de graines germées

$\bar{x}$ = moyenne de l'élongation racinaire en mm

σ = écart type

* = au niveau de $\alpha = 0,05$ le t (test de Student) observé est supérieur au t théorique, la moyenne est donc différente de celle du témoin

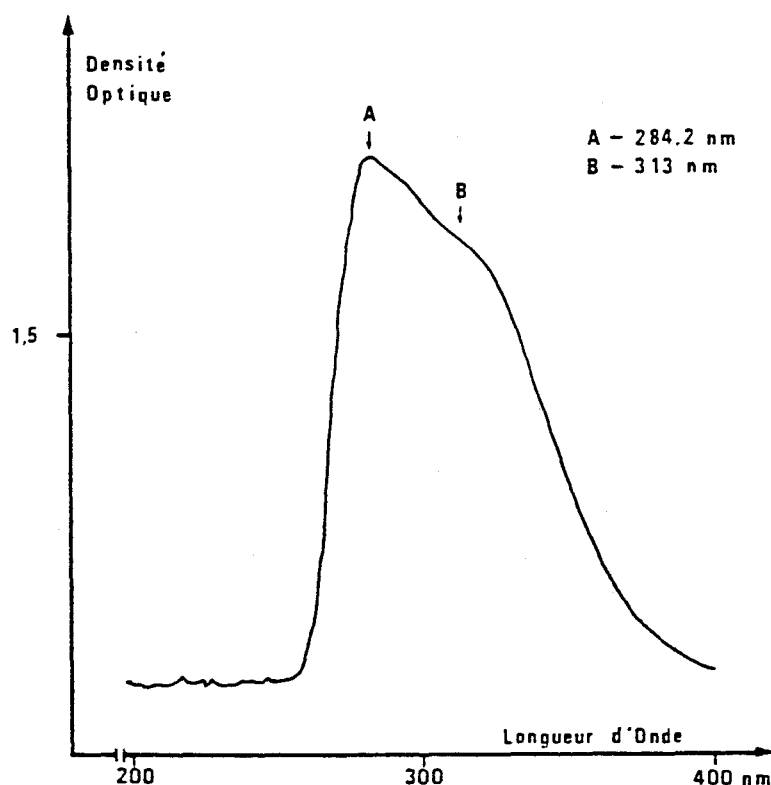


Figure 13 : SPECTRE UV DE LA SOLUTION AQUEUSE DU MELANGE RACINE-RHIZOME DE Hieracium pilosella.

	Témoin	Ether de pétrole	Chloroforme	Ethyl acétate	Phase aqueuse
n	30	26	28	29	26
$\bar{x}$	28,53	32,69	12,46*	28,48	26,61
σ	9,48	8,68	5,99	10,44	6,70

Tableau 6 : TESTS DE TOXICITE DES SOLUTIONS OBTENUES PAR LE FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT AQUEUX DU MELANGE RACINE-RHIZOME DE PILOSELLE VIS A VIS DE L'ELONGATION RACINAIRE DE L'Arrhenatherum elatius.

n = nombre de graines germées

$\bar{x}$ = moyenne de l'élongation racinaire en mm

σ = au niveau de $\alpha = 0,05$ le t (test de Student) observé est supérieur au t théorique, la moyenne est donc différente de celle du témoin

Ils montrent que les extraits aqueux du mélange racine-rhizome à 50g/l, 75g/l et 100g/l inhibent significativement l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum elatius tandis que pour celle à 25g/l, il y a réduction de croissance mais celle-ci n'est pas significative. Par contre, l'extrait aqueux de racine a une faible action inhibitrice (action non significative à 100g/l).

II.1.2. Mise en évidence de composés phénoliques dans les extraits aqueux.

Le spectre U.V. (figure n°13) de l'extrait aqueux du mélange racine-rhizome présente un pic à 284,2 nm et un épaulement à 313 nm, la présence dans cette solution de composés phénoliques est probable.

Les dosages des composés phénoliques le confirment. Les résultats, obtenus à partir des courbes étalons d'acide chlorogénique et d'ombelliférone (annexe 9), sont les suivants :

- 0,988 mg d'équivalent d'acide-chlorogénique par ml d'extrait aqueux du mélange racine-rhizome de piloselle à 100g/l
- 0,54 mg d'équivalent d'ombelliférone par ml d'extrait aqueux du mélange racine-rhizome à 100g/l.

II.1.3. Isolement des substances toxiques

II.1.3.1. fractionnement de l'extrait aqueux

du mélange racine-rhizome de piloselle

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°6. Seule, la phase chloroformique se révèle significativement toxique vis à vis de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum. Les substances toxiques de l'extrait aqueux de racines de piloselle sont donc extraites par le chloroforme.

II.1.3.2. isolement des substances inhibitrices

de la fraction toxique

Le chromatogramme obtenu (figure n°14) présente plusieurs pics dont un plus important que les autres, la fraction correspondant à ce dernier se révèle être

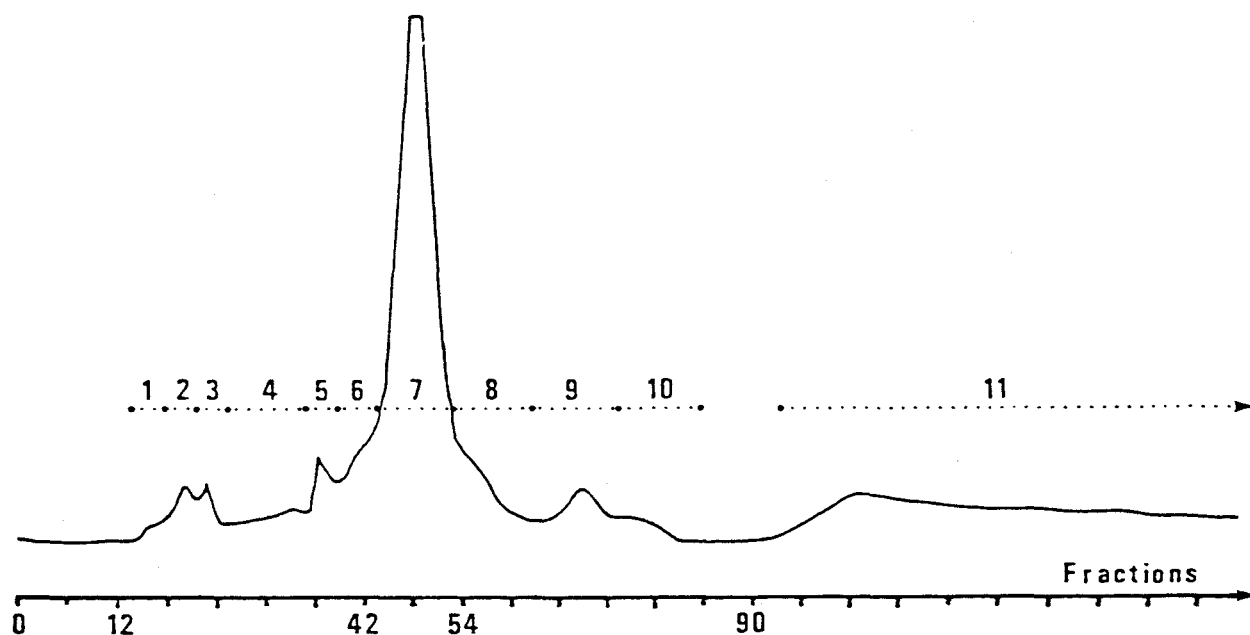


Figure 14 : CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE (GEL LH 20) DE LA SOLUTION ETHANOLIQUE.

Solution	Fractions n°	Elongation racinaire — en mm $\bar{x}$ σ		Nombre de graines germées
1	15 à 17	33,24	18,44	28
2	18 à 21	29,24	12,96	25
3	22 à 25	30,85	12,89	26
4	26 à 35	31,42	19,20	26
5	36 à 39	30,28	20,18	26
6	40 à 43	31,46	18,62	24
7	44 à 53	9,14*	8,34	22
8	54 à 63	31,22	14,99	27
9	64 à 73	30,27	18,80	29
10	74 à 84	29,73	15,12	26
11	93 à 156	25,52	17,57	25
NS	non soluble	8,74 *	7,78	27
T	témoin	28,66	14,57	24



Tableau 7 : TOXICITE DES SOLUTIONS SUR L'ELONGATION RACINAIRE DE Arrhenatherum elatius.

$\bar{x}$ = moyenne de l'élongation racinaire en mm

σ = écart type

* = au niveau de $\alpha = 0,05$ le t (test de Student) observé est supérieur au t théorique, la moyenne est donc différente de celle du témoin

toxique ainsi que la fraction NS (tableau n°7).

Les chromatographies sur cellulose après pulvérisation de réactifs (figure n°15 et n°16, tableau n°8) ont permis de déterminer que la fraction NS renfermait une seule substance et la fraction 7 (chromatographie sur colonne) deux composés (appelés 1 et 2). le réactif $\text{Fe Cl}_3\text{-K}_3 \text{Fe (CN)}_6$, spécifique des phénols a montré que ces 3 substances sont de nature phénolique.

Les deux substances (1 et 2) de la fraction 7 ont été séparées par chromatographie sur cellulose (figure n°17), les tests de toxicité réalisés montrent que la substance 2 est significativement inhibitrice vis à vis de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum (tableau n°9).

III.1.4. Détermination des substances toxiques

Les résultats des chromatographies des substances 2 et NS et des colorations relevées avant et après pulvérisation de divers réactifs sont donnés dans les tableaux n°10 et n°11.

- substance 2 de la fraction 7

Les R_f , mesurés dans les différents solvants utilisés, et les colorations, obtenues après pulvérisation des réactifs, de la substance 2 de la fraction 7 sont identiques à ceux de l'ombelliférone. La substance 2 de la fraction 7 a donc été identifiée comme étant de l'ombelliférone

- substance NS

Le spectre U.V. de l'aglycone dans l'éthanol à 95°C présente deux maxima (332,5 nm et 262,5 nm). Dans le chloroforme, les maxima sont de 320,8 nm et 275,8 nm, d'autre part le spectre présente un épaulement très net à 305 nm.

Les flavones présentent deux zones principales d'absorption, la première entre 330 et 350 nm, la seconde entre 250 et 270 nm (Harbone, 1973) et peuvent posséder une absorption secondaire sous forme d'un épaulement à 300-310 nm (Ribereau-Gayon, 1968). Le spectre que nous avons obtenus présentent les caractéristiques de ces substances. La comparaison des maxima d'absorption de notre

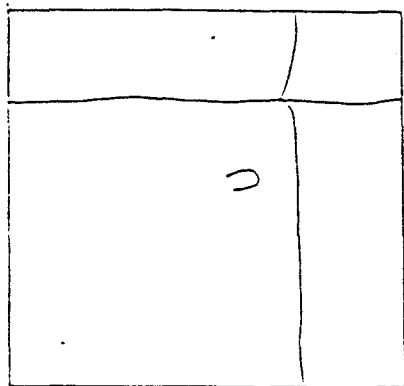


Fig.15 : chromatogramme de la fraction NS. (chromatographie bidimensionnelle: 1° acide acétique 15%, 2° B.A.E.)

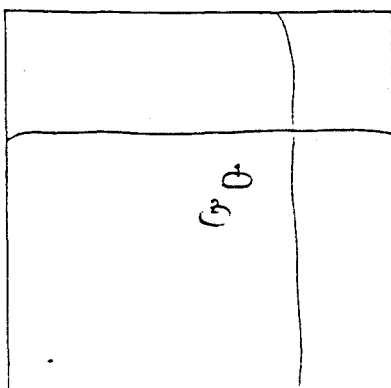


Fig.16 : chromatogramme de la fraction 7 (chromatographie bidimensionnelle: 1° acide acétique 15%, 2° B.A.E.)

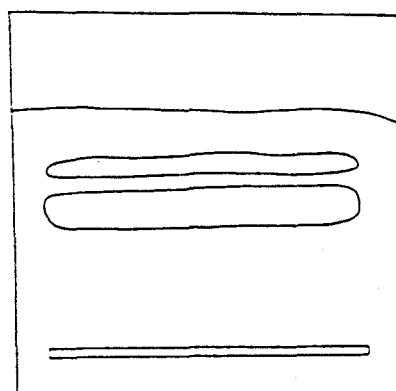


Fig.17 : chromatographie préparative de la fraction 7 (solvant: acide acétique 15%)

	fraction NS	fraction 7	
		1	2
visible	--	--	--
UV	marron clair	--	bleu
p nitraniline	jaune pâle	brun	jaune orange
$\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe(CN)}_6$	bleu	bleu	bleu

Tableau 8 : COLORATION DES COMPOSES NS, DE LA FRACTION 7 (1 ET 2)

	témoin	substance 1	substance 2
n	30	27	27
$\bar{x}$	24,27	24,44	13*
σ	9,52	12,98	7,83

Tableau 9 : TESTS DE TOXICITE DES SUBSTANCES 1 ET 2 DE LA FRACTION

VIS A VIS DE L'ELONGATION RACINAIRE DE L'Arrhenatherum.

n = nombre de graines germées

$\bar{x}$ = moyenne de l'élongation racinaire en mm

σ = écart type

* = au niveau de $\alpha = 0,05$ le t (test de Student) observé est supérieur au t théorique la moyenne est donc différente de celle du témoin.

	R f			
	Acide acétique 15 %	Butanol	Forestal	Benzène
Acide caféique	0,38	0,77	0,73	0,05
Acide chlorogénique	0,69	0,55	0,81	0
Ombelliferone	0,59	0,94	0,89	0,26
Apigénine	0,04	0,87	0,71	0,07
Fraction N S	0,70	0,86	0,88	0,56
Fraction N S hydrolysé	0,02	0,93	0,71	0,04
Fraction 7	0,57	0,91	0,90	0,26

Tableau 10 : VALEURS DES RF DES COMPOSES TEMOINS ET DES PHENOLS ISOLEES.

	R E A C T I F S						
	Visible	U V	U V - ammoniaque	FeCl ₃ -K ₃ Fe(CN) ₆	P-nitraniline	P-nitraniline + carbonate de sodium	carbonate de sodium
Acide caféique	-	bleu violacé	vert	bleu	orangé	orange foncé	vert
Acide chlorogénique	-	bleu violacé	jaune vert	bleu	orange-marron	marron	jaune
Ombelliferone	-	bleu	bleu brillant	bleu	jaune-orangé	marron	bleu clair
Apigénine	jaune très pale	marron foncé	jaune foncé	bleu	orange pale	orange	jaune
Fraction NS	-	marron clair	marron clair	bleu	jaune pale	jaune	jaune-vert
Fraction NS hydrolysé	jaune très pale	marron	jaune	bleu pale	jaune orangé	orange	jaune-vert
Fraction 7	-	bleu	bleu brillant	bleu	jaune orangé	marron	bleu clair

Tableau 11 : COLORATION DES COMPOSES TEMOINS ET DES PHENOLS ISOLEES.



toxicité sont effectués comme décrit dans l'annexe 6 afin de déterminer si les deux solutions isolées sont inhibitrices vis à vis de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum.

La pureté de la fraction NS a été vérifiée par une chromatographie bidimensionnelle sur cellulose (1ère migration : solvant acide acétique à 15%, 2ème migration : solvant Forestal).

I.1.5. Détermination des substances phytotoxiques isolées de l'extrait de piloselle

La nature des substances isolées a été déterminée par chromatographie sur couche mince dans différents solvants et après pulvérisation de divers réactifs (annexe 8).

I.2.- Phytotoxicité de l'ombelliférone, de l'acide caféique et de l'acide chlorogénique

L'ombelliférone, l'acide caféique et l'acide chlorogénique sont connus pour être phytotoxiques. L'influence de ces trois composés, à diverses concentrations (10-9M, 10-6M, 10-4M, 10-3M), a été étudiée vis à vis de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum elatius.

Les tests de toxicité ont été réalisés selon un protocole expérimental identique à celui décrit en annexe 1.

II.- RESULTATS

II.1. Les extraits aqueux de piloselle

II.1.1. Tests de toxicité des extraits aqueux

La pression osmotique des extraits testés est inférieure à 0,896 atm, elle n'intervient donc pas sur l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum elatius

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°5 et la figure n°12.

	Rf dans le solvant éthyl- acetate-pyridine-eau	coloration après pulvéri- -sation du réactif à l'aniline
Fructose	0,31	ocre-jaune
Mannose	0,33	brun-marron
Glucose	0,27	gris
Hydrolysats de NS	0,27	gris
Arabinose	0,32	gris clair
Rhamnose	0,53	jaune

Tableau 12 : RF ET COLORATION DES SUCRES TEMOINS ET DE L'HYDROLYSAT DE NS.



aglycone avec ceux des flavones étudiées par divers auteurs (Ribereau-Gayon, 1968, Haag-Berrurier, 1964, Harbone, 1973) montre que notre composé présente des absorptions proches de celles de l'apigénine : bande I à 336 nm, bande II à 269 nm et épaulement entre 300 et 310 nm (ceci dans l'éthanol).

L'allure du spectre de l'apigénine du commerce est identique à celle de notre aglycone (dans l'éthanol), mais les valeurs des maxima sont déplacés vers des longueurs d'ondes plus grandes (bande I à 347 nm et bande II à 279 nm) et ne correspondent pas aux données bibliographiques, ceci nous amène à douter de la pureté de notre composé témoin.

Dans le solvant de forestal, les composés NS hydrolysé et apigénine témoin présentent des taches avec des trainées importantes ce qui entraîne une imprécision dans la mesure des Rf dans ce solvant, et pourrait expliquer les valeurs plus faibles de ces Rf par rapport à ceux trouvés dans la littérature (Rf = 0,83 in Ribereau-Gayon, 1968). Dans les solvants acide acétique 15% et benzène, les Rf de l'apigénine témoin et de l'aglycone sont très proches, seuls ceux trouvés dans le solvant butanol différent.

Les colorations de l'aglycone et de l'apigénine témoin, avant et après pulvérisation des réactifs, sont très proches. L'aglycone pourrait donc être de l'apigénine, toutefois des vérifications doivent être effectuées avec des composés purifiés, la pureté des substances utilisées étant imparfaite.

- les glucides libérés par l'hydrolyse de la substance NS

L'étude de la fraction hétérosidique montre que cette dernière est composée d'une seule substance : le Rf et la coloration après pulvérisation du réactif à l'aniline sont identiques à ceux du glucose témoin (tableau n°12). L'hydrolyse libère donc du glucose.

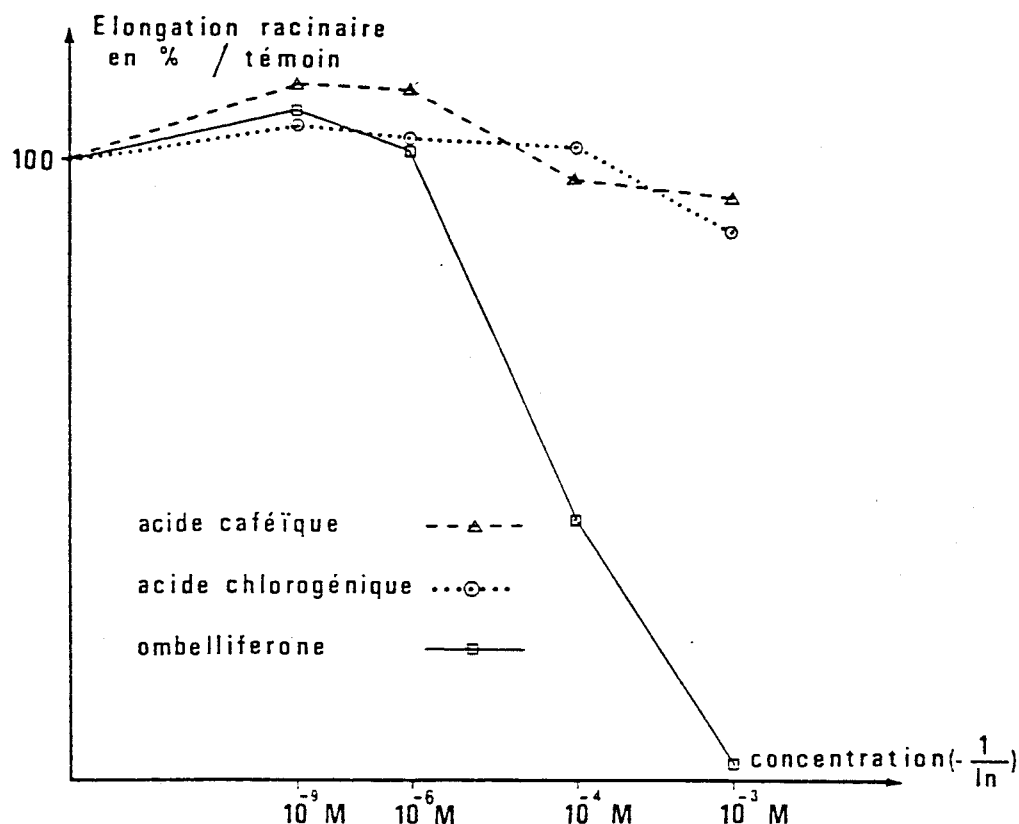


Figure 18 : INFLUENCE DE L'OMBELLIFERONE, DE L'ACIDE CAFEIQUE, DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE SUR L'ELONGATION RACINAIRE DE L'*Arrhenatherum*.

concentrations	ombelliferone			acide caféique			acide chlorogénique		
	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ	n	$\bar{x}$	σ	n
H ₂ O	31,64	13,03	25	32,69	13,72	24	38,23	18,74	30
10 ⁻⁹	35,62	13,86	27	35,42	12,52	24	40,27	13,79	29
10 ⁻⁶	32,34	9,88	29	36,63	10,38	27	39,46	14,71	28
10 ⁻⁴	13,45*	9,25	29	31,81	9,56	26	38,96	16,91	29
10 ⁻³	1*	0	9	31,00	9,02	30	33,86	12,66	28

Tableau 13 : TESTS DE TOXICITE DE L'OMBELLIFERONE, DE L'ACIDE CAFEIQUE, ET DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE VIS A VIS DE L'ELONGATION RACINAIRE DE L'*Arrhenatherum elatius*.

n = nombre de graines germées

$\bar{x}$ = moyenne de l'élongation racinaire en mm

σ = écart type

* = au niveau de $\alpha = 0,05$ le t (test de Student) observé est supérieur au t théorique la moyenne est donc différente de celle du témoin.

II.2.- Phytotoxicité de l'ombelliférone, de l'acide caféique et de l'acide chlorogénique

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°13 et la figure n°18. Seule l'ombelliférone, aux concentrations 10^{-3} molaire et 10^{-4} molaire, inhibe significativement l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum. A la concentration 10^{-3} molaire, le taux de germination est fortement diminué. L'ombelliférone affecte donc le taux de germination et l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum.

Aux faibles concentrations (10^{-9} molaire), les trois substances testées ont un effet bénéfique pour l'élongation racinaire mais cet effet n'est pas statistiquement significatif.

L'acide caféique et l'acide chlorogénique, substances connues pour être inhibitrices du développement de certaines plantes, ne montrent pas d'effet phytotoxique vis à vis de l'Arrhenatherum.

III.- DISCUSSION

Parmi les extraits aqueux de racine de piloselle, uniquement celui à 100 g/l a un effet dépressif sur l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum (16% par rapport au témoin), mais cette inhibition n'est pas significative.

Par contre, les extraits aqueux du mélange racine-rhizome de piloselle inhibent significativement l'allongement racinaire de l'Arrhenatherum. Le dosage des composés phénoliques présents dans ces extraits indique des teneurs assez élevées : 0,54 g/l d'équivalent d'ombelliférone, ce qui correspond respectivement à des concentrations de 3×10^{-3} molaire et $2,78 \times 10^{-3}$ molaire. Jankay et Mulla (1976) ont montré que des concentrations de $0,8 \times 10^{-3}$ molaire en ombelliférone diminuent de 41% l'allongement racinaire du concombre. Les composés phénoliques présents dans les extraits aqueux pourraient donc être responsables de la phytotoxicité de ces extraits.

L'isolement des substances phytotoxiques des extraits aqueux confirment cette hypothèse : deux substances de nature phénolique (l'ombelliférone et un flavonoïde) sont responsables de l'inhibition de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum.

Makepeace et al (1985) ont isolé à partir de la piloselle une substance phytotoxique : l'ombelliférone qui est, pour eux, uniquement présente dans les feuilles. Ceci est en désaccord avec nos travaux et ceux de Haag-Berrurier (1964) :

- nous avons isolé du mélange rhizome-racine de piloselle de l'ombelliférone.

- Haag-Berrurier, en dosant l'ombelliférone dans les différents organes de la piloselle, a trouvé cette substance présente dans les racines, les rhizomes et les feuilles.

D'après Haag-Berrurier (1964), la teneur en ombelliférone est plus faible dans les racines que dans les rhizomes ce qui pourrait expliquer que les aqueux de racines de piloselle ne soient pas inhibiteurs de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum.

Nous avons isolé de la piloselle un flavonoïde qui serait un glucoside-apigénine. Haag-Berrurier a isolé un hétéroside de l'apigénine renfermant de l'arabinose et du glucose. Nous n'avons pas retrouvé cet arabinose dans nos analyses.

Makepeace et al ont testé l'influence de l'ombelliférone sur la néoformation des racines de Festuca novae-zelandie en culture hydroponique; les résultats sur l'inhibition totale diffèrent peu de ceux que nous avons obtenus sur l'influence de l'ombelliférone sur l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum : la néoformation des racines de la fétuque est totalement inhibée à $1,4 \times 10^{-4}$ molaire, tandis que pour l'Arrhenatherum cette valeur est de 1×10^{-3} molaire. Par contre, Makepeace et al trouvent que la néoformation des racines commence à

être inhibée dès que l'on ajoute de l'ombelliférone dans la culture hydroponique, or nos résultats montrent que de 0 à 10^{-6} molaire l'ombelliférone n'inhibe pas l'Arrhenatherum mais peut avoir, au contraire, un léger effet stimulant.

IV.- CONCLUSION

Les extraits aqueux de racines de piloselle n'inhibent pas significativement l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum, seuls les extraits du mélange rhizome-racine de piloselle l'inhibent. Deux composés phénoliques (l'ombelliférone et un flavonoïde) sont responsables de cette inhibition. L'ombelliférone se retrouve aussi dans les organes aériens de la piloselle (Haag-Berrurier, 1964, Makepeace et al, 1985), on pourra donc trouver aussi des extraits d'organes aériens de piloselle phytotoxiques.

La piloselle possède donc une potentialité allélopathique, mais ceci ne prouve pas que la piloselle soit allélopathique. Dans le cas de l'allélopathie vraie négative, il faut aussi prouver que la piloselle rejette ces substances dans son environnement et que ces composés y sont actifs. Dans le cas de l'allélopathie fonctionnelle négative (dégradation du matériel végétal), il faut montrer que l'on retrouve ces substances dans le sol en quantité suffisante pour agir. Dans ce dernier cas, on peut même supposer que l'on puisse trouver dans le sol, des substances phytotoxiques différentes de celles isolées dans ce chapitre.

ETUDE DES EXSUDATS RACINAIRES DE HIERACIUM PILOSELLA

Hieracium pilosella possède dans ses organes souterrains des composés a potentialité allélopathique. Ces substances sont-elles libérées dans le sol par un processus autre que la dégradation du matériel végétal ?

Afin de répondre a cette question nous avons étudié les exsudats racinaires de piloselle cultivée en culture hydroponique.

I.- MATERIELS ET METHODES

I.1.- Culture hydroponique stérile de Hieracium pilosella

Des cultures hydroponiques non stériles de pilosella ont été réalisées, des bactéries se sont développées au bout d'environ 15 jours de culture et ont obstrué les canalisations du système. Cette expérience a donc été rapidement abandonnée.

Pour cette raison, et afin d'obtenir des résultats uniquement dûs a la plante (sans l'intervention de micro-organismes), nous avons effectué des cultures hydroponiques stériles en tube (annexe 10). Elles ont permis de déterminer si des substances de nature phénolique étaient exsudées et d'en connaître la nature.

I.2.- Analyse de la solution de culture

I.2.1. Elimination des éléments minéraux

Les éléments minéraux de la solution nutritive pouvant gêner l'analyse, la plus grande partie d'entre eux est éliminée par défécation (annexe 11).

La mise en évidence de substances de nature phénolique est réalisée, comme dans le chapitre précédent par un spectre U.V.. Afin de confirmer les résultats obtenus avec le spectre U.V., 100µl de solution de culture concentrée sont déposés en un spot sur un carré de papier Whatman n°3, puis le réactif $\text{FeCl}_3 - \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (spécifique des composés phénoliques) est pulvérisé dessus. La coloration obtenue est notée.

I.2.2. Détermination du nombre de composés phénoliques présents dans la solution de culture de piloselle

Nous avons pu disposer au début de cette analyse d'un appareil pour la chromatographie liquide à haute pression. Pour déterminer si un ou plusieurs composés phénoliques sont libérés dans le milieu, nous avons donc utilisé, conjointement, deux techniques d'analyse (annexe 12) :

- la chromatographie bidimensionnelle sur couche mince
- la chromatographie liquide haute pression

I.2.3. Isolement des composés phénoliques de la solution de culture de piloselle.

Les composés phénoliques détectés ont été séparés par chromatographie préparative sur couche mince. Nous avons utilisé des plaques de cellulose et le solvant benzène-acide acétique-eau (7-6-3), celui-ci nous donnant la meilleure séparation.

I.2.4. Identification des composés phénoliques isolés

L'identification des différents composés phénoliques isolés de la solution de culture de piloselle a été effectuée par chromatographie sur couche mince.

Nous avons utilisé le même protocole expérimental que celui décrit dans l'annexe 8 pour l'analyse des composés phénoliques isolés de l'extrait aqueux de piloselle (chapitre III).

Des tests de toxicité ont été réalisés, selon le protocole de l'annexe 1,

avec les composés isolés afin de déterminer si ils étaient phytotoxiques pour l'Arrhenatherum elatius.

II.- RESULTATS

II.1.- Mise en évidence de substances de nature phénolique

Le spectre U.V. (figure n°19) de la solution de culture concentrée présente un pic à 275,8 nm et un épaulement à 294 nm. La présence de composés phénoliques dans cette solution est donc probable. Ceci est confirmé par la pulvérisation du réactif $\text{FeCl}_3 - \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ sur le carré de papier Whatman.

La piloselle rejette bien dans le milieu extérieur des substances de nature phénolique.

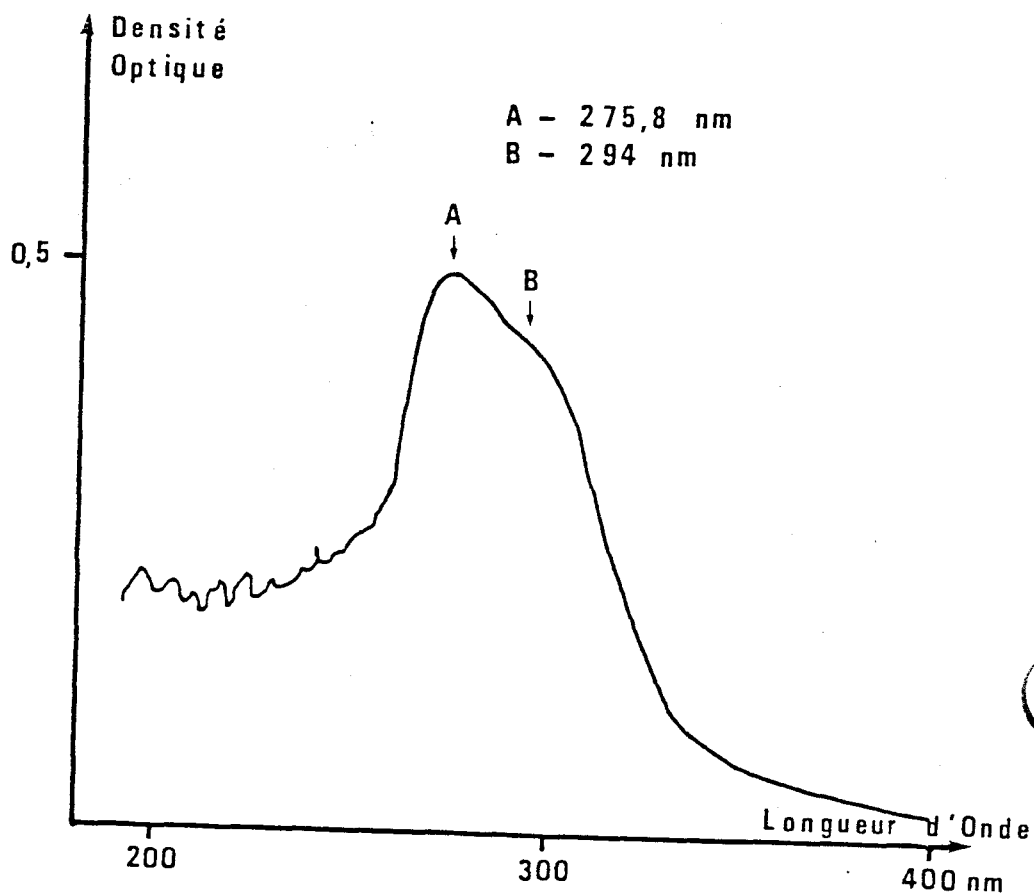


Figure 19 : Spectre U.V de la solution de culture de Hieracium pilosella

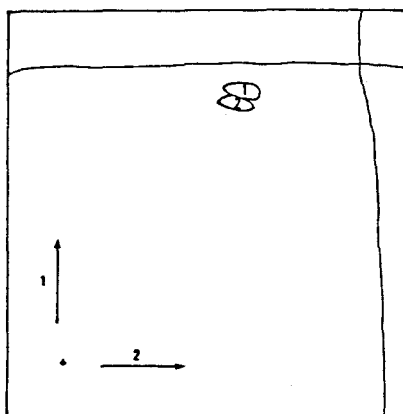


Figure 21 : CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR CELLULOSE DE LA
SOLUTION DE CULTURE DE PILOSELLE.

tache n°1 : UV = bleu brillant ; $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe(CN)}_6$ = bleu

tache n°2 : UV = -- ; $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe(CN)}_6$ = bleu

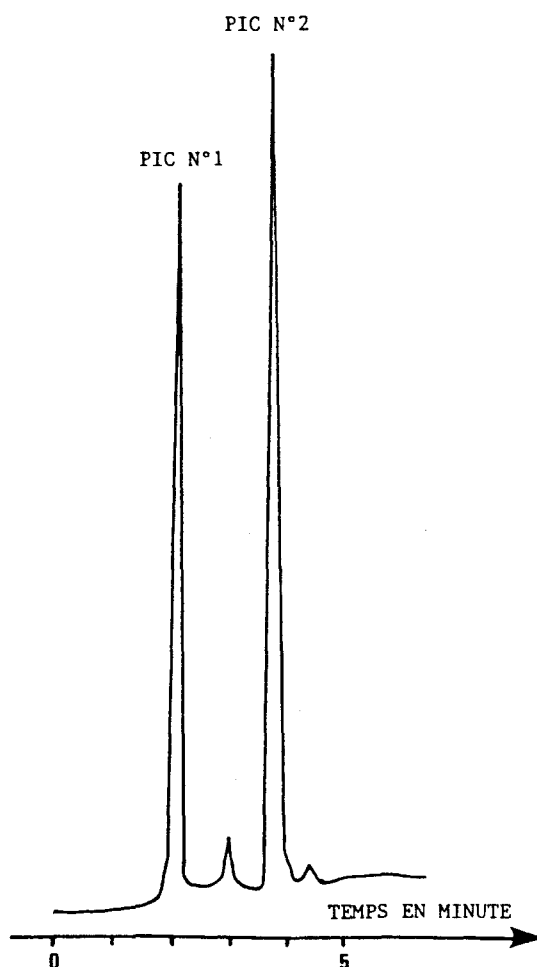


Figure 20 : CHROMATOGRAPHIE DE LA SOLUTION DE CULTURE DE PILOSELLE
SUR UNE COLONNE 8 NVC 18 WATERS.

II.2.- Détermination des composés phénoliques présents dans la solution de culture

La chromatographie bidimensionnelle sur cellulose (figure n°20) révèle la présence de deux substances de nature phénolique dans la solution de culture de piloselle.

Les résultats de la chromatographie liquide haute pression (figure n°21) confirment ceux de la chromatographie bidimensionnelle sur cellulose, deux substances ont également été détectées. La substance correspondant au pic n°1 a un temps de rétention de 1:40 (min:sec), elle n'est pas retenue sur la colonne et est éluée rapidement. La substance correspondant au pic n°2 a un temps de rétention de 3:19 (min:sec), elle est donc éluée assez rapidement, mais ce composé est moins polaire que la substance 1.

En effet, dans un système à polarité de phase inversée, les molécules greffées sur le gel de silice sont apolaires et la phase mobile est polaire (mélange eau-méthanol, eau-acétonitrile). Les lois de la rétention sont l'inverse de celles observées sur phase stationnaire classique (polaire) (R.ROSSET, M.CAUDE, et A.JARDY,1982) : les composés polaires sont élués avant les composés apolaires, d'autre part, une augmentation de la teneur en eau de la phase mobile (donc de la polarité de celle-ci) augmente la rétention.

Le calcul des Rfs de la chromatographie bidimensionnelle sur cellulose dans le solvant 1 (n butanol-acide acétique-eau, 6/1/2) et dans le solvant 2 (acide acétique 15%) de la tache n°1 (figure n°21) donne des résultats proches de ceux de l'ombelliférone dans ces solvants (tableau n°14) ; ce qui pourrait laisser supposer la présence de ce composé dans la solution de culture.

Par contre, la comparaison des résultats de la chromatographie haute pression de la solution de culture et ceux du mélange des 13 composés phénoliques témoins (figure n°22, tableau n°15) montre que cette hypothèse est fausse : l'ombelliférone témoin a un temps de rétention de 12:52 (min:sec), les deux substances de la solution concentrée de culture de piloselle ont des temps de rétention inférieurs à 4 minutes. Aucun de ces deux composés ne peut être de

	Rf	
	Solvant n°1	Solvant n°2
Tache n°1	0,91	0,62
Ombelliférone	0,94	0,59

Tableau 14 : VALEUR DE RF DU COMPOSE DE LA TACHE N°1 ET DE L'OMBELLIFERONE

composés	TR en min:sec	TR en min:sec
		(résultats de Wulf et Nagel)
acide gallique	1:54	2:02
acide chlorogénique	3:51	11:38
acide p-hydroxybenzoïque	5:49	4:12
acides vanillique et caféïque	7:01	8:03
acide syringique	7:46	--
ombelliférone	12:52	--
acide p-coumarique	14:05	13:22
acide férulique	16:53	24:14
acide m-coumarique	20:50	--
coumarine	22:50	--
acide o-coumarique	29:40	17:10
acide cinnamique	34:05	33:03

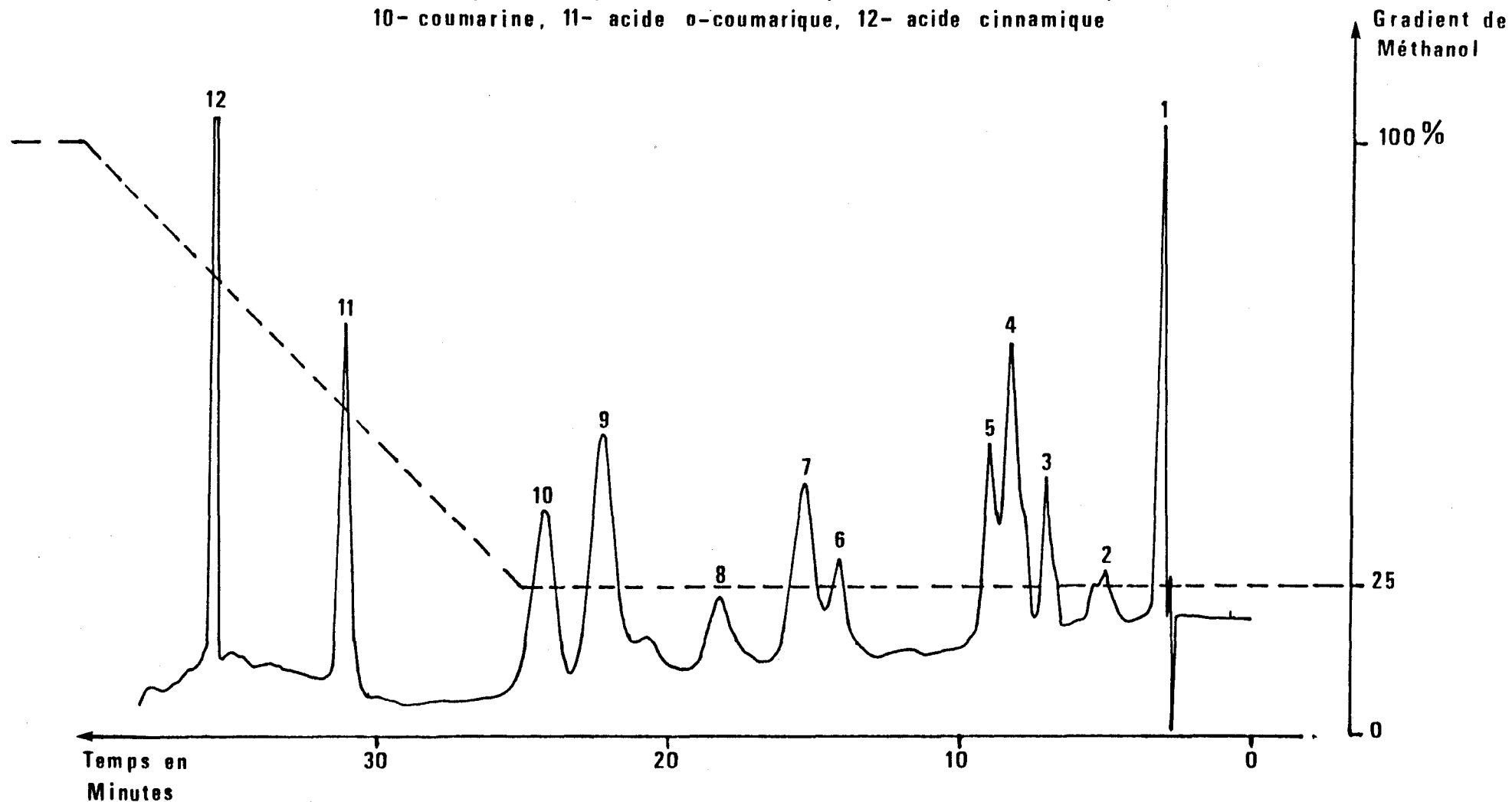
Tableau 15 : TEMPS DE RETENTION DES 13 COMPOSES PHENOLIQUES DU MELANGE
CHROMATOGRAPHIE SUR LA COLONNE 8 NVC 18 ET DES COMPOSES
PHENOLIQUES TESTES PAR WULF ET NAGEL (1976) SUR UNE COLONNE
BONDAPACK C18 AVEC LE SOLVANT EAU-ACIDE ACETIQUE (95:5).



Figure 22 : Séparation de composés phénoliques sur une colonne 8 NVC 18

Eluant eau - acide acétique (98,5-1,5), méthanol

1-acide gallique, 2-acide chlorogénique, 3-acide p-hydroxybenzoïque,
4-acide vanillique, 5-acide caféique, 6-ombelliférone, 7-acide p-coumarique, 8-acide férulique, 9-acide m-coumarique,
10-coumarine, 11-acide o-coumarique, 12-acide cinnamique



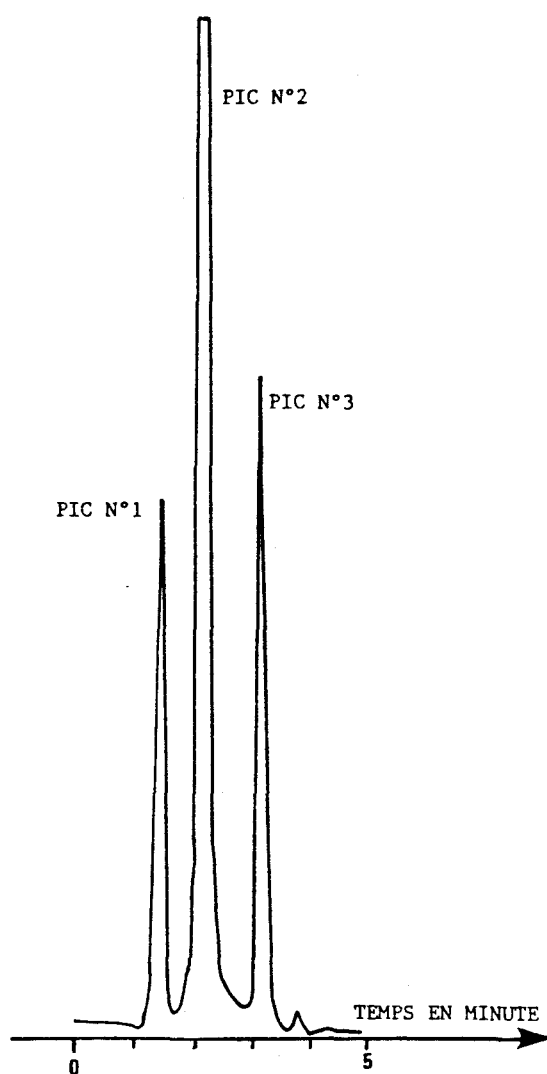


Figure 23 : CHROMATOGRAPHIE DU MELANGE SOLUTION DE CULTURE DE PILOSELLE
+ ACIDE GALLIQUE SUR UNE COLONNE 8 NVC 18 WATERS.
pic n°2 : acide gallique

l'ombelliférone, la piloselle n'exsude donc pas cette substance.

L'addition de soude dans la solution concentrée de culture de piloselle provoque l'apparition d'un trouble dans cette solution, ce qui nous a fait supposer, dans un premier temps, que la solution pouvait contenir de l'acide gallique, cet acide se décomposant en présence de soude (Harborne, 1973). Par ailleurs, les temps de rétention des pics n°1 et 2 de la solution concentrée de culture de piloselle sont proches de celui de l'acide gallique. Nous avons donc chromatographié un mélange composé de la solution de culture de piloselle et d'acide gallique témoin afin de vérifier cette hypothèse. Le chromatogramme du mélange (figure n°23) montre trois pics (temps de rétention : 1:40, 2:10, 3:00 (min:sec), il n'y a pas superposition du pic de l'acide gallique témoin (temps de rétention de 2:40) avec l'un des deux pics de la solution concentrée de culture de piloselle : cette solution ne contient donc pas d'acide gallique.

Dans leur chromatographie, Wulf et Nagel (1976) éluent l'acide protocatéchique (temps de rétention : 2:92 (min:sec)) après l'acide gallique et avant l'acide p-hydroxybenzoïque.

Sur la figure n°23, on observe que le pic n°3 est élué après l'acide-gallique témoin (pic n°2) et possède un temps de rétention (3:00) (min:sec) inférieur à celui de l'acide p-hydroxybenzoïque (5:49) (min:sec), on peut émettre l'hypothèse que ce pic correspond à de l'acide protocatéchique.

Les résultats que nous avons obtenus avec le mélange des 13 composés phénoliques différent de ceux de Wulf et Nagel (1976) en deux points (tableau n°15) :

- Wulf et Nagel ont obtenus une élution de l'acide chlorogénique après celle de l'acide caféïque, ce phénomène fut inattendu pour eux, l'acide chlorogénique étant considéré comme un composé plus polaire que l'acide caféïque. Dans notre cas l'acide chlorogénique est élué avant l'acide caféïque ;

- d'autre part, dans notre système de chromatographie, l'acide fêlurique a un temps de rétention plus faible que celui de l'acide o-coumarique ; Wulf et Nagel (1976) obtiennent des résultats inverses.

	acide acétique 15%	butanol	forestal	benzène
acide caféïque	0,37	0,78	0,71	0,10
acide chlorogénique	0,71	0,47	0,85	0
ombelliférone	0,62	0,91	0,86	0,39
acide protocatéchique	0,65	0,83	0,80	0,11
substance 1 hydrolysée	0,60	0,90	0,83	0,40
substance 2	0,67	0,81	0,81	0,12

Tableau 16 : VALEUR DES RF DES COMPOSES TEMOINS ET DES PHENOLS ISOLES

	UV	Réactifs				
		UV + ammoniacale	p-nitraniline	p-nitraniline + carbonate de Na	carbonate de Na	$\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe(CN)}_6$
acide caféïque	bleu violacé	vert	orange	orange foncé	vert	bleu
acide chlorogénique	bleu violacé	jaune vert	orange marron	marron	jaune	bleu
ombelliférone	bleu	bleu brillant	jaune orange	marron	bleu très clair	bleu
acide protocachique	bleu sombre	bleu sombre	jaune	mauve	rose très pâle	bleu
substance 1 hydrolysée	bleu	bleu brillant	jaune orange	marron	bleu très clair	bleu
substance 2	--	--	jaune orange	mauve pâle	rose très pâle	bleu



Tableau 17 : COLORATION DES COMPOSES TEMOINS ET DES PHENOLS ISOLES

Nos résultats s'expliquent par le fait qu'une augmentation de la concentration en méthanol du solvant diminue le temps de rétention des composés phénoliques ; celui de l'acide férulique décroît plus rapidement que celui de l'acide o-coumarique ; à partir d'une certaine concentration en méthanol du solvant, l'acide férulique se trouve donc élué avant l'acide o-coumarique.

II.3.- Identification des substances isolées de la solution concentrée de culture de piloselle

Les résultats des chromatographies de l'aglycone de la substance 1 (tache n°1) et de la substance 2 (tache n°2) ainsi que les colorations relevées avant et après pulvérisation des divers réactifs sont donnés dans les tableaux n°16 et n°17.

L'aglycone de la substance 1 possède des Rf et des colorations identiques à ceux de l'ombelliférone : cet aglycone est de l'ombelliférone. La substance 1 est donc composée en partie d'ombelliférone.

La substance 2 possède des Rf et des colorations comparables à ceux de l'acide protocatéchique et a donc été identifiée comme étant de l'acide protocatéchique. Sur les chromatogrammes, cette substance n'est pas détectable en U.V. et est à peine visible après projection d'une solution de carbonate de sodium, ceci est dû, à notre avis, aux très faibles quantités de substances présentes dans la solution de culture de piloselle.

Etude des glucides libérés par l'hydrolyse acide de la substance 1

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°18. Un sucre est détectable, il possède les caractéristiques du glucose.

Tests de toxicité de la substance 1 et de l'acide protocatéchique (substance 2)

Les tests réalisés avec de l'acide protocatéchique (solution à 10^{-3} mole/l) ne montrent aucune phytotoxicité de ce composé vis à vis de l'Arrhenatherum elatius (tableau n°19).

Par contre, la substance 1 se montre phytotoxique vis à vis de l'Arrhenatherum elatius (tableau n°19).

	Rf dans le solvant ethyl acétate-pyridine-eau	coloration après pulvérisation du réactif
Fructose	0,37	ocre jaune
Mannose	0,37	brun marron
Glucose	0,31	gris
Arabinose	0,37	gris clair
Rhamnose	0,58	jaune
Hydrolysats de la substance 1	0,29	gris

Tableau 18 : RF ET COLORATION DES SUCRES TEMOINS ET DE L'HYDROLYSAT DE LA
SUBSTANCE 1.

	témoin	substance 1	témoin	acide protocatéchique
$\bar{x}$	36,5	20,2*	41,4	43,3
σ	12	13,6	14,0	20,2
n	28	29	30	30

Tableau 19 : TESTS DE TOXICITE DE LA SUBSTANCE 1 ET DE L'ACIDE PROTOCATECHIQUE
VIS A VIS DE L'Arrhenatherum elatius.

$\bar{x}$ = moyenne de l'élongation racinaire en mm

σ = écart type

n = nombre de graines germées

* = au niveau de $\alpha = 0,05$ le t (test de Student) observé est supérieur au
t théorique, la moyenne est donc différente de celle du témoin.

CHAPITRE V

LA PHYTOTOXICITE DU SOL SOUS HIERACIUM PILOSELLA

Hieracium pilosella renferme des substances à potentialité allélopathique. L'étude des exsudats racinaires a montré que la piloselle est capable de rejeter dans son environnement une substance à potentialité allélopathique. Ces composés exsudés ou libérés dans le milieu lors de la dégradation de la piloselle inhibent-ils in situ le développement de l'Arrhenatherum elatius?

A la suite de leurs expériences, Becker et al (1950, 1951) concluent à la toxicité du sol sous Hieracium pilosella vis à vis de plusieurs espèces végétales. Retrouve-t-on sur le terril le même résultat : le sol sous Hieracium pilosella est-il inhibiteur du développement de l'avoine élevée ?

I.- MATERIELS ET METHODES

Pour étudier la phytotoxicité du sol sous Hieracium pilosella, nous avons utilisés deux méthodes :

- 1°) un test à partir d'échantillons de sol
- 2°) un test à partir d'extraits aqueux de sol

I.1.- Test de phytotoxicité à partir d'échantillons de sol (annexe 13)

Nous avons étudié la germination et la croissance de l'Arrhenatherum elatius sur sol de piloselle, sur sol d'Arrhenatherum elatius et sur terreau.

III.- DISCUSSION

Les cultures hydroponiques stériles ont permis de montrer que la piloselle était capable d'exsuder deux composés phénoliques ; de l'acide protocatéchique et de l'ombelliférone lié à un sucre (du glucose) ou glucoside-7 ombelliférone appelé skimine. Ces substances sont différentes dans les extraits aqueux de piloselle. Dans les tests de toxicité, seule la substance 1 (skimine) se révèle être phytotoxique vis à vis de l'Arrhenatherum elatius.

IV.- CONCLUSION

La piloselle contient plusieurs composés de nature phénolique dont la skimine (glucose-7 ombelliférone). Ce composé est exsudé par les organes souterrains de la piloselle, et est phytotoxique vis à vis de l'Arrhenatherum elatius. Cette substance joue-t-elle un rôle allélopathique?

séché ont été estimés directement par le réactif Folin-Ciocalteu (annexe 5) mais sans réaliser de dosage différentiel avec le PVP.

- Chromatographie bidimensionnelle des composés phénoliques des extraits aqueux de sol séché (annexe 4)

Les résultats obtenus avec les extraits aqueux de sol de piloselle ont été comparés à ceux obtenus avec les extraits aqueux de sol d'Arrhenatherum elatius.

II.- RESULTATS

II.1.- Effet du sol de la pelouse à piloselle sur la germination de l'Arrhenatherum elatius

II.1.1. Le taux de germination de l'Arrhenatherum elatius sur sol de piloselle

54 graines d'Arrhenatherum elatius ont germé sur le sol de piloselle contre 56 sur le sol d'Arrhenatherum elatius et 54 sur le terreau, ce qui correspond à des taux de germination respectifs de : 90%, 93% et 90%. Ces résultats ne montrent aucune diminution du taux de germination des graines d'Arrhenatherum elatius sur sol de piloselle vis à vis de ceux sur sol d'Arrhenatherum elatius et sur le terreau.

II.1.2. La croissance de la plantule d'Arrhenatherum elatius

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°20, la figure n°24 en donne une représentation graphique.

Entre le 6^e jour et le 8^e jour, après le semis, l'élongation du coléoptile d'Arrhenatherum elatius sur sol de piloselle est supérieure à celle du coléoptile d'Arrhenatherum sur terreau. Mais ces différences ne sont pas significatives.

I.2.- Les extraits aqueux de sol sous Hieracium pilosella

Seuls les composés phénoliques libres du sol sont susceptibles d'être toxiques pour une plante. Les substances phénoliques immobilisées (sur des acides humiques par exemple), qui ne peuvent pas circuler dans le sol, sont sans effet sur une plante.

Whitehead (1964) extrait les composés phénoliques libres d'un sol par agitation d'échantillons de sol humide (250g) en présence d'eau (250ml) et d'oxyde de calcium (2,5g). Pour notre part, nous avons procédé selon le protocole décrit par Becker et al pour l'obtention des extraits aqueux de sol de la pelouse à Brachypodium pinnatum, extraits qui se sont révélés être phytotoxiques vis à vis de certaines plantes.

I.2.1. La toxicité des extraits aqueux (annexe 4) d'un même échantillon de sol :

- des extraits aqueux de sol humide
- des extraits aqueux de sol séché

Les tests de toxicité ont été réalisés selon le protocole décrit dans l'annexe 1. Les croissances racinaires obtenues avec les extraits aqueux de sol de Hieracium pilosella ont été comparées aux croissances racinaires de témoins où la solution de sol est remplacée par :

- de l'eau distillée
- une solution de sol d'Arrhenatherum elatius obtenue selon le même protocole que la solution de sol de piloselle.

L'expérience a été répétée trois fois.

I.2.2. Mise en évidence des composés phénoliques

- Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques présents dans les extraits aqueux de sol humide et

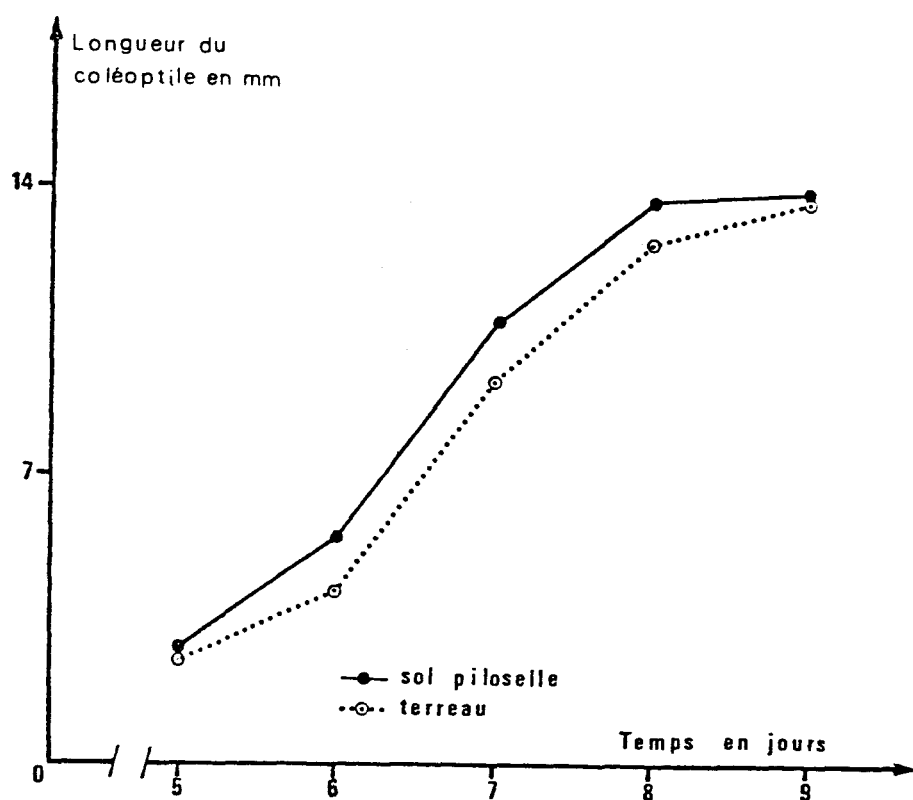


Figure 24 : ELONGATION DU COLEOPTILE DE L'*Arrhenatherum elatius* SUR SOL DE PILOSELLE ET SUR TERREAU.

	sol de piloselle			terreau		
	x	σ	n	x	σ	n
5 ^{ème} jour	2,75	1,25	45	2,52	1,31	44
6 ^{ème} jour	5,50	3,37	48	4,25	3,22	44
7 ^{ème} jour	10,69	3,91	46	9,35	5,99	40
8 ^{ème} jour	13,72	3,22	46	12,75	5,00	40
9 ^{ème} jour	14,00	2,70	46	13,77	3,82	40



Tableau 20 : CROISSANCE DU COLEOPTILE DE L'*Arrhenatherum elatius* SUR SOL DE PELOUSE A PILOSELLE ET SUR TERREAU.

x = élongation du coléoptile en mm

σ = écart type

n = nombre de plantes

Au 9^e jour, l'allongement du coléoptile est le même sur sol de piloselle et sur terreau.

Le sol de piloselle n'inhibe donc pas le développement de l'Arrhenatherum elatius.

L'examen des plantules sur sol de piloselle et sur terreau ne montre pas de différence morphologique comme l'indiquent Makepeace et al.

II.2.- Les extraits aqueux de sol sous Hieracium pilosella

II.2.1. La toxicité des extraits aqueux de sol de piloselle

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°21.

Les extraits aqueux de sol séché et humide de piloselle et d'Arrhenatherum elatius n'ont aucune toxicité vis à vis de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum elatius. Au contraire, les extraits de sol humide et séché de piloselle et ceux de sol humide et séché d'Arrhenatherum elatius ont un effet bénéfique, mais non significatif, sur l'élongation racinaire de la graminée testée par rapport aux solutions témoins d'eau pure.

Les extraits aqueux du sol de la pelouse à piloselle ne peuvent donc, pas plus que le sol lui-même, mettre en évidence une toxicité vis à vis de la germination et de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum elatius.

II.2.2. Mise en évidence des composés phénoliques

- Dosage des composés phénoliques des extraits aqueux de sol

Les concentrations en composés phénoliques ont été déterminées en équivalent d'ombelliférone (courbe étalon : annexe 9), les résultats sont donnés dans le tableau n°22.

Les extraits aqueux de sol séché se montrent plus riches en phénols que les

sol humide				sol séché		
	témoin	sol de piloselle	sol d' <u>Arrhenatherum</u>	témoin	sol de piloselle	sol d' <u>Arrhenatherum</u>
n	29	25	26	27	27	29
$\bar{x}$	34,59	39,80	39,30	24,22	26,74	26,34
σ	14,28	17,91	19,11	8,46	12,19	9,11

Tableau 21 : TOXICITE DES EXTRAITS AQUEUX DE SOL SOUS Hieracium pilosella ET SOUS Arrhenatherum elatius
VIS A VIS DE L'ELONGATION RACINAIRE DE L'Arrhenatherum.

n = nombre de graines germées

$\bar{x}$ = moyenne de l'allongement racinaire en mm

σ = écart type



extrait de sol		équivalent d'ombelliférone en mg/l	concentration molaire (mole/litre)
sol humide	<u>Arrhenatherum</u>	3,8	$2,34 \cdot 10^{-5}$
	piloselle	8	$4,94 \cdot 10^{-5}$
sol séché	<u>Arrhenatherum</u>	6,6	$4,07 \cdot 10^{-5}$
	piloselle	19,2	$11,84 \cdot 10^{-5}$

Tableau 22 : CONCENTRATION DES EXTRAITS AQUEUX DE SOL EN COMPOSES
PHENOLIQUES.

			Réactifs		
taches	visible	UV	$\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe(CN)}_6$	p-nitraniline	p-nitraniline + carbonate de Ca
H.p	1	-	bleu	bleu	-
	2	jaune	jaune foncé	bleu	jaune pâle
	3	-	bleu violacé	bleu	jaune foncé
	4	-	bleu	bleu(?)	mauve
	5	-	bleu	bleu	orange
A.e	1	-	bleu	bleu	-
	2	jaune	jaune foncé	bleu	jaune pâle
	3	-	bleu violacé	bleu	jaune foncé
	4	-	bleu	bleu(?)	mauve
	5	-	bleu	bleu	orange

Tableau 23 : COLORATION DES TACHES DES CHROMATOGRAMMES DES COMPOSES
PHENOLIQUES DES SOLS DE PILOSELLE ET D'Arrhenatherum

elatus.

H.p = piloselle

A.e = Arrhenatherum elatus



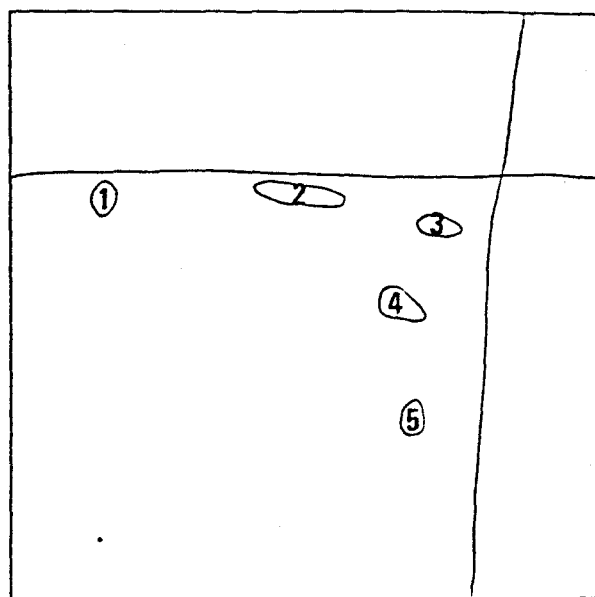


Figure 25 : CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR CELLULOSE DES COMPOSES PHENOLIQUES DE L'EXTRAIT DE SOL D'Arrhenatherum elatius.

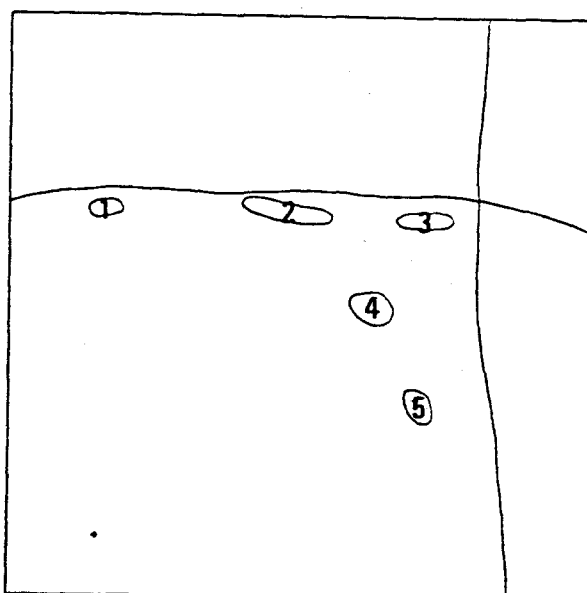


Figure 26 : CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR CELLULOSE DES COMPOSES PHENOLIQUES DE L'EXTRAIT DE SOL DE PILOSELLE.



extraits aqueux de sol humide.

- Chromatographie bidimensionnelle des composés phénoliques des extraits aqueux de sol séché

Les chromatogrammes des composés phénoliques des extraits aqueux de sol séché de piloselle et d'Arrhenatherum elatius (figure n°25 et n°26, tableau n°23) sont semblables : dans les deux cas, 5 composés sont décelés, dont 4 de nature phénolique (coloration bleu avec le révélateur $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$).

Le composé 2 présente une coloration jaune en visible; ce pourrait donc être un flavonoïde. Les colorations obtenues (tableau n°23) ne sont pas identiques à celle du composé NS (tableau n°11, chapitre III). Le R_f dans l'acide acétique à 15% du composé 2 est de 0,50 contre 0,70 pour le composé NS dans le même solvant. Le composé 2 ne semble donc pas être le composé NS isolé précédemment (chapitre III).

Le composé 3 présente les mêmes colorations que l'acide protocatéchique mais le R_f de ce composé dans l'acide acétique est différent de celui de l'acide protocatéchique.

Sur les deux chromatogrammes, aucune tâche ne présente les caractéristiques de l'ombelliférone ou du glucose-7 ombelliférone.

III.- DISCUSSION

Le sol de la pelouse à piloselle ne présente pas dans nos conditions expérimentales de toxicité vis à vis de la germination et de la croissance de l'Arrhenatherum elatius.

Les extraits aqueux de sol n'ont aucun effet inhibiteur sur l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum elatius; l'ombelliférone, si elle est présente dans

ces extraits, est donc à une concentration inférieure à 10^{-7} mole/litre (Tests de toxicité, chapitre III). Or le dosage au Folin-Ciocalteu des composés phénoliques des extraits aqueux de sol révèle des teneurs, suivant les extraits, de $2,34 \times 10^{-5}$ à $11,84 \times 10^{-7}$ mole/litre d'équivalent d'ombelliférone : à ces concentrations l'ombelliférone est inhibiteur de l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum elatius, ce qui amène à penser que les extraits aqueux de sol contiennent principalement des composés phénoliques autres que l'ombelliférone.

Les chromatographies bidimensionnelles confirment cette hypothèse ; plusieurs composés phénoliques sont mis en évidence mais aucun ne correspond à de l'ombelliférone ou à de la skimine. D'autre part, il ne semble pas exister de différence dans la nature des composés phénoliques extraits des sols de piloselle et d'Arrhenatherum elatius : dans les deux cas, on obtient les mêmes spots sur les chromatogrammes. Par contre, il semble exister une différence dans la quantité de composés phénoliques présents dans les deux types de sol : le sol sous Hieracium pilosella en contient davantage que celui sous Arrhenatherum elatius.

Un flavonoïde est détecté mais il ne semble pas être identifiable au composé NS isolé dans le chapitre III.

Nos résultats confirment donc ceux de Makepeace et al, ces auteurs ne retrouvent pas d'ombelliférone dans le sol de la pelouse à piloselle, mais s'ils notent sur le terrain la présence de plantes présentant des déformations identiques à celles provoquées en laboratoire, nous n'avons pas, dans notre cas, remarqué dans la pelouse à piloselle d'Arrhenatherum elatius montrant des malformations.

Par contre, nous n'obtenons pas les mêmes résultats que Becker et al, ces auteurs trouvent les extraits aqueux de sol de la pelouse à piloselle toxiques vis à vis de certaines plantes or nos extraits ne montrent aucun effet inhibiteur sur l'Arrhenatherum elatius. Ceci est-il dû aux natures différentes

des sols dans les deux cas ou les piloselles des terrils sont-elles différentes de celle de la pelouse à Brachypodium pinnatum?

La xéricité du milieu pourrait, peut-être, expliquer à elle seule l'élimination des plantes de la pelouse à piloselle du terril, une approximation de la teneur en eau des sols (différence entre poids humide et poids sec/poids humide) montre que celle-ci passe de 16,9% au début du mois de mai à 2,7% au début du mois de juin (1985).

IV.- CONCLUSION

Il a été montré, précédemment, que la piloselle contenait des substances phytotoxiques pour l'Arrhenatherum elatius et qu'elle pouvait exsuder par ces racines une substance inhibitrice pour cette graminée. Mais le sol de la piloselle ne semble pas contenir ces substances, ou tout au moins ne les contient pas en quantité importante.

CHAPITRE VI

CULTURES EXPERIMENTALES DE PILOSELLE ET D'ARRHENATHERUM ELATIUS

Il a été montré précédemment que la piloselle possédait des composés phytotoxiques pour l'Arrhenatherum elatius et qu'une substance, allélopathique pour cette graminée, était susceptible d'être exsudée dans l'environnement de la piloselle par le système racinaire de cette dernière. Pourtant le sol de terril de la pelouse à piloselle ne révèle aucune toxicité vis à vis de la germination et de la croissance de l'Arrhenatherum elatius, et si des composés phénoliques sont détectés aucun ne semble correspondre aux substances isolées précédemment. La piloselle, sur le terril, n'est donc pas allélopathique mais peut, peut-être, influencer sur le développement de l'Arrhenatherum elatius par un autre mécanisme (compétition...)?

Pour répondre à cette question et étudier les interférences possibles entre la piloselle et la graminée, des cultures pures de piloselle et d'Arrhenatherum elatius ainsi que des cultures mixtes ont été réalisées. Le schéma expérimental est celui de Witt (1960), avec ou sans le dispositif de Snaydon (1979) pour séparer les effets des interactions des différentes parties de la plante (feuilles et racines). Cette méthode ne permet pas de séparer les différents mécanismes d'interactions possibles (compétition, parasitisme, allélopathie...) entre les deux plantes étudiées mais montre si globalement une des deux espèces végétales peut avoir une action sur l'autre espèce végétale.

I. MATERIELS ET METHODES

Des cultures mixtes de piloselle et d'Arrhenatherum elatius ont été réalisées de deux manières :

- en condition stérile : la comparaison de ces cultures avec des monocultures de piloselle et d'Arrhenatherum elatius permet d'étudier les interférences entre ces deux plantes sans l'influence des microorganismes.

- en condition non stérile avec le dispositif de Snaydon : ce dispositif expérimental permet d'étudier les interactions entre deux plantes et de séparer les effets des différentes parties des plantes en interposant divers types de cloisons entre les plantes croissant dans un même milieu.

Les protocoles expérimentaux sont décrits en annexe 15.

II. RESULTATS

II.1. Etude des interférences entre la piloselle et l'Arrhenatherum elatius en condition stérile

Les résultats des cultures pures et mixtes de piloselle et d'Arrhenatherum elatius sont résumés dans le tableau n°24, la figure n°27 en donne une représentation graphique.

La présence de la piloselle n'a pas d'effet négatif perceptible sur la croissance de l'Arrhenatherum elatius. En culture mixte, ce développement n'est pas inhibé mais il est, au contraire, favorisé.

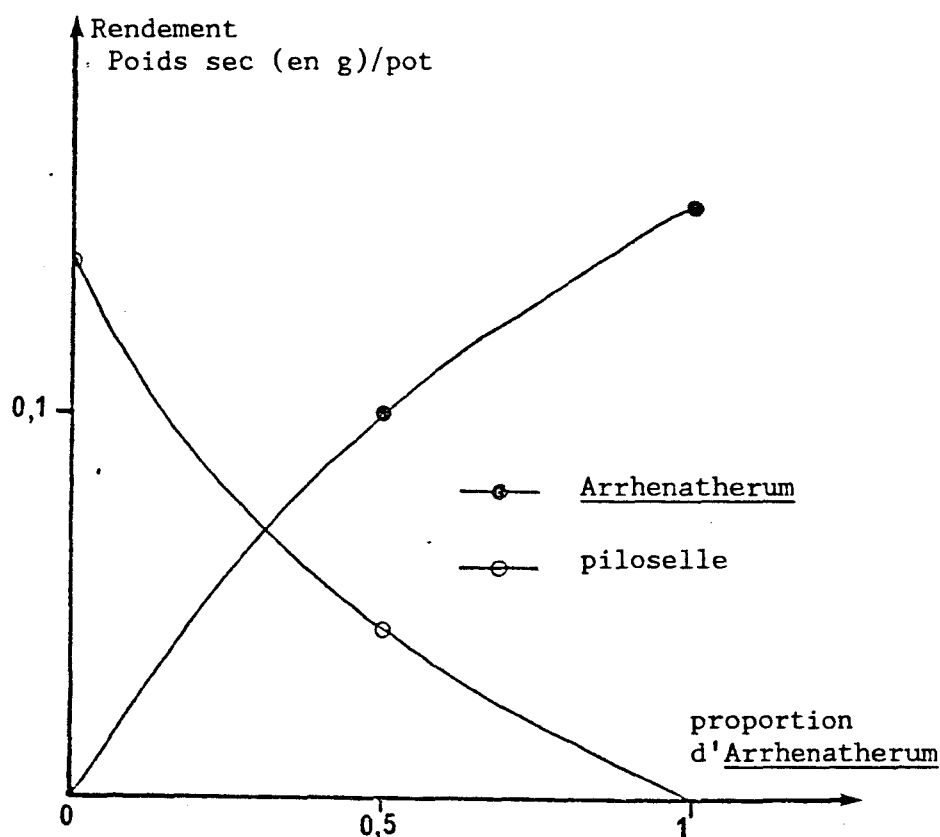


Figure 27 : RENDEMENT DE L'Arrhenatherum elatius ET DE LA PILOSELLE EN CULTURE PURE ET MIXTE.

	poids secs			
	piloselle		<u>Arrhenatherum elatius</u>	
	culture mixte	culture pure	culture mixte	culture pure
n	21	42	21	50
$\bar{x}$	0,0442	0,0697*	0,1002	0,0768*
σ	0,0172	0,0254	0,0169	0,0254

Tableau 24 : POIDS SECS DES PLANTS D'Arrhenatherum ET DE PILOSELLE EN CULTURE MIXTE ET EN CULTURE PURE.

n = nombre de plantes pesées

$\bar{x}$ = moyenne des poids secs en g

σ = écart type

* = au niveau de $\alpha = 0,05$ le t (teste de Student) observé est supérieur au t théorique, la moyenne des poids secs en culture pure est différente de celle en culture mixte

L'effet de l'Arrhenatherum elatius sur la piloselle est supérieur à l'effet de la piloselle sur elle-même et l'effet de la piloselle sur l'Arrhenatherum elatius est inférieur à l'effet de l'Arrhenatherum sur lui-même (figure n°27). A partir du tableau n°24, on peut calculer le RYT (Relative Yield Total) comme suit :

Soit Pa et Pp les productions respectives de l'Arrhenatherum elatius et de piloselle en culture pure,

Soit Aa et Ap les productions respectives de l'Arrhenatherum elatius et de la piloselle en culture mixte.

$$RYT = \frac{Pa}{Pp} + \frac{Aa}{Ap} = 0,32 + 0,69 = 0,97$$

Ce RYT est voisin de 1. Il y a identité des niches, les deux plantes interfèrent donc pour les mêmes ressources du milieu.

Dans ces cultures stériles (sans l'intervention de microorganismes) sur un milieu assez pauvre en éléments nutritifs et théoriquement plus favorable à la piloselle (la piloselle est capable de se développer sur des milieux plus pauvres en éléments minéraux que l'Arrhenatherum elatius), l'Arrhenatherum elatius se développe au détriment de la piloselle. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la partie aérienne de l'Arrhenatherum elatius plus volumineuse que celle de la piloselle occupe toute la fiole : il y aurait compétition pour la lumière et peut-être également pour l'espace.

Il a été démontré également (chapitre IV) que la piloselle était capable, par ses racines, d'exsuder dans le milieu une substance phytotoxique. D'autre part, le milieu étant stérile, il ne peut y avoir dégradation de cette substance par des microorganismes. Dans les fioles de culture, les racines des deux espèces sont en étroit contact les unes avec les autres, la substance

phytotoxique se trouve être, dans l'expérience, dans des conditions favorables pour agir : or, dans ces conditions, l'effet allélopathique de substances phytotoxiques (notamment la skimine) ne peut pas être mis en évidence. On peut donc douter qu'elle puisse jouer un rôle dans la dynamique végétale?

II.2. Cultures mixtes de piloselle et d'Arrhenatherum elatius

Les résultats des cultures mixtes avec et sans séparation sont résumés dans le tableau n°25.

		poids secs		
		n	x	σ
piloselle	séparation racine	12	0,196	0,083
	séparation feuille	11	0,267	0,112
	séparation racine-feuille	12	0,244	0,127
	sans séparation	13	0,196	0,117
<u>Arrhenatherum</u>	séparation racine	12	1,053	0,302
	séparation feuille	11	1,523	0,400
	séparation racine-feuille	12	0,930	0,186
	sans séparation	13	1,551	0,382

Tableau 25 : POIDS SECS DES PLANTS DE PILOSELLE ET D'Arrhenatherum.



n = nombre de plantes pesées

x = moyenne des poids secs en g

σ = écart type

La comparaison des différents résultats montre que :

- les avoines élevées, dans les pots avec séparation du feuillage et dans ceux sans séparation ont des poids secs presque identiques,
- les avoines élevées, dans les pots avec séparation des racines et dans ceux avec séparation des racines et des feuilles ont des poids secs voisins, mais inférieurs à ceux des avoines élevées précédentes. Les différences sont statistiquement significatives (test de Student = 0,05).
- les piloselles dans les pots avec séparation des feuilles et dans ceux avec séparation des feuilles et des racines ont des poids secs voisins.
- les piloselles dans les pots avec séparation des racines et dans ceux sans séparation ont des poids secs identiques, ces poids secs sont inférieurs à ceux des piloselles précédentes mais les différences ne sont pas statistiquement significatives (test de Student).

L'Arrhenatherum elatius se développe donc mieux lorsqu'il n'y a pas de séparation entre les racines des deux plantes et n'apparaît pas gêné par la présence de la piloselle. Il y a donc un effet "séparation des racines" négatif sur Arrhenatherum elatius : il aurait fallu également réaliser les traitements d'une plante d'Arrhenatherum dans un pot et de deux plantes dans un autre pot. La piloselle semble affectée par la présence de l'Arrhenatherum elatius lorsqu'il n'y a pas de séparation entre les parties aériennes des deux plantes mais les diminutions de poids secs ne sont pas significatives pour $\alpha = 0,05$.

III.- DISCUSSION

Les cultures mixtes stériles mettent en évidence une compétition pour la lumière entre la piloselle et l'Arrhenatherum elatius, celui-ci se montre plus compétitif que la piloselle. L'expérience ne permet pas de mettre en évidence une phytotoxicité de la piloselle vis à vis de l'Arrhenatherum elatius.

La deuxième expérience ne permet pas, elle non plus, de mettre en évidence une quelconque phytotoxicité de la piloselle. Comme dans le cas précédent, la piloselle semble gênée dans sa croissance par la présence du feuillage de l'Arrhenatherum elatius, ce qui indiquerait une compétition pour la lumière. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Makepeace et al (1985), ces auteurs concluent à la suite de leurs expérimentations en conditions contrôlées que le trèfle supprime la piloselle par compétition pour la lumière.

Dans la deuxième expérience, l'Arrhenatherum elatius se développe mieux lorsqu'il n'y a pas séparation des systèmes racinaires des deux plantes et ne semble pas affecté par la présence de la piloselle (qui n'est pas gênée par les racines de l'Arrhenatherum elatius) : les poids secs des cultures avec séparation des feuilles et ceux des cultures sans séparation sont voisins. Le système que nous avons utilisé ne tient pas compte d'un facteur : la quantité de nutriments disponibles, le développement de l'Arrhenatherum elatius dépendant plus de ce facteur que de la présence de la piloselle.

IV.- CONCLUSION

Les résultats obtenus confirment ceux du chapitre précédent, la piloselle, dans les conditions expérimentales, ne montre aucun effet phytotoxique vis à vis de l'Arrhenatherum elatius. La piloselle semble même dans les cultures mixtes gênée par la présence de l'Arrhenatherum (compétition pour la lumière).

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

La télétoxicité de la piloselle, démontrée par Becker et al, ne semble pas pouvoir expliquer, dans le cas des terrils houillers, le passage de la friche haute à Arrhenatherum elatius à la pelouse rase à Hieracium pilosella. Nos résultats nous amènent même à douter de l'allélopathie de la piloselle :

- il a été possible d'isoler des organes souterrains de la piloselle deux substances phytotoxiques (un flavonoïde et de l'ombelliférone). Ces composés sont aussi présents dans les organes aériens de la plante (Haag-Berrurier, 1964).

- ces deux composés ne sont pas rejetés dans l'environnement par les racines. Par contre la piloselle est capable d'exsuder une autre substance (la skimine) qui est phytotoxique pour l'Arrhenatherum elatius. Nous n'avons pas étudié le phénomène du lessivage des feuilles. Makepeace, Dobson et Scott (1985) ont montré dans leurs études que les lessivats de feuilles vivantes ne contenaient pas de substances phytotoxiques. De même que les lessivats de feuilles, l'étude du passage des substances par voie aérienne (volatilisation) n'a pas été étudiée: les composés toxiques isolés de la piloselle (composés phénoliques) ne sont pas volatils.

- le sol sous la piloselle ne montre, dans nos expériences, aucune toxicité vis à vis de la germination et du début de la croissance de l'Arrhenatherum elatius. L'analyse des composés phénoliques, du sol de piloselle, ne permet pas de déceler l'ombelliférone et la skimine, ce qui confirme les travaux de

Makepeace, Dobson et Scott (1985). Un flavonoïde est décelable dans le sol sous la piloselle, ainsi que dans celui sous Arrhenatherum elatius, il ne semble pas être identifiable au flavonoïde phytotoxique isolé de la piloselle. Becker et al notent, dans leurs expériences, une déformation des plantules arrosées avec un extrait de piloselle. Becker, Makepeace, Dobson et Scott (1985) constatent sur le terrain, que les plantes dans la pelouse à piloselle ont le même aspect que celles mises en présence d'ombelliférone au laboratoire. Sur le terril nous n'avons pas trouvé de différences entre l'aspect des avoines élevées des pelouses à piloselle et celui des avoines élevées des friches.

- les expériences réalisées au laboratoire permettent, dans les conditions expérimentales, de mettre en évidence une interférence entre la piloselle et l'Arrhenatherum elatius. Mais les résultats obtenus sont contraire à ceux attendus : l'avoine élevée domine la piloselle dans les cultures mixtes.

L'objectif fixé au début de ce travail fût d'investiguer l'allélopathie de la piloselle, notamment l'allélopathie vraie négative, afin de démontrer la réalité de ce phénomène. Nous avons pour cela adopté un protocole allant de la plante vers le sol :

- i - analyse des substances phytotoxiques dans la plante
- ii - étude du rejet de substances phytotoxiques par la plante
- iii - analyse de la toxicité du sol sous la piloselle.

A la suite de nos travaux, plutôt qu'utiliser une telle démarche, il nous semble préférable :

- de ne pas rechercher dès le départ un type d'allélopathie
- de partir du sol et de l'environnement ; analyse des substances toxiques

présentes dans le sol et étude expérimentale de l'influence de ces composés sur la croissance et la morphologie des plantes, puis recherche des symptômes décelés dans le milieu naturel.

En effet, rechercher des substances allélopathiques dans une plante est discutable : on peut isoler et identifier dans l'environnement une substance ayant une activité allélopathique et avoir décelé dans la plante des substances allélopathiques différentes de celle agissant dans la nature. Par contre après démonstration de l'activité allélopathique "in situ" d'un composé, il est indispensable d'établir sa filiation avec une plante émettrice. Cette étude permettra de connaître le type d'allélopathie en présence duquel on se trouve.

Bien que les variations du rejet de skimine n'ont pas été étudiées, les quantités de skimine exsudées sont très faibles et ne se retrouvent pas dans le sol de la pelouse à piloselle.

Les échantillons d'Arrhenatherum elatius (pelouse et friche de terril, friche du campus) ont donné des réponses similaires dans les tests d'influences de la pression osmotique et dans ceux de toxicité d'extraits aqueux. Il ne semble pas exister à ce niveau de différence entre populations.

Les remarques nous amènent à penser que l'exsudation de skimine dans le sol de la pelouse à piloselle ne doit pas avoir d'impact évolutif sur les populations d'Arrhenatherum elatius.

La substitution de la friche Arrhenatherum elatius par la pelouse rase à Hieracium pilosella ne semble donc pas être due à un phénomène allélopathique ni à une compétition de la piloselle vis à vis de l'Arrhenatherum elatius. Celle-ci serait plutôt sous la dépendance de facteurs édaphiques.

ANNEXES

ANNEXE 1

Tests de l'effet de la pression osmotique sur la germination et l'élongation racinaire de l'Arrhenatherum elatius et du radis

1. Le matériel végétal :

Trente graines d'Arrhenatherum elatius ou de radis sont disposées dans une boîte de Pétri (diamètre de 90 mm) dont le fond est recouvert d'un papier filtre (Whatman 44 asless) imbibé de 3,5 ml de solution à tester. Un témoin est réalisé en remplaçant la solution à tester par de l'eau distillée (pression osmotique égale à 0 atm).

2.- Conditions de germination et de croissance :

Les boîtes de Pétri sont ensuite placées dans les conditions suivantes :

- température de 22°C le jour et de 19°C la nuit
- lumière 16 heures par période de 24 heures.

3.- Observations :

L'élongation racinaire ainsi que le nombre de graines germées sont déterminés au bout de 4 à 5 jours. Les résultats obtenus sont comparés au témoin "eau distillée".

ANNEXE 2

Solution nutritive de HOAGLAND (in GAMBORG et WETTER, 1975)

macroéléments:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	4 mM.....	0,94 g/l
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	2 mM.....	0,52 g/l
KNO_3	5 mM.....	0,66 g/l
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 mM.....	0,12 g/l

Fer chélaté

.Na EDTA.....	6,45 g/l
.FeSO ₄	4,96 g/l

1 ml de cette solution
doit être ajouté dans
un litre de milieu de
Hoagland

microéléments:

H_3BO_3	38 g/l
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	34 g/l
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	1 g/l
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	2,2 g/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$	1 g/l
H_2SO_4 (concentré).....	5 ml

0,1 ml de la solution mère de microéléments est ajouté à un litre de solution contenant les macroéléments et le pH est ajusté à 6,7 avec NaOH 0,1 N.

ANNEXE 3

Mode de préparation des extraits aqueux de piloselle et de sols

Les extraits aqueux de piloselle ont été préparés selon deux modalités (méthode Becker et al modifiée) :

(a) à partir du matériel frais : des racines fraîches ou un mélange rhizome-racine sont broyés dans quatre fois leur poids d'eau distillée pendant 10 minutes à 30°C. Le broyat est ensuite filtré et la solution récupérée.

(b) à partir d'une poudre obtenue à partir de matériel séché à la température du laboratoire et agitée dans cinq fois son poids d'eau distillée pendant une heure à 30°C. La solution est ensuite filtrée.



Des échantillons de sols au contact des racines de Hieracium pilosella et d'Arrhenatherum elatius sont prélevés sur le terroir d'Haveluy. Au laboratoire, ils sont séchés à la température ambiante et tamisés (maille de 2 mm), les morceaux de racines sèches sont soigneusement retirés. Les extraits sont obtenus par agitation des échantillons (séchés et tamisés) dans leurs poids d'eau distillée pendant 1 heure à 30°C puis filtration.

ANNEXE 4

Mode de préparation des extraits aqueux de racine et du mélange racine-rhizome de piloselle

- 10 g de racines fraîches ou du mélange racine-rhizome frais, débarrassés de la terre adhérente et lavés à l'eau distillée, sont broyés dans un waring blender en présence de 80 ml d'eau distillée. Le broyat est ensuite centrifugé à 6000 tr/mn pendant 15 minutes, le surnageant est repris et le volume final est ajusté à 100 ml. Ces extraits sont dits à concentration égale à 100 g/l.

ANNEXE 5

Dosage des composés phénoliques

Le réactif de Folin-Ciocalteu est sensible aux composés phénoliques mais non spécifique (réactions avec certains sucres, acides aminés et acides organiques). L'interférence de ces substances a été levée grâce à l'utilisation de la méthode décrite par Melin (1976) (figure n°28) :

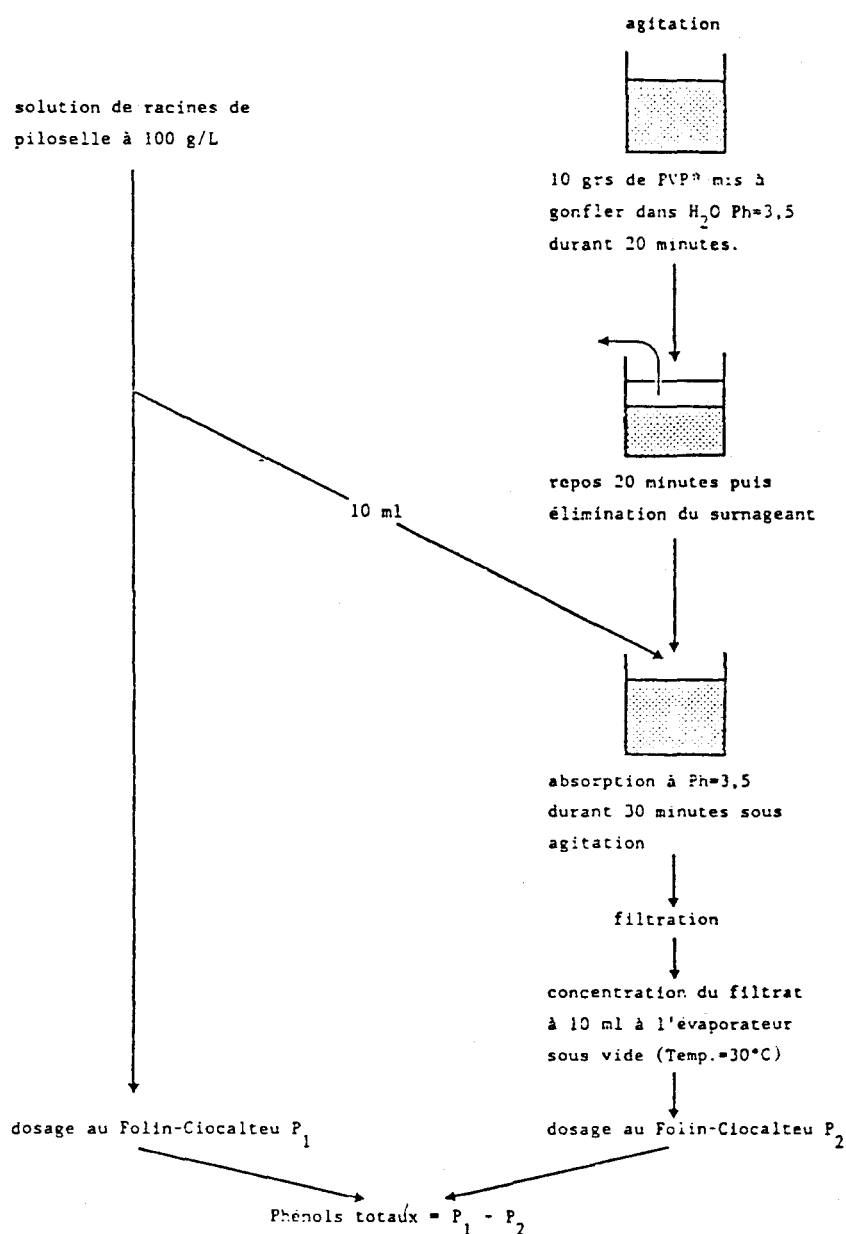
Cet auteur utilise du Polyclar (AT) pour absorber spécifiquement les dérivés phénoliques d'un extrait végétal. Par dosage différentiel au Folin (avant et après passage sur Polyclar) la quantité de composés peut être déterminée.

Des courbes étalons ont été réalisées avec de l'acide chlorogénique et de l'ombelliférone, les résultats ont été exprimés en équivalent de ces substances.

Protocole expérimental :

Dosage au Folin-Ciocalteu

- acide chlorogénique, solution à doser
 - solution d'acide-chlorogénique (0,1 à 1 mg/ml)
 - 0,1 ml
 - solution à doser
 - + 3,5 ml H₂O
 - + 0,5 ml Na₂ CO₃ à 20%
 - repos 3 minutes
 - + 0,5 ml réactifs Folin-Ciocalteu
 - incubation à 40°C pendant 30 minutes
 - lecture à 760 nm
- Ombelliférone
 - 0,4 ml de solution d'ombelliférone (0,01 à 0,1 mg/ml)
 - + 3,2 ml H₂O
 - + 0,5 ml Na₂ CO₃ à 20%
 - repos à 3 minutes
 - + 0,5 ml réactif Folin-Ciocalteu
 - incubation à 40°C pendant 30 minutes
 - lecture à 760 nm



* Le PVP utilisé est traité 15 minutes à $100^{\circ}C$ sous reflux par HCl 10%, il est ensuite lavé à l'eau distillée et à l'acétone puis séché à l'étuve. La conservation s'effectue à l'abri de la lumière sous pression réduite.



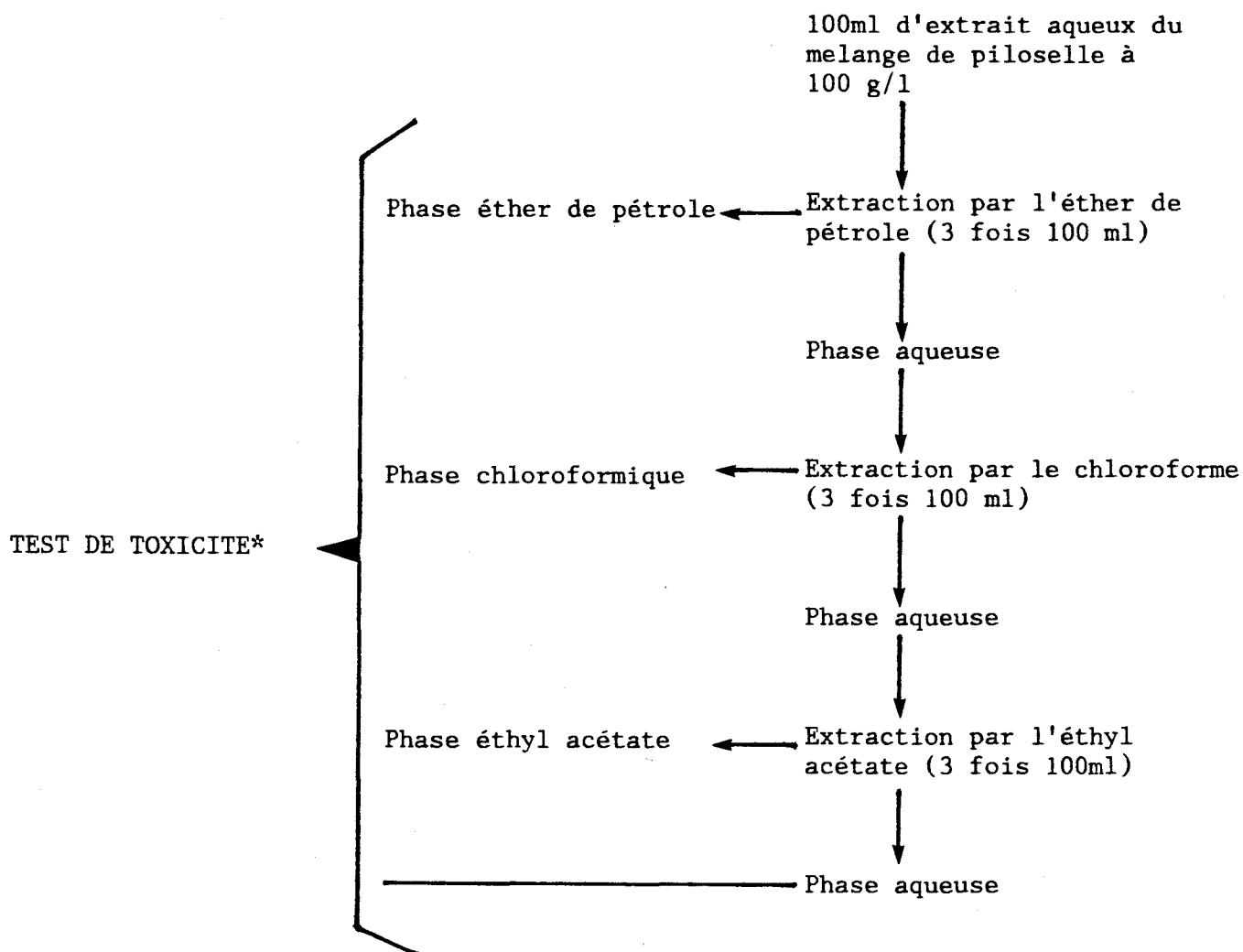
Figure 28 : DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES (Melin, 1976)

ANNEXE 6

Fractionnement de l'extrait aqueux du mélange racine-rhizome de piloselle et test de toxicité

* Test de toxicité

L'équivalent de 3,5 ml de solution du mélange à 100 g/l est déposé sur un papier filtre dans une boîte de pétri. Le solvant évaporé sous un flux d'air chaud, est remplacé par 3,5 ml d'eau distillée. Les tests de toxicité sont ensuite réalisés comme nous l'avons décrit en annexe 1.



ANNEXE 7

Isolement des substances inhibitrices de la fraction toxique

- Chromatographie sur colonne

Comme dans le chapitre II, le gel LH20 a été choisi.

Lattanzio (1981) a utilisé ce gel avec comme éluant le mélange eau-éthanol (50%, v/v) à pH = 4 (H3 PO4) pour séparer des composés phénoliques, le même système d'élution a été retenu mais le pH n'a pas été ajusté à 4.

L'éluant a été appliqué à un débit de 28 ml/h sur une colonne de diamètre égal à 2,6 cm et haute de 37 cm, les substances ont été détectées en U.V. (254nm).

Une solution éthanolique représentant l'équivalent de 95 ml d'extrait aqueux de racines à 100 g/l a été concentrée à l'évaporateur sous vide à 2 ml et chromatographiée dans les conditions définies ci-dessus. Sur les fractions des différents pics obtenus par la chromatographie et sur la fraction NS, des tests de toxicité ont été effectués comme décrit dans l'annexe 6 afin de déterminer les fractions inhibitrices.

- Chromatographie sur couche mince

Les chromatographies bidimensionnelles sur cellulose ont été réalisées dans les conditions suivantes :

- 1ère migration dans le solvant acide acétique à 15%
- 2ème migration dans le solvant B.A.E. (n butanol 6, acide acétique 1, eau 2)

Les chromatogrammes, après lecture en U.V. et pulvérisation de réactifs (p.nitraniline diazotée, Fe Cl3 - K3 Fe (CN)6) ont permis de montrer que cette fraction renfermait deux substances.

ANNEXE 8

Détermination des substances phytotoxiques isolées de l'extrait aqueux du mélange racine-rhizome de piloselle

Les substances isolées ont été chromatographiées (avant et après hydrolyse acide*) sur plaque de cellulose dans différents solvants :

- acide acétique à 15%
- n butanol-acide acétique-eau (6-1-2)
- Forestal
- benzène-acide acétique-eau (7-6-3)

Après séchage, les chromatogrammes ont été observés en U.V. à 360 nm (avant et après pulvérisation d'ammoniaque) et après vaporisation de divers réactifs**. Les valeurs de R_f, les fluorescences en U.V. et les couleurs des taches repérées après application de chaque réactif ont été notées.

Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux de composés phénoliques disponibles dans le commerce.

Un spectre U.V., dans le chloroforme et dans l'éthanol, de l'aglycone obtenu après hydrolyse de NS a été réalisé et comparé avec celui de l'apigénine du commerce.

- analyse des glucides libérés par l'hydrolyse acide du composé NS.

Après l'extraction de l'aglycone par l'éther éthylique, la fraction aqueuse acide est reprise et l'acide-chlorhydrique est éliminé selon la méthode décrite par Ribereau-Gayon (1968). Une partie aliquote de la solution aqueuse est chromatographiée, ainsi que des sucres témoins (glucose, arabinose, rhamnose, mannose, fructose), sur une plaque de cellulose dans le solvant éthylacétate-pyridine-eau (2-1-2). Les glucides sont révélés par la pulvérisation d'un réactif à l'aniline***. Les R_f et les colorations sont notées.

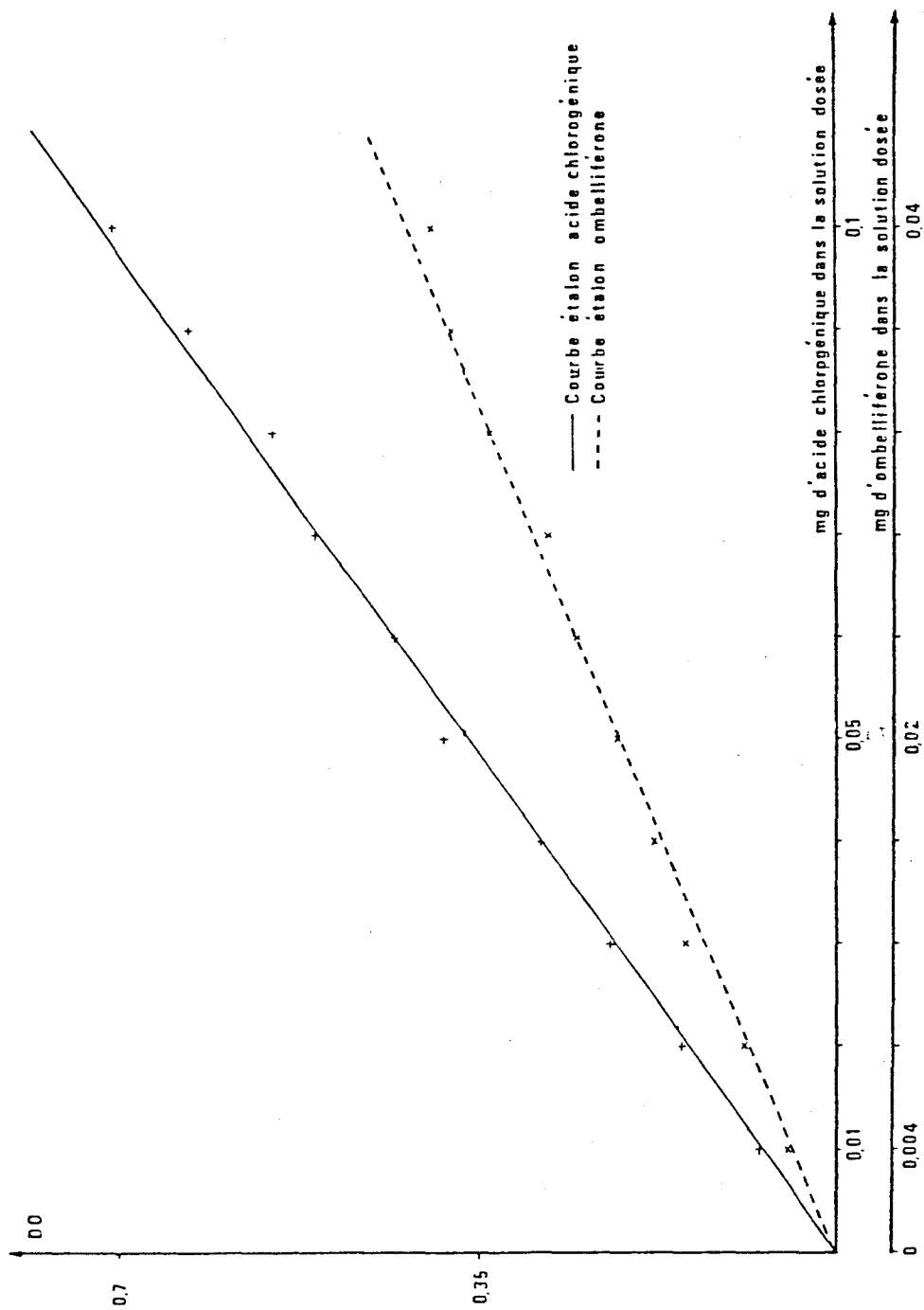
* L'hydrolyse acide est conduite en milieu HCl 2N à 100°C pendant 1 heure, après refroidissement les aglycones apparues sont extraites par l'éther éthylique.

** réactifs utilisés : ammoniaque, p-nitraniline diazotée, p-nitraniline diazotée + carbonate de sodium à 15%, carbonate de sodium à 15%, FeCl₃·K₂Fe(CN)₆. (Les réactifs ont été préparés selon les protocoles décrits par Ribereau-Gayon (1968)).

*** réactif à l'aniline : aniline 4ml, diphenyl-amine 4g, acétone 200ml, H₃PO₄ à 85% 30ml. Après pulvérisation, la plaque de cellulose est mise à l'étuve à 110°C pendant 10mn.

ANNEXE 9

Dosage des composés phénoliques Courbes étalons de l'acide-chlorogénique et de l'ombelliférone



ANNEXE 10
Culture hydroponique stérile de Hieracium pilosella

Des graines de piloselle, désinfectées avec une solution aqueuse d'hypochlorite de calcium (30 g/l), sont mises à germer stérilement dans des boîtes de pétri contenant du papier filtre imbibé d'eau.

Dix jours après la germination, les plantules sont repiquées aseptiquement sous une hotte à flux laminaire dans des tubes (diamètre de 22 mm, hauteur 350 mm) contenant 25 ml de solution de Hoagland diluée de moitié. Le support des plantules est réalisé avec du papier Whatman n°3 (figure 29), un papier aluminium entoure la base du tube et abrite ainsi les racines de la lumière.

Les tubes sont ensuite placés dans des conditions d'éclairement de 16 h de lumière par 24 h et à une température constante de 22°C.

Un mois et demi après le repiquage des piloselles la solution de culture est récupérée et analysée. L'axénie des cultures est vérifiée par l'absence de trouble dans les solutions de culture contenues dans les tubes.



Figure 29 : PILOSELLE EN CONDITION DE CULTURE
STERILE.

ANNEXE 11

Elimination des éléments minéraux de la solution de culture de Hieracium pilosella

On ajoute 500 ml de NaOH (0,3 N) et 250 ml d'une solution de sulfate de zinc (0,3 M) à 825 ml de solution de culture, un précipité blanc apparaît. La solution obtenue est ensuite centrifugée à 5000 g pendant 10 minutes.

Le surnageant est repris et concentré à l'évaporateur sous vide (à 35°C) à un volume de 300 ml, puis une deuxième défécation est réalisée. Après la centrifugation, le surnageant, acidifié par HCl concentré à un pH compris entre 2 et 3, est affronté dans une ampoule à décanter à de l'éther éthylique (3 fois 600 ml). La phase étherée, contenant les composés phénoliques, est concentrée à sec à l'évaporateur sous vide (à 35°C). Le dépôt est ensuite repris par 5 ml d'eau distillée et analysé.

ANNEXE 12

Analyse de la solution de culture de Hieracium pilosella

Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince

La chromatographie a été effectuée sur une plaque de cellulose (épaisseur de 0,2 mm). Nous avons utilisé en première dimension le solvant n butanol-acide acétique-eau (6-1-2) et en deuxième dimension le solvant acide acétique à 15%. Après chromatographie, la plaque de cellulose est examinée en lumière U.V. (324 nm) puis le révélateur Fe Cl₃ - K₃ (CN)₆ est pulvérisé. Les colorations sont notées.

Chromatographie liquide haute pression

Nous avons utilisé un appareil de marque Varian et un système en phases inversées (colonne Waters à compression radiale, type 8 NVC 18).

La solution concentrée de culture de piloselle a été filtrée à 0,22 µm puis chromatographiée dans les conditions suivantes :

- solvant A 75% : eau + acide acétique (1,5%)
- solvant B 25% : méthanol
- débit : 1,7 ml/mn
- pression : 96 atmosphères
- détection : U.V. à 280 nm
- injection : 10 µl de solution
- avance du papier

de l'enregistreur: 10 mm /mn

Afin d'orienter l'identification des substances mises en évidence, la colonne a été étalonnée avec un mélange de 13 composés phénoliques (*). Ce mélange a été réalisé par l'addition d'un millilitre de chacune des 13 solutions de phénols, les solutions ont été obtenues en dissolvant 25mg de composés phénoliques dans 100ml d'eau pure. La chromatographie a été effectuée dans les conditions suivantes:

- de l'injection (temps = 0) à temps = 25 minutes :
 - solvant A 75% : eau + acide acétique (1,5%)
 - solvant B 25% : méthanol
- à partir du temps = 25 minutes :
 - gradient de méthanol pour être à 100% de méthanol au temps=40 minutes
- débit : 1,7 ml/mn
- pression : 84 atmosphères
- détection : U.V. à 280 nm
- injection : 10 µl de solution
- avance du papier de
- l'enregistreur : 10 mm/mn

Les résultats obtenus avec les composés de la solution de culture ont ensuite été comparés à ceux du mélange.

Une comparaison de nos résultats et de ceux de Wulf et Nagel (1976) a aussi été réalisée. Ces auteurs ont séparé différents composés phénoliques sur une colonne Waters µBondapak/C18 avec le solvant eau-acide acétique (95:5).

* composés phénoliques testés : acide gallique, acide chlorogénique, acide p-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide caféique, acide syringique, ombelliférone, acide p-coumarique, acide férulique, acide m-coumarique, coumarine, acide o-coumarique, acide cinnamique.

ANNEXE 13

Mise en évidence de la toxicité du sol sous Hieracium pilosella

La germination de l'Arrhenatherum elatius

Dix blocs de sol (longueur=15cm, largeur=8cm et hauteur=6cm) sont prélevés sur le terril dans les pelouses à piloselle. Les végétaux présents sont otés, six graines d'Arrhenatherum elatius sont déposées sur chacun de ces blocs puis ceux-ci, disposés dans des bacs en plastique et mis en serre.

Au bout de 5 jours, le nombre de graines germées est compté et comparé à deux témoins pour lesquels :

- le sol de piloselle est remplacé par du terreau
- le sol de piloselle est remplacé par du sol d'Arrhenatherum. Avec ce sol, il n'est pas possible d'enlever la végétation des blocs sans en perturber la structure.

La croissance de l'Arrhenatherum

L'élongation du coléoptile de 50 arrhenatherum se développant sur des blocs de sol de piloselle est mesurée quotidiennement à partir du 5^e jour après le semis, pendant 4 jours. La croissance du coléoptile est comparée à celle d'un témoin où le sol de piloselle a été remplacé par du terreau.

ANNEXE 14

Chromatographie bidimensionnelle des composés phénoliques des extraits aqueux de sol séché

L'extrait aqueux de sol de piloselle et d'Arrhenatherum (correspondant à 250 g de sol), acidifié à un pH compris entre 2 et 3 par HCl N, est affronté à de l'éther éthylique (3 x son volume). La solution étherée contenant les composés phénoliques est concentrée à un volume de 2 ml, 80 µl de cette solution concentrée sont déposés sur une plaque de cellulose. Pour la chromatographie bidimensionnelle, nous avons utilisé en première dimension le solvant n butanol-acide acétique-eau (6-1-2) et en deuxième dimension le solvant acide acétique à 15%. Les substances présentes sur les chromatogrammes ont été décelées par l'observation en visible et en U.V. et après pulvérisation de divers réactifs (Fe Cl₃ - K₃ Fe (CN)₆, p-nitraniline, p-nitraniline + carbonate de sodium).

ANNEXE 15

Cultures pures et mixtes de piloselle et d'Arrhenatherum en conditions stériles et non stériles

Cultures stériles

Des graines de piloselle et d'Arrhenatherum elatius préalablement stérilisées à l'hypochlorite de calcium (30 g/l) sont mises à germer stérilement dans des boîtes de pétri. Sept jours après la germination, les graines sont repiquées aseptiquement dans des fioles (Ø: 85 mm, H: 140 mm) contenant 100 ml de milieu nutritif (solution de Hoagland diluée de moitié plus 10 grammes de gélose par litre de milieu).

Les cultures mixtes sont réalisées en plaçant une graine d'Arrhenatherum et une graine de piloselle par fiole et les cultures pures en disposant deux graines de piloselle ou d'Arrhenatherum par fiole.

Les fioles sont ensuite placées dans une enceinte climatisée réglée aux conditions suivantes :

- température de jour de 23°C
- " de nuit de 16°C
- photopériode de 16 heures de lumière par 24 heures

Après un mois de culture, les plantes sont prélevées, séchées à l'étuve à 100°C, puis pesées. Les résultats des cultures mixtes sont comparés à ceux des cultures pures. L'expérience a été répétée deux fois.

Cultures non stériles

Dans des pots en plastique (taille n°13) contenant du terreau, deux plantules (l'une de piloselle, l'autre d'Arrhenatherum âgées de sept jours ont été repiquées).

Trois conditions de culture sont réalisées en plaçant entre les deux plantes des cloisons de PVC

- séparation des racines
- séparation des feuilles et des racines
- séparation des feuilles

Une quatrième condition de culture est obtenue en n'intercalant pas de cloison PVC entre les plantes.

Les pots sont ensuite placés en serre dans les conditions suivantes :

- température de jour de 23°C
- température de nuit de 16°C
- photopériode de 16 heures de lumière par 24 heures

Trois mois après, les plantes sont prélevées. Les systèmes racinaires des piloselles et des Arrhenatherum n'étant pas séparables, seules les parties aériennes sont récoltées et séchées à l'étuve à 100°C. Les poids secs des plantes sont ensuite mesurés et les résultats obtenus comparés entre eux.

L'expérience a été effectuée deux fois.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- BARTHOLOMEW B., 1970.- Bare zone between californian shrub and grassland communities: the role of animals. *Sciences (N.Y)* . 170 : 1210-1212 .
- BELL D.T., 1974.- The influence of osmotic pressure in tests for allelopathy. *Transaction. Ill. State. Acad. Sci.* . 67 (3) : 312-317 .
- BORNER H., 1958.- Experimentelle Untersuchungen zum Problem der gegenseitigen Beeinflussung von Kulturpflanzen und Unkräutern. *Biol. Z.* bl. 77 : 310-328 .
- BECKER Y., L. GUYOT, M. MASSENOT et J. MONTEGUT, 1950.- Sur la présence d'excréments racinaires toxiques dans le sol de la pelouse herbeuse à Brachypodium pinnatum du Nord de la France. *C. R. Acad. Sc.* 231 : 165-167 .
- BECKER Y. et L. GUYOT, 1951a.- Sur les toxines racinaires des sols incultes. *C. R. Acad. Sc.* 232 : 105-107 .
- BECKER Y. et L. GUYOT, 1951b.- Sur une particularité fonctionnelle des exsudats racinaires de certains végétaux. *C. R. Acad. Sc.* 232 (17) : 1585-1587 .
- BECKER Y., J. GUILLEMAT, L. GUYOT et D. LELIEVRE, 1951b.- Sur un aspect phytopathologique du problème des substances racinaires toxiques. *C. R. Acad. Sc.* 233 : 198-199 .
- BECKER Y., L. GUYOT et J. MONTEGUT, 1951a.- Sur quelques incidences phytosociologiques du problème des excréments racinaires. *C. R. Acad. Sc.* 232 (26) : 2472-2474 .
- DALRYMPLE R.L. and J.L. ROGERS, 1983.- Allelopathic effects of western ragweed on seed germination and seedling growth of selected plants. *J of Chem. Ecol.* 9 (8) : 1073-1078 .
- DE CANDOLLE M.A.P., 1832.- *Physiologie végétale*. Bechet Jeune. Lib. Fac. Méd. Paris. III : 1474-1475 .
- DUQUENOIS P. et E. GREIB, 1953.- Sur le principe antibiotique isolé de la piloselle, Hieracium pilosella L. *C. R. Acad. Sc.* 237 (21) : 1354-1355 .

- DUQUENOIS P. et E. GREIB, 1956.- Les principes antibactériens de la piloselle Hieracium pilosella L. Ann. Pharm. Franç. 14 : 685-690 .
- DUQUENOIS P. et M. HAAG-BERRURIER, 1961.- Progrès dans la connaissance de la composition chimique de l'Hieracium pilosella L. XXI Congresso Di Scienze. Farmaceutiche. Pise: 461-467 .
- EVENARI M., 1949.- Germination inhibitors. Bot. Rev. 15 : 153-194 .
- FISHER R.F., 1979.- in Plant Disease Vol IV How pathogens induce disease (HORSFALL J.G. and E.B. COWLING ed) Academic Press .
- GAMBORG O.L. and L.R. WETTER, 1975.- Plant tissue culture methods. Nat. Res. Coun. of Canada. 109p .
- GOODWIN and TAVES, 1950.- The effects of coumarin derivatives on the growth of Avena roots. Amer. J. Bot. 37 : 221-231 .
- GREIB E., 1957.- La piloselle, Hieracium pilosella L. et ses principes antibiotiques dans le traitement de la fièvre ondulante et des brucelloses animales. Thèse. Doc. Univ. Pharmacie. Strsbourg .
- GRESSEL J.B. and L.G. HOLM, 1964.- Chemical inhibition of crop germination by weed seeds and the nature of inhibition by Abutilon theophrasti. Weed. Res. 4 : 44-53 .
- GUYOT L., 1957.- Les microassociations végétales au sein du Brometum erecti. Vegetatio: 7 : 321-354 .
- GUYOT L., 1959.- De l'excretion radicellaire phytotoxique et de ses rapports avec le degré de concentration des extraits aqueux des organes aériens de la plante : C. R. Acad. Sc. 248 : 1392-1394 .
- GUYOT L. et M. MASSENOT, 1950.- Sur la persistance prolongée de semences dormantes dans le sol de la pelouse herbeuse à Brachypodium pinnatum du Nord de la France. C. R. Acad. Sc. 230 : 1894-1896 .
- HAAG-BERRURIER M., 1958.- Mise en évidence d'une forme combinée de l'ombelliférone dans l'Hieracium pilosella L., après stabilisation. C. R. Acad. Sc. 246 (4) : 624-626 .
- HAAG-BERRURIER M., 1964.- Recherches phytochimiques sur la piloselle, Thèse. Doc. Pharm. Strasbourg .
- HAAG-BERRURIER M. et P. DUQUENOIS, 1962.- Extraction et caractérisation physicochimique de la lutéoline dans les fleurs de la piloselle, Hieracium pilosella L.. C. R. Acad. Sc. 254 (19) : 3419-3421 .

- HAAG-BERRURIER M. et P. DUQUENOIS, 1963.- Sur la présence d'un 7- - glucoside de la lutéoline dans les feuilles de la piloselle, Hieracium pilosella L. C. R. Acad. Sc. 257 : 3239-3241 .
- HARBORNE J.B., 1973.- Phytochemical methods. Chapman and Hall Ltd .
- HARBORNE J.B., 1982.- Introduction to Ecological Biochemistry (2nd ed). Academic. Press. pp 207-226 .
- HARPER J.L., 1977.- Population Biology of Plants . Academic. Press. pp 376-378.
- HUNTER C.A.G., 1980.- Studies on the mechanisms of interference between plants. PH. Thesis. Bangor. 161p .
- JANKAY P. and W.H. MULLER, 1976.- The relationships among umbelliferon growth and peroxidase levels in Cucumber roots. 63 (1) : 126-132 .
- LATTANZIO V. and A. MARCHESSINI, 1981.-Determination of plant phenols by gel filtration. J. Food. Sci. 46 (6) : 1907-1909 .
- LOVETT J.V. and K. JOKINEN, 1984.- A modified staircase apparatus for studies of allelopathy and other phytotoxic effects. J. of Agric. Sci. in Finland. 56 : 1-7 .
- MAKEPEACE W., A.T. DOBSON and D. SCOTT, 1985.- Interference phenomena due to mouse-ear and king devil hawkweed. New. Zealand. J. of Bot. 23 : 79-90 .
- MARTIN P. and B. RADEMACHER, 1960.- Studies on the mutual influences of weeds and crops. in "The Biology of Weeds" (J.L. HARPER, ed). Blackwell. Oxford. pp 143-152 .
- MELIN C, 1976.- Les composés phénoliques au cours de la croissance et de la maturation de la cerise, Prunus avium(L.). variété "Bigarreau Napoléon". Thèse. Doc. 3ème cycle. Orléans. 160p .
- MILES J., 1981.- Problems in heathland and grassland dynamics. Vegetatio. 46 : 61-74 .
- MOLISCH H., 1937.- Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie. Gustav. Fischer. Verlag. Jena .
- MULLER C.H., 1965.- Inhibitory terpenes volatilised from Salvia shrubs. Bull. Bot. Club. Torrey. 93 : 332-351 .
- MULLER C.H., 1966.- The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetation composition. Bull. Bot. Club. Torrey. 93 (5) : 332-351 .
- MULLER C.H., 1969.- Allelopathy as a factor in ecological process. Vegetatio. 18 : 348-357 .

- MULLER C.H., 1970.- The role of allelopathy in the evolution of vegetation. Proceedings of the twenty-ninth Annual Biology Colloquium. 1968 : 13-31 .
- PERRADIN Y., 1982.- Etude des acides phénoliques de Populus balsamifera L. et d'Alnus crispa var mollis Fern et de leur influence sur Frankia ACN1AG. Thèse. 3ème cycle. Lyon I. 145p .
- PETIT D., 1977.- Les pelouses à Hieracium pilosella L. des terrils du Nord de la France. Coll. Phytos. VI : 201-212 .
- PETIT D., 1980.- La végétation des terrils du Nord de la France Ecologie, Phytosociologie Dynamisme. Thèse. Univ. Lille I. 250p .
- PRASAD R. and B.R.R. RAJESWARA, 1981.- Allelopathy in spring wheat mixtures. Experientia. 37 : 1078 .
- RIBEREAU-GAYON P., 1968.- Les composés phénoliques des végétaux. Dunod ed. Paris. 254p .
- RICE E.L., 1969.- Inhibition of nitrogen-fixing and nitrifying bacteria by seed plants. VI. Inhibitors from Euphorbia supina Raf. Physiol. Plant. 22 : 1175-1183 .
- RICE E.L., 1974.- Allelopathy. Academic. Press. N.Y. 353 p .
- RICE E.L., 1979.- Allelopathy : an update. Bot. Rev. 45 : 15-109 .
- ROSSET R., M. CAUDE et A. JARDY, 1982.- Manuel pratique de chromatographie en phase liquide (2ème ed). Masson ed. Paris. 370p .
- TANG C.S. and YOUNG C.C., 1982.- Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of Bigalra limpograss (Hemarthria altissima). Plant Physiol. 69 : 155-160 .
- TUKEY H.R.Jr., 1971.- Leaching of substances from plants . in "Biochemical interactions among Plants" (US. Nat. Comm. For. IBP eds.). Nat. Acad. Sci. Washington. D.C. pp25-32 .
- WALTERS D.T. AND A.R. GILMORE, 1976.- Allelopathic effects on the growth of sweetgum. J. Chem. Ecol. 2 : 469-479 .
- WHITEHEAD D.C., 1964.- Identification of p-hydroxybenzoic, vanillic, p-coumaric and ferulic acids in soils. Nature. 202 (4930) : 417-418 .
- WIDERA M., 1978.- Competition between Hieracium pilosella and Festuca rubra. Ekol. Polska. 26 (3) : 359-390 .
- WULF and Nagel, 1976.- Analysis of Phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. J. of Chromato. 116 : 271-279 .

RESUME

Les recherches présentées entrent dans le cadre de l'étude de l'allélopathie entre la piloselle (Hieracium pilosella) et l'avoine élevée (Arrhenatherum elatius) sur les terrils houillers du Nord de la France :

Sur ces terrils, une pelouse rase à Hieracium pilosella succède à une friche haute à Arrhenatherum elatius. Pour expliquer cette substitution Petit (1980) invoque plusieurs hypothèses dont la télétoxicité de la piloselle.

Après avoir montré que la toxicité des extraits aqueux de piloselle utilisés par Becker et col.(1950) était due à la pression osmotique, nous avons identifié dans cette plante deux composés à potentialité allélopathique (l'ombelliférone et un flavonoïde), ces substances ne sont pas exsudées par les racines de la piloselle. Par contre, une autre substance à potentialité allélopathique (la skimine) est rejetée par les racines de la piloselle. La toxicité du sol à piloselle n'a pu être démontrée, les composés précédemment isolés ne semblent pas y être présents. Des cultures (stériles et non stériles) pures et mixtes de piloselle et d'avoine élevée ont montré que la piloselle est dominée par l'Arrhenatherum elatius en culture mixte.

Nos travaux n'ont pas pu mettre en évidence l'allélopathie de la piloselle.

