

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix - Travail - Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET  
PHYSIOLOGIE VEGETALES

\*\*\*\*\*



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace - Work - Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF PLANT  
BIOLOGY

\*\*\*\*\*

## Diversité génétique de *Vernonia* spp.

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Ph.D de  
Biologie des Organismes Végétaux

Par : **NGUIMKENG GAINITSE Eric Dumas**  
D.E.A. ès Sciences

Sous la direction de  
**YOUMBI Emmanuel**  
Professeur ; Université de Yaoundé I

Année Académique : 2017





DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES  
DEPARTEMENT OF PLANT BIOLOGY

Yaoundé, le

**ATTESTATION DE CORRECTION**

\*\*\*\*\*

Nous soussignés, membres du jury de soutenance de la thèse de **Doctorat/Ph.D en Biologie et Physiologie Végétales**, soutenue le mardi 17 Octobre 2017 par Monsieur **NGUIMKENG GAINSE Eric Dumas**, Diplôme d'Etude Approfondi ès Science, Matricule **98X229**, intitulée «**Diversité génétique de *Vernonia spp.***», certifions qu'il a effectué les corrections conformément aux remarques et recommandations du jury.

En foi de quoi, nous lui délivrons cette attestation de correction pour servir et valoir ce que de droit. /-

**Rapporteur**

YOUMBI Emmanuel  
Professeur

**Président du Jury**

Dongo Etienne  
Professeur

**Examineur**

Zapfack Louis  
Maître de Conférences

**Examineur**

Bell Joseph Martin  
Maître de Conférences

## LISTE PROTOCOLAIRE

<b>Universite de Yaounde I</b> <b>Faculte des Sciences</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>The University of Yaoundé I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>	<b>LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF</b>	

Année académique 2016/2017  
(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION : Octobre 2017

### ADMINISTRATION

**DOYEN : AWONO ONANA, Professeur**

**VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, Professeur**

**VICE-DOYEN / DSSE : OBEN Julius ENYONG, Professeur**

**VICE-DOYEN / DRC : MBAZE MEVA'A Luc, Maître de Conférences**

**Chef Division Affaires Académiques, Scolarité et Recherche : ABOSSOLO Monique,  
Chargée de cours**

**Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., Maître de Conférences**

Département de Biochimie (BC) (40)			
N°	Noms et Prénoms	Grade	Observations
1	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	MBACHAM Wilfried	Professeur	En poste
4	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	Vice-Doyen (DSSE)
6	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
7	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
8	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
9	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
10	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
11	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
12	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
1	WAKAM née NANA Louise	Maître de Conférences	En poste
14	BELINGA née NDOYE FOE Marie C. Florentine	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
15	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste
16	AZANTSA Boris	Chargé de Cours	En poste
17	ATOGHO Barbara Mma	Chargé de Cours	En poste
18	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste

19	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
20	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargé de Cours	En poste
21	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
22	EFFA ONOMO Pierre	Chargé de Cours	En poste
23	EVEHE BEBANDOUE Marie – Solange	Chargé de Cours	En disponibilité
24	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
25	KOTUE TAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
26	MBONG ANGIE MOUGANDE Mary Ann	Chargé de Cours	En poste
27	MOFOR née TEUGWA Clautilde	Chargé de Cours	IA4/MINESUP
28	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
29	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
30	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KAILAH	Chargé de Cours	En poste
32	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
33	BEBEE FADIMATOU	Assistant	En poste
34	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Assistant	En poste
35	DAKOLE DABOY Charles	Assistant	En poste
36	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Assistant	En poste
37	FONKOUA Martin	Assistant	En poste
38	MANANGA Marlyse Joséphine	Assistant	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistant	En poste
40	TIENTCHEU DJOKAM Léopold	Assistant	En poste

Département de BioLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (B.P.A.) (44)

1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
4	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	en poste
5	MIMPFOUNDI REMY	Professeur	En poste
6	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
7	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
8	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9	TAN Paul Vernyuy	Professeur	En poste
10	TCHUEM TCHUENTE Louis	Professeur	Coord. Progr. MINSANTE
11	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Maître de Conférences	Chef Serv. /Diplomation FS
12	DJIETO Lordon Champlain	Maître de Conférences	En poste
13	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
14	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	VDRC/Chef dépt FMSB
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
16	KAMGANG René	Maître de Conférences	C.E. MINRESI
17	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
18	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
19	MONY NTONE Ruth	Maître de Conférences	En poste
20	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
21	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	Chef Serv. /MINSUP

22	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
23	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
24	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
25	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
26	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
27	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	En poste
28	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
29	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
30	MOUGANG NGAMENI Luciane	Chargé de Cours	En poste
31	LEKEUFACK FOLEFACK Guy Benoît	Chargé de Cours	En poste
32	NGOULATEU KENFACK Omer BEBE	Chargé de Cours	En poste
33	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Chargé de Cours	En poste
34	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
35	NJUA Clarisse YAFI	Chargé de Cours	En poste
36	TADU Zéphirin	Chargé de Cours	En poste
37	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
38	YEDE	Chargé de Cours	En poste
39	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
40	KANDEDA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
41	KOGA MANG'Dobara	Assistant	En poste
42	METCHI DONGFACK Mireille Flore	Assistant	En poste
43	NOAH E. O. Vivien	Assistant	En poste
44	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste

### 3-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES (B. P. V.) (27)

1	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
2	AMBANG Zachée	Professeur	DAARS / UYII
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	BELL Joseph Martin	Maître de Conférences	En poste
5	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
6	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
7	MBOLO Marie.	Maître de Conférences	Coordo. Programme MINFOF
8	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
9	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
10	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
11	BIYE Elvire Hortense	Chargé de Cours	En poste
12	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Chargé de Cours	En poste
13	MALLA Armand William	Chargé de Cours	En poste
14	MBARGA BINDZI Marie Alain.	Chargé de Cours	Inspecteur académ. N°1 MINESUP
15	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	En poste
16	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste
17	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy Léonard	Chargé de Cours	En poste
18	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
19	NSOM ZAMO Annie Claude ép. Pial	Chargé de Cours	Expert national./UNESCO
20	ONANA Jean Michel	Chargé de Cours	En poste

21	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
22	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
23	DJEUANI Astride Carole	Assistant	En poste
24	GONMADGE Christelle	Assistant	En poste
25	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistant	En poste
26	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistant	En poste
27	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistant	En poste

#### 4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.I.) (35)

1	KETCHA MBADCAM Joseph	Professeur	Chef de Département
2	NDIFON Peter TEKE	Professeur	CT MINRESI
3	NGAMENI Emmanuel	Professeur	Doyen/ UD
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	Directeur Cabinet PM
5	LAMINSI Samuel	Professeur	En poste
6	MELO née CHINJE Uphie F.	Professeur	Recteur/UN
7	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	Vice-Recteur/ Ubda
8	NANSEU Charles Péguy	Professeur	En poste
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	BABALE DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	En poste
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
13	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
14	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	Vice-Doyen/Ubda
15	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	Recteur /UB
16	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
17	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
18	CHEUMANI YONA Arnaud	Chargé de Cours	En poste
19	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
20	GWET Simon – Pierre	Chargé de Cours	En poste
21	KAMGANG YOUBI Georges	Chargé de Cours	En poste
22	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean Claude	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO Gustave	Chargé de Cours	. En poste
24	MBEY Jean Aimé	Chargé de Cours	En poste
25	NDI Julius NSAMI	Chargé de Cours	En poste
26	NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargé de Cours	En poste
27	NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG	Chargé de Cours	En poste
28	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE Awaou	Chargé de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
33	KOUOTOU DAOUDA	Assistant	En poste
34	MAKON Thomas Beauregar	Assistant	En poste
35	NCHIMI NONO Katia	Assistant	En poste

#### 5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (33)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/ DPSSA
---	---------------	------------	-------------------

2	GHOGOMU TIH ROBERT RALPH	Professeur	Directeur I.B.A. Fouban
3	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU B.	Professeur	Chef de dépt FMBS
5	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de dépt. UDS
6	NKENGFACK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	Directeur /UN
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	Directeur au MINESUP
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	DEPE/ UYI
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
16	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	Vice-Recteur/ UYII
17	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
18	TCHUENDEM KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
19	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
20	AMBASSA Pantaleon	Chargé de Cours	En poste
21	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste
22	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
23	KAMTO Eutrophe Ledoux	Chargé de Cours	En poste
24	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste
25	NGO MBING Joséphine	Chargé de Cours	En poste
26	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	Chef Cell/ MINRESI
27	NOTE LOUGBOT Olivier	Chargé de Cours	CEA/MINESUP
28	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Chargé de Cours	En poste
29	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDEGOUMBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
32	NGINTEDO Dominique	Assistant	En poste
33	NGOMO Orléans	Assistant	En poste

6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (26)

1	FOUDA NDJODO Marcel	Professeur	IGA-MINESUP/Chef Dpt ENS
2	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	Chef de Département Chef Division MINESUP
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera Youth KIMBI	Chargé de Cours	En poste
6	KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
11	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

12	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
13	AMINOOU Halilou	Assistant	En poste
14	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
15	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
16	EBELE Serge	Assistant	En poste
17	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
18	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistant	En poste
19	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
20	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
21	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
22	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
23	MONTHE DJIADEU Valery Martial	Assistant	En poste
24	NKONDOCK MI BAHANACK Nicolas	Assistant	En poste
25	OLE OLE David Claude	Assistant	En poste
26	TAPAMO KENFACK Hyppolite	Assistant	En poste

7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (33)

1	BEKOLLE David	Professeur	Vice-Recteur UN
2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	En poste
3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
5	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	Dir. MINESUP
6	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
7	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
8	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	C.E. MINEPAT
9	BOGSO Antoine M	Chargé de Cours	En poste
10	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
11	DOUANLA YONTA Hermann	Chargé de Cours	En poste
12	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
13	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
14	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
15	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
16	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
17	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
18	MBELE BEDIMA Martin	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bertrand	Chargé de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargé de Cours	En poste
26	DJIADEU NGAHA Michel	Assistant	En poste
27	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
28	NIMPA PEFOUKEU Romain	Assistant	En poste
29	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	Chef Serv. MINPLAMAT
30	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin Erick	Assistant	En poste

8-DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)			
1	ETOA François-Xavier	Professeur	Recteur UDO/Chef de Département
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	Chef de Division recherche IMPM
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Assistant	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste
9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (41)			
1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
3	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
4	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen/Ubda
5	WOAFO Paul	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
9	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	Dir.Gén. B. MEKIM
10	BEN- BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
11	DJUIDJE KENMOE Gemaine épouse ALOYEM KAZE	Maître de Conférences	En poste
12	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	Chef Dépt UN
13	EYEBE FOU DA Jean Sire	Maître de Conférences	En poste
14	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
15	MBANE BIOUELE	Maître de Conférences	En poste
16	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
17	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	Chef Serv. MINRESI
18	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
19	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	En poste
20	SAIDOU	Maître de Conférences	En poste
21	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
22	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
23	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
24	ENYEGUE A NYAM Françoise épouse BELINGA	Chargé de Cours	En poste
25	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
26	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cellule MINADER
27	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste

28	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En Poste
29	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
30	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
31	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	Dir.acad/Univ.Int.Etat Cam-Congo
32	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
33	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
34	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
35	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En Poste
36	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	Chef Serv. MINESUP
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
38	ABDOURAHIMI	Assistant	En Poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En Poste
40	MEL'I Jorelle Larissa	Assistant	En Poste
41	MVOGO Alain	Assistant	En Poste
10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (44)			
1	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	Chef de Department
2	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
3	BITOM Dieudonné Lucien	Professeur	Doyen FASA/ U D
4	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
5	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
6	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	Conseiller Technique/UYII
7	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	CT/MINMIDT
8	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
9	NGOS III Simon	Maître de Conférences	D.A.A.C./UM
10	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
11	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
12	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
13	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	Chef de Divi/ MINTP
14	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	Chef DAASR FS/UYI
15	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
16	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	Dir.Projet Barage Memve'ele
17	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	En poste
18	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
19	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	En poste
20	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	Serv D'ETAT /MINMIDT
21	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	En poste
22	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	Chef de Dépt IMIP/Maroua
23	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
24	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
25	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	Chef de Dépt IMIP/Maroua
26	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
27	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
28	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
29	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA MINRESI
30	NJOM Bernard de Lattre	Chargé de Cours	En poste
31	NYECK Bruno	Chargé de Cours	En poste

32	ONANA Vincent	Chargé de Cours	En poste
33	TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NUMBEM	Chargé de cours	CEA MINRESI
34	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
35	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	DG ART
36	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
37	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	En Poste
38	BINELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	En Poste
39	METANG Victor	Assistant	En poste
40	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
41	SABABA Elisé	Assistant	En Poste
42	TCHAPTCHET TCHATO De Pesquidoux I	Assistant	En poste
43	TEHNA Nathanaël	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département  
(Octobre 2017)

Département	Nombre d'enseignants				
	Pr	MC	CC	ASS	Total
BC	5 (1)	8 (3)	16 (9)	11 (6)	40 (19)
BPA	10 (0)	10 (1)	18 (6)	06 (4)	44 (11)
BPV	03 (0)	06 (0)	13 (3)	5 (6)	27 (9)
C.I.	09 (1)	07 (0)	15 (3)	04(2)	35 (6)
C.O.	9 (0)	10 (3)	12 (3)	2 (0)	33 (6)
IN	02 (1)	01 (0)	08 (0)	15 (4)	26 (5)
MA	3 (0)	04 (0)	18 (1)	05 (0)	30 (1)
MB	1 (0)	6 (1)	4 (2)	2 (0)	13 (3)
PH	8 (0)	14 (1)	15 (2)	4 (2)	41 (5)
ST	3 (0)	10 (1)	23 (4)	07 (0)	43 (5)
Total	53 (3)	76 (10)	142 (33)	61 (24)	332 (70)

Soit un total de :	332 (70) dont
- Professeurs	53 (3)
- Maîtres de Conférences	76 (10)
- Chargés de Cours	142 (33)
- Assistants	61 (24)

- ( ) = Nombre de femmes.

Le Doyen de la Faculté des Sciences  
AWONO ONANA, Professeur

## **DEDICACE**

**A mes parents H elene et Maurice Gaintse,   mon épouse Aurore;   mes enfants Miguella, Aris,  
Joachim et Asael.**

## REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé à l'Université de Yaoundé I sous l'encadrement de Youmbi Emmanuel, Professeur, Chef de Département de Biologie et Physiologie Végétales. Je le remercie de m'avoir fait confiance et soutenu tout au long de cette recherche.

Je tiens à exprimer ma profonde et sincère reconnaissance aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse une reconnaissance particulière à Zapfack Louis, Maître de Conférences, sans qui mon courage seul n'aurait suffi à persévérer dans la recherche et qui n'a ménagé aucun effort pour mettre à notre disposition son savoir, sa bibliothèque et son matériel.

Ma reconnaissance s'adresse (à/au/aux) personnes:

- Dongo Etienne, Professeur, pour son aide précieuse dans la recherche des mécanismes de financements de ces travaux et dans l'adaptation des protocoles;

- Kengne Noumsi Ives Magloire, Maître de Conférences et Fonkou Théophile, Maître de Conférences; vos encouragements ainsi que la mise à notre disposition de votre matériel de laboratoire m'ont été bénéfiques ;

- Tonfack Brice Libert, Chargé de Cours, Mbogne Taboula Judith, Doctorat PhD et Temegne Nono Carine, enseignante vacataire à Bambili, pour leur disponibilité sans réserve et leur participation à la réalisation des analyses statistiques des données et dans les discussions en vue d'améliorer la qualité de ce travail ;

- l'équipe des enseignants du Centre de Recherche de Formation Doctorale des Sciences de la Vie, Santé et Environnement pour les différentes formations dispensées;

- tous les membres de l'Unité de Physiologie et Amélioration des Plantes du laboratoire des Biotechnologies et Environnement, pour les échanges qui ont amélioré la qualité de ce travail ;

- tous les membres de l'Unité d'Ecophysiologie et Bioépuration du laboratoire des Biotechnologies et Environnement, pour collaboration et la convivialité ;

- les membres du Laboratoire de Biochimie de l'Université de Yaoundé I dont Nana Wakam Louise, Maître de Conférences et Eke Pierre, Doctorant pour leur assistance dans la réalisation des tests antimicrobiens en laboratoire ;

- l'Université de Dschang ainsi que son Recteur Nanfosso Tsafack Roger, Professeur pour ses perpétuels encouragements;

- Nbandah Pierre, Doctorant ; Godswill Ntsomboh, Chercheur à l'IRAD/ CEREPAH à Dibamba ; Kenmogne Popice et Djon Gertrude Christelle, Doctorants pour leurs aides respectives dans la réalisation des cartes, la production des articles scientifiques et l'entretien de la pépinière ;

- ma famille pour son soutien moral;

- mes amis Ngadjui Yvan, Djumyom Valerie, Wanda Christian sans qui l'opportunité de réaliser les analyses phytochimiques n'aurait pu être trouvée;

- mes camarades de promotion avec qui de nombreuses épreuves ont été traversées, et dont je ne saurais oublier l'émulation ;

- tous ceux, qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms ne figurent pas ici. Qu'ils reçoivent les assurances de ma profonde gratitude.

Ce travail étant loin d'être parfait, j'adresse au jury qui aura la tâche de l'examiner, mes remerciements anticipés pour les remarques et suggestions qu'il apportera en vue de son amélioration.

# SOMMAIRE

<b>LISTE PROTOCOLAIRE .....</b>	<b>i</b>
<b>DEDICACE.....</b>	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xi</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>xviii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES.....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>xx</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>xxi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>CHAPITRE I. GENERALITES .....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>I.2. REVUE DE LA LITTERATURE .....</b>	<b>3</b>
I.2.1. Elements de Botanique .....	3
I.2.2. Culture de <i>Vernonia</i> .....	5
I.2.3. Usages de la vernonie .....	7
I.2.4. Généralités sur le grain de pollen.....	10
I.2.5. Elements de phytochimie .....	17
I.2.6. Variabilité génétique de <i>Vernonia</i> .....	34
<b>CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>34</b>
<b>II.1. MATERIEL .....</b>	<b>34</b>
II.1.1. Sites d'étude .....	34
II.1.2. Matériel végétal .....	35
II.1.3. Matériel microbien .....	36
II.1.4. Matériel de laboratoire et de terrain .....	37
<b>II.2. METHODES.....</b>	<b>38</b>
II.2.1. Etude de la distribution des <i>Vernonia</i> .....	38

II.2.2. Analyse de la richesse intraspécifique de <i>Vernonia</i> spp. Sur la base des paramètres palynologiques, organoleptiques et agro-morphologiques.....	38
II.2.3. Analyse de la diversité de <i>Vernonia</i> spp. sur la base des critères chimiotaxonomiques .....	50
II.2.4. Tests d'activités antimicrobiennes.....	56
II.2.5. Analyse des données.....	60
<b>CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>61</b>
<b>III.1. RESULTATS .....</b>	<b>62</b>
III.1.1. Distribution des <i>Vernonia</i> au Cameroun .....	62
III.1.2. Caractérisation de <i>Vernonia</i> spp. Sur la base des paramètres palynologiques, organoleptiques et agro-morphologiques .....	68
III.1.3. Différentiation chimiotaxonomique de <i>Vernonia</i> spp. ....	98
III.1.4. Propriétés antimicrobiennes des extraits de feuilles de <i>Vernonia</i> spp. ....	103
<b>III.2. DISCUSSION.....</b>	<b>105</b>
III.2.1. Distribution des espèces de <i>Vernonia</i> .....	105
III.2.2. Caractérisation palynologique, organoleptique et agro-morphologique de <i>Vernonia</i> spp. ....	106
III.2.3. Critère de reconnaissance des cultivars de <i>Vernonia</i> et méthodes de régénération utilisées par les paysans.....	111
III.2.4. Caractérisation phytochimique de <i>Vernonia</i> spp. et propriétés antimicrobiennes antimicrobiennes des extraits de feuilles.....	113
<b>CHAPITRE IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>115</b>
<b>IV.1. CONCLUSION .....</b>	<b>117</b>
<b>IV.2. PERSPECTIVES .....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>120</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>126</b>
<b>ARTICLES .....</b>	<b>IV</b>

## LISTE DES FIGURES

Fig. 1. Rameau fleuri de <i>Vernonia</i> . .....	4
Fig. 2. Usages traditionnels de <i>Vernonia amygdalina</i> . .....	9
Fig. 3. Structure du sporoderme des pollens. ....	10
Fig. 4. Représentation schématique de quelques types d'ouvertures de pollens. ....	12
Fig. 5. Complexité des structures anatomiques des <i>Cichorioideae</i> ( <i>Asteraceae</i> ). ....	16
Fig. 6. Biosynthèse d'alcaloïdes à partir d'acides aminés. ....	19
Fig. 7. Alcaloïde complexe : la lupanine. ....	19
Fig. 8. Biosynthèse de polyphénols par voie d'acide cinnamique. ....	21
Fig. 9. Synthèse de coumarine. ....	22
Fig. 10. Biosynthèse des flavonoïdes. ....	23
Fig. 11. Principales catégories de flavonoïdes. ....	23
Fig. 12. Isoflavones .....	24
Fig. 13. Squelette moléculaire de proanthocyanidine. ....	25
Fig. 14. Pentagalloylglucose. ....	26
Fig. 15. Exemple de polyterpènes: le caoutchouc. ....	27
Fig. 16. Exemples de monoterpènes : menthol et pinène. ....	27
Fig. 17. Farnesol et caryophyllène, respectivement sesquiterpènes linéaire et cyclique. ....	28
Fig. 18. Exemples de tetraterpénoïdes : $\beta$ - carotène et lycopène. ....	28
Fig. 19. Structures de quelques composés isolés chez <i>Vernonia amygdalina</i> . ....	29
Fig. 20. Schéma synthétique de biosynthèse des grands groupes de métabolites secondaires. .....	30
Fig. 21. Sites de récolte des accessions de <i>Vernonia</i> . ....	35
Fig. 22. Ports végétatifs et inflorescences <i>Vernonia amygdalina</i> et <i>V. calvoana</i> . ....	36
Fig. 23. Dispositif de randomisation total mis sur pied en pépinière. ....	40
Fig. 24. Schéma synoptique de la démarche expérimentale pour l'analyse des pollens. ....	45
Fig. 25. Dispositif d'étude du rôle de la pluie dans la dispersion des pollens de <i>Vernonia</i> . ....	47
Fig. 26. Dispositif d'étude de l'effet du vent sur la dispersion des pollens. (a) moustiquaire .....	48
Fig. 27. Dispositif de mise en évidence de la fécondation entomophile de <i>Vernonia</i> spp... ..	49
Fig. 28. Protocole d'obtention d'extraits méthanoliques .....	50
Fig. 29. Courbe d'étalonnage en vue du dosage des composés phénoliques solubles totaux. .....	52

Fig. 30. Courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en sucres. ....	55
Fig. 31. Modèle de disposition des disques sur une plaque de gélose. ....	58
Fig. 32. Distribution des espèces de <i>Vernonia</i> comestibles. ....	64
Fig. 33. Distribution des espèces de <i>Vernonia</i> médicinales au Cameroun.....	65
Fig. 34. Distribution des espèces de <i>Vernonia</i> sauvages au Cameroun. ....	66
Fig. 35. Distribution des espèces de <i>Vernonia</i> ubiquiste au Cameroun. ....	67
Fig. 36. Critères de reconnaissance des cultivars de vernonies par les populations locales.	69
Fig. 37. Méthodes de régénération utilisées par les paysans.....	69
Fig. 38. Morphologie du pollen de <i>Vernonia</i> spp. vu au microscope optique. ....	71
Fig. 39. Influence du taux de saccharose sur la germination des pollens <i>V. calvoana</i> var. <i>calvoana</i> sur milieu HH et sur milieu BK. ....	72
Fig. 40. Influence du taux de saccharose sur la germination des pollens <i>V. calvoana</i> var. <i>calvoana</i> à fleurs blanches sur milieu HH et sur milieu BK. ....	73
Fig. 41. Influence du taux de saccharose sur la germination des pollens <i>V. calvoana</i> var. <i>microcephala</i> sur milieu HH et sur milieu BK. ....	74
Fig. 42. Influence du taux de saccharose sur la germination des pollens <i>V. amygdalina</i> sur milieu HH et sur milieu BK. ....	74
Fig. 43. Effet de la température sur la germination des pollens de <i>Vernonia</i> spp.....	76
Fig. 44. Influence du stade de développement de l'anthère sur la germination des pollens de <i>Vernonia</i> spp. ....	77
Fig. 45. Influence du pH sur la germination des pollens de <i>Vernonia</i> spp. ....	78
Fig. 46. Influence de la teneur en acide borique sur la germination des pollens de <i>Vernonia</i> spp. ....	80
Fig. 47. Evolution de la viabilité des pollens frais de <i>Vernonia</i> spp. en fonction de la durée de conservation des capitules après la récolte. ....	81
Fig. 48. Evolution du pourcentage de germination des pollens de <i>Vernonia</i> spp. en fonction de leurs durées de conservation au congélateur. ....	82
Fig. 49. Cinétique de croissance du tube pollinique de <i>V. calvoana</i> var. <i>calvoana</i> .....	83
Fig. 50. Pollens germés de <i>Vernonia</i> spp. ....	83
Fig. 51. Pourcentage de germination des graines de deux espèces de <i>Vernonia</i> spp. en présence d'eau, mais en absence de vent et d'insectes. ....	84
Fig. 52. Pourcentage de germination des graines de deux espèces de <i>Vernonia</i> spp. en présence de vent, mais en absence d'eau et d'insectes. ....	85

Fig. 53. Pourcentage de germination des graines de deux espèces de <i>Vernonia</i> spp. en présence d'insectes, mais en absence d'eau et de vent.....	86
Fig. 54. Mode de dispersion du pollen chez <i>Vernonia</i> spp. ....	88
Fig. 55. Représentation des variables dans le plan factoriel 1-2.....	90
Fig. 56. Profil dendrométrique des morphotypes de <i>V. amygdalina</i> et <i>V. calvoana</i> en fonction des traits qualitatifs.....	91
Fig. 57. Représentation des variables quantitatives dans le plan factoriel 1-2.....	97
Fig. 58. Dendogramme des morphotypes de <i>Vernonia</i> sur la base de 14 traits quantitatifs.	98
Fig. 59. Classement des accessions de <i>Vernonia</i> en fonction de leurs teneurs décroissantes en métabolites secondaires. ....	100
Fig. 60. Chromatogrammes des dix-huit phénols des morphotypes analysés.....	102
Fig. 61. Exemple d'illustration des diamètres d'inhibition de l'extrait de <i>Vernonia</i> obtenu par la méthode des disques. ....	104

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Principales catégories de tailles des grains de pollen.....	13
Tableau II. Quelques composés bioactifs isolés du <i>Vernonia amygdalina</i> .....	29
Tableau III. Synthèse des tests chimiques servant à identifier les familles de composés secondaires dans une solution (Halilu et <i>al.</i> , 2012). .....	31
Tableau IV. Récapitulatif des caractéristiques du matériel végétal utilisé.....	36
Tableau V. Protocole de dosage des polyphénols solubles totaux .....	52
Tableau VI. Protocole de dosage des sucres totaux. ....	54
Tableau VII. Liste des composés à analyser par la HPLC .....	56
Tableau VIII. Diversité des espèces de <i>Vernonia</i> en fonction des zones phytogéographiques du Cameroun.....	68
Tableau IX. Fréquences de dégustateurs ayant attribué à chaque morphotype un goût.. .....	69
Tableau X. Récapitulatif des caractères morphologiques du pollen de <i>Vernonia</i> spp. ....	72
Tableau XI. Récapitulatif des conditions optimales de germination des pollens étudiés. ....	84
Tableau XII. Traits qualitatifs de distinction des accessions de <i>Vernonia</i> .....	89
Tableau XIII. Inertie associée aux valeurs propres des variables qualitatives. ....	90
Tableau XIV. Mesures discriminatives des caractères qualitatifs dans le 1 <sup>er</sup> plan factoriel. ...	90
Tableau XV. Statistiques descriptives des traits quantitatifs des accessions de <i>Vernonia</i> . ....	92
Tableau XVI. Valeurs moyennes des variables en fonction de chaque morphotype. ....	94
Tableau XVII. Test de corrélation entre les traits distinctifs des accessions de <i>Vernonia</i> . ....	95
Tableau XVIII. Valeurs propres obtenues des quatorze variables analysées.....	96
Tableau XIX. Coefficients des vecteurs associés aux deux premiers axes.....	97
Tableau XX. Teneur des extraits de feuilles des morphotypes en métabolites secondaires. ...	99
Tableau XXI. Corrélations entre le goût des feuilles et les teneurs en métabolites. ....	100
Tableau XXII. Teneurs des extraits des feuilles de vernonies en métabolites primaires.....	101
Tableau XXIII. Contenu en polyphénols des différents morphotypes de vernonies.....	101
Tableau XXIV. Diamètres d'inhibition des extraits des vernonies sur les bactéries et les levures.....	104
Tableau XXV. Concentrations minimales inhibitrices des extraits de vernonies. ....	105

## **LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES**

ACP :	Analyse en Composante Principale
AGOA:	African Growth Opportunity Act
ANOVA :	Analyse de Variance
ATCC :	American Type Culture Collection
BK :	Brewbaker and Kwack
CAH :	Classification Ascendante Hiérarchique
CCM:	Chromatographie sur Couche Mince
CMI:	Concentration Minimale Inhibitrice
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMF :	Concentration Minimale Fongique
CPA:	Chromatographie en Phase Gazeuse
CPT :	Composés Phénoliques Totaux
FAO :	Food and Agriculture Organisation
GPS:	Global Positioning System
HH:	Heslop-Harrison
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-MS :	Hight Performance liquid Chromatography- Mass Spectrum
HNC :	Herbier National du Cameroun
IPP :	Isopentenyl diphosphate
LFL :	Legumes Feuilles Locaux
MS :	Mass Spectrum
UV:	Ultra-Violet

## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1.</b> Fiche d'enquête socio-économique et ethnopharmacologique .....	I
<b>Annexe 2.</b> Quelques sorties des tableaux d'analyse de variance.....	II
<b>Annexe 3.</b> Dispositif de dispersion des pollens de <i>Vernonia</i> spp. ....	IV

## RESUME

La diversité génétique de *Vernonia* spp. est avérée. Mais, la variabilité intraspécifique est peu explorée. Elle fait partie des légumes feuilles comestibles d'Afrique présentant de nombreuses propriétés médicinales mais dont l'inventaire de la ressource phytogénétique reste à faire pour leur valorisation. L'objectif du travail est d'étudier la variabilité génétique de *Vernonia* spp.

A cet effet, l'analyse de la distribution s'est faite par la consultation des échantillons d'herbier et des données de la littérature; et par les enquêtes et la collecte des échantillons. Une caractérisation agromorphologique et organoleptique de deux *Vernonia* comestibles (*V. amygdalina* et *V. calvoana*), choisies pour leurs intérêts agronomiques et pharmacologiques, a été réalisée. Les boutures des accessions récoltées du terrain ont servi de semences pour la régénération des nouveaux plants en pépinière. La caractérisation agro-morphologique a porté sur 12 variables. La description des pollens acetolysés et l'analyse physiologique *in vitro* du pollen ont permis de compléter cette caractérisation. Le screening phytochimique a été effectué sur ces accessions. Les dosages de composés phénoliques, de flavonoïdes et de tanins ont été effectués par les méthodes de titration standards. Dans l'optique de compléter les analyses chimiotaxonomiques, la HPLC-MS a été utilisé pour la détection et la quantification de 18 composés phénoliques standards. Les extraits des six accessions ont fait l'objet des tests antimicrobiens pour montrer l'importance de la prise en compte des critères taxonomiques dans l'utilisation de la plante à des fins pharmacologiques.

Les résultats montrent que le genre *Vernonia* est très diversifié au Cameroun. Les espèces sont plus répandues dans les zones agroécologiques où la pluviométrie est plus élevée dont particulièrement la forêt d'altitude humide et îlot subalpin, et la forêt ombrophile sempervirente atlantique.

Le test de dégustation a permis de regrouper les accessions en trois grands groupes. L'analyse de correspondance multiple établit le caractère goût des feuilles comme principal critère qualitatif discriminant. L'analyse descriptive a montré des différences phénotypiques entre les morphotypes. Une analyse en composantes principales a confirmé cette importante variabilité morphologique, permettant d'expliquer 89,98 % de la variance entre les variables. La durée du cycle, la hauteur des plants, le pourcentage de débourrement des tiges, les dimensions des pollens, le nombre de feuilles et de fleurs par plant sont les caractères quantitatifs discriminants de *Vernonia*. Les caractères quantitatifs permettent d'organiser au sein d'un dendrogramme les morphotypes étudiés en deux grands groupes. Le premier groupe

des *V. calvoana* est subdivisé en deux sous-groupes. Le sous-groupe des *V. calvoana* à feuilles amères (VCAB et VCAV) ; le sous-groupe des *V. calvoana* à feuilles non amères (VCSB et VCSV). Le second groupe des *V. amygdalina* compte 2 morphotypes : le morphotype amer à petites feuilles (VAA) et le morphotype amer à larges feuilles (VALF). Les résultats révèlent que les pollens étudiés sont tous porés, fenêtrés, et échinulés. Ils possèdent une symétrie apolaire et une forme sphérique. *V. calvoana* var. *microcephala* possède le plus gros pollen, avec 69,42 µm de diamètre polaire et 66,30 µm de diamètre équatorial en moyenne. *V. amygdalina* a le plus petit pollen dont le diamètre polaire moyen mesure 49,30 µm et le diamètre équatorial moyen 44,30 µm. Il existe une variation des conditions de germination des pollens qui est fonction du morphotype testé. La morphologie du pollen l'adapte à un mode de dispersion entomophile.

Le génotype VCSB est plus riche en phénols avec 206,1±3,12 mg/g d'extrait sec, et VCSV de la même espèce, le moins riche (197,9±18,03 mg/g). Les plus faibles teneurs en flavonoïdes sont celles de VCSV (81,6±7,21 mg/g) et VCSB (86,1±21,2 mg/g) et les teneurs les plus élevées, celles de VCAB (132,8±31,5 mg/g) et VCAV (110,2±22,1 mg/g). Les morphotypes VCSB (66,2±1,2 mg/g) et VCSV (56,3±4,08 mg/g) ont les plus faibles teneurs en tanins tandis que VCAB (97,8±23,8 mg/g) et VCAV (87,4±36,07 mg/g) ont les teneurs en tanins les plus élevées. Les teneurs en tanins et en flavonoïdes constituent des paramètres d'évaluation du goût des feuilles.

A l'exception de VAA, tous les morphotypes ont une activité sur une seule souche de bactéries. Les extraits de VALF, VCAB, VCAV et VCSV ont une activité inhibitrice sur *Klebsiella pneumonia* et VCSB sur *Salmonella enterica*. Les extraits de VAA présentent une activité inhibitrice sur les trois bactéries testées (*Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumonia* et *Streptococcus aureus*). L'acide chlorogénique et la lutéoline sont les molécules pouvant être utilisées comme traceurs chimiotaxonomiques. L'isoquercétine est caractéristique de VCSV. Les analyses chimiotaxonomiques réalisées sur les différents morphotypes de *V. amygdalina* et *V. calvoana* ont permis de mettre en évidence la diversité génétique intraspécifique de ces espèces. La conséquence est que les propriétés antimicrobiennes des extraits de feuilles varient en fonction des morphotypes. Ce travail pose les bases d'un inventaire de la ressource phylogénétique des vernonies comestibles. Elle précède, s'il en ait besoin, l'élaboration d'un programme d'amélioration génétique.

Mots clés : diversité génétique, caractérisation agromorphologique et organoleptique, vernonie, chimiotaxonomie, tests antimicrobiens.

## ABSTRACT

The genetic diversity of *Vernonia* is evident but intraspecific variability is less explored. They are part of African local edible leafy vegetables with various medicinal properties. However, an inventory of their plant genetic resource remains to be done for their valorization. The objective of this work is to study the genetic variability of *Vernonia* spp.

To this effect, the study of its distribution was done through consultation of herbarium samples and data from the literature as well as surveys and collection of samples. An agromorphological and organoleptic characterization was carried out on two edible *Vernonia* (*V. amygdalina* and *V. calvoana*) selected for their agronomic and pharmacological interest. Cuttings of accessions collected in the field were used as seeds for regeneration of new nursery plants. The agro-morphological characterization included 12 variables. This characterization was completed by a morphological study of acetolysed pollen and *in vitro* physiological analysis of pollen. A phytochemical screening was performed on these accessions. The dosage of the phenolic compounds, flavonoids and tannins was performed by standard titration methods. HPLC-MS was used for the detection and quantification of 18 standard phenolic compounds. Extracts of six accessions were subject to antimicrobial tests.

The studied results show that the genus *Vernonia* is highly diversified in Cameroon. The species are more widespread in Greater South agro-ecological zones of Cameroon where rainfall is higher with in particular the Humid Mountain Forest and Subalpine island, and Ombrophile Atlantic sempervirente rainforest.

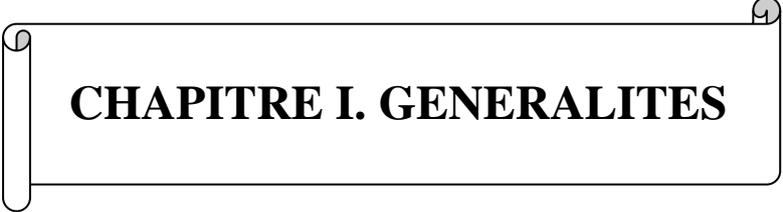
A sensory test was used to organize the accessions into three major groups recognized by their tastes. Multiple correspondence analysis established the character "leaf taste" as main qualitative discriminant criterion. Descriptive analysis showed phenotypic differences between morphotypes. Principal components analysis confirmed significant morphological variability, which explain 89.98 % of the variance between the variables. The life span, plant height, percentage of budded stems, pollen size, number of leaves and flowers are discriminating quantitative traits of bitterleaf. The quantitative characters were used to organize the studied morphotypes within a dendogram in two large groups. The first group of *V. calvoana* is divided into two subgroups. The subgroup of *V. calvoana* had bitter leaves (VCAB and VCAV); the subgroup of *V. calvoana* had non bitter leaves (VCSB and VCSV). The second group of *V. amygdalina* had two morphotypes: the bitter morphotype with small leaves (VAA) and broadleaf bitter morphotype (VALF). The results reveal that studied pollens are pored, fenestrated, and echinulate. They possess an apolar symmetry and a

spherical shape. Of the two *Vernonia* species identified *V. calvoana* var. *microcephala* had the biggest pollen, with 69.42  $\mu\text{m}$  polar diameter and equatorial diameter of 66.30  $\mu\text{m}$ . *V. amygdalina* had the smallest pollen with polar diameter measuring 49.30  $\mu\text{m}$  and equatorial diameter of 44.30  $\mu\text{m}$ . There was a variation of pollen germination conditions with respect to the tested morphotypes. The morphology of the pollen fits an entomophilous mode of dispersion.

The screening results showed that all the genotypes studied are rich in phenols, flavonoids and tannins. The VCSB genotype was richer in phenols with  $206.1 \pm 3.12$  mg/g of dry extract, and VCSV ( $197.9 \pm 18.03$  mg/g) the lower one. Lower levels of flavonoids were found in VCSV ( $81.6 \pm 7.21$  mg/g) and VCSB ( $86.1 \pm 21.2$  mg/g) and the highest were in VCAB ( $132.8 \pm 31.5$  mg/g) and VCAV ( $110.2 \pm 22.1$  mg/g). Morphotypes VCSB ( $66.2 \pm 1.2$  mg/g) and VCSV ( $56.3 \pm 4.1$  mg/g) had the lowest levels of tannins while VCAB ( $97.8 \pm 23.8$  mg/g) and VCAV ( $87.4 \pm 36.07$  mg/g) had the highest levels of tannins. The tannins and flavonoids contents constitute taste evaluation parameters of leaves.

With the exception of VAA, all morphotypes had activity on a single strain of bacteria. Extracts of VALF, VCAB, VCAV and VCSV had an inhibitory activity on *Klebsiella pneumonia* and VCSB on *Salmonella enterica*. Extracts of VAA exhibited inhibitory activity on all three tested bacteria (*S. enterica*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*). Chlorogenic acid and luteolin are molecules that can be used as chemotaxonomic markers. Isoquercetin was characteristic of VCSV. The chemotaxonomic analysis of the different morphotypes of *V. amygdalina* and *V. calvoana* helped to highlight the intraspecific genetic diversity within the species. Consequently, the antimicrobial properties of leaf extracts varied with respect to morphotypes. This study lays the foundation for an inventory of plant genetic resource of edible *vernonia* in view of developing a breeding program.

Keywords: genetic diversity, agromorphological and organoleptic characterization, bitterleaf, chemotaxonomy, antimicrobial tests.



## **CHAPITRE I. GENERALITES**

## I.1. INTRODUCTION

Les *Asteraceae* forment l'une des quatre familles les plus largement répandues et les plus diversifiées avec 1 535 genres et 2 300 espèces (Ehab, 2001). Au Cameroun, *Vernonia* est le genre le plus représentatif de la famille des *Asteraceae* avec 19 % des espèces (Biholong, 1986). Quelques espèces dont *V. amygdalina* Del. et *V. calvoana* Hook font partie des produits forestiers non ligneux et, présentent des usages multiples (alimentaires et médicinale). Cependant, les produits forestiers non ligneux sont surexploités à cause de la forte poussée démographique qui augmente le nombre de consommateurs aussi bien en Afrique qu'en Europe.

Depuis quelques années, la demande pour les produits alimentaires exotiques est en pleine croissance en Europe et particulièrement en France (Volatier, 1997 ; Gillet, 1997). Le marché de l'alimentation exotique en Europe représente un chiffre d'affaires de plus de 10 milliards de Francs CFA (Bidima et Voufo, 2007). La vente des feuilles de *Vernonia* (ndolé), comme légume a fortement pris son ancrage en France et en Belgique où il existe de fortes communautés camerounaises (Bidima et Voufo, 2007). Des études révèlent d'ailleurs que le commerce du Ndolé est en train de s'étendre vers d'autres pays européens, tels que le Royaume Uni, l'Allemagne et la Suisse (Tabuna, 2000). En France, des études ont indiqué que 37 % des consommateurs achètent aujourd'hui des produits exotiques (Gillet, 1997 ; Volatier, 1997). Le Ndolé a donc sa carte à jouer, car, du fait de leur nombre et de leur pouvoir d'achat, les consommateurs européens constituent un débouché potentiel important (Tabuna, 2000). L'autre atout majeur est le nombre de restaurants africains qui augmentent rapidement en France comme dans d'autres pays européens (Leroux, 1996 ; Defrance, 1996). L'effort de promotion nécessaire pour faire découvrir le Ndolé au consommateur européen, la conquête du marché américain par les transformateurs camerounais de ndolé séché à travers l'AGO (African Growth and Opportunity Act) devraient être couplés à la maîtrise de la production, de l'amélioration pour une exploitation industrielle future du ndolé en tant que filière fiable pour l'avenir.

La demande en produits forestiers non ligneux dont celle des feuilles de *Vernonia amygdalina* est croissante à cause de ses nombreux usages. Cette espèce, consommée comme Légume Feuille Locale (LFL) au Cameroun constitue l'un des ingrédients d'un plat national camerounais (Kahane et al., 2005) très connu : le Ndolé. Il occupe la sixième place dans les dépenses alimentaires des populations urbaines du Cameroun parmi les légumes feuilles locaux (Kahane et al., 2005). En 1998, 98600 t de LFL ont été vendus au Cameroun dont 23 %

(21549 t) de vernonie (Yeap et *al.*, 2010). Le Ndolé fraîche habituellement conditionnée est vendue 4,55 \$ le kilogramme et sa poudre entre 7,5 et 10 \$ le kilogramme en 2010. Au Sud-Benin, il constitue le deuxième LFL le plus consommé (Vodouhe et *al.*, 2012) du fait de sa valeur nutritionnelle et de sa disponibilité. En Malaisie, son importance socio-culturelle et ethnobotanique lui vaut le nom sacré de Bismillah, qui veut dire, par le nom de Dieu (Mohd et *al.*, 2016). Aussi appelé vernonie commune dans les cahiers des agronomes, *V. amygdalina* est par ailleurs doté de plusieurs propriétés médicinales.

*Vernonia amygdalina* est un puissant antibactérien, antidiabétique, antihelminthique, antioxydant, analgésique et antipaludéen (Anoka et *al.*, 2008 ; Wazis et *al.*, 2013). Cependant, son utilisation comme aliment est limitée par le goût amer de ses feuilles. En effet, avant leur utilisation, elles doivent préalablement passer à un fastidieux processus de transformation artisanal visant à réduire leur goût amer. Les feuilles sont bouillies, broyées et rincées à plusieurs reprises à l'eau. Ce procédé est susceptible d'altérer les qualités nutritionnelles (Yeap et *al.*, 2010) ainsi que les propriétés médicinales de la plante même s'il contribue à détoxifier les feuilles. Il existe pourtant des espèces peu ou pas amères utilisées dans la confection des mêmes menus traditionnels.

*Vernonia calvoana* connu sous l'appellation de vernonie douce par les agronomes et communément appelé « Sweetbitterleaf » fait parti des LFL du Cameroun (Kahane et *al.*, 2005). Moins ubiquiste que *V. amygdalina*, son écosystème de prédilection se trouve en montagne (Biholong, 1986). Ses feuilles sont très prisées et possèdent pour plusieurs cultivars l'avantage de la saveur non amère des feuilles (Dupriez et De Leener, 1987). Dans la confection des plats de ndolés, *V. amygdalina* peut être remplacé par *V. calvoana* (Grubben & Denton, 2004). Ce dernier *Vernonia* est recommandé pour la commercialisation comme cultivars non amers, même si on n'établit pas de corrélations positives entre le goût et le rendement en feuilles (Mih et *al.*, 2008). Les deux vernonies qui font l'objet de la grande partie de cette étude sont des plantes cultivées et subspontanées (Tabuna, 2000). Ces deux vernonies sont le sujet de nombreux travaux car, la découverte de nouvelles substances thérapeutiques naturelles sans toxicité aucune ou moindre sur l'être humain, l'animal ou sur l'environnement, est actuelle (Yeap et *al.* 2010).

Un nombre considérable de travaux de recherches existent sur le statut nutritionnel des *Vernonia* comestibles alors que sur le plan agronomique et génétique, l'avancée est moindre (Opabode et Adebooye, 2005). Très peu d'études biochimiques, palynologiques, et caryologiques ont été effectuées (Dematteis et Salgado, 2001). Mbinglo (1998) affirme que la sélection variétale reste à faire.

Le développement d'une agriculture paysanne et urbaine archaïque sur de petites surfaces ne suffit pas à satisfaire la demande en ce légume. La nécessité de production de ce légume à grande échelle s'impose compte tenu de son utilisation binaire, en gastronomie et en pharmacologie. Schippers (2004) pose comme frein au développement de la culture de ce LFL entre autres, l'absence de cultivars améliorés et de technologies de production adéquates. La standardisation est une exigence essentielle de l'agriculture industrielle. D'où la nécessité de trouver un cultivar aux caractéristiques recherchées. Un inventaire de la ressource génétique disponible par la collecte des accessions est un préalable à cette démarche. Elle précède s'il en ait besoin l'élaboration d'un programme d'amélioration génétique. L'objectif de ce travail est d'étudier la variabilité génétique de *Vernonia* spp.. Cet objectif général est décliné en quatre objectifs spécifiques. Il s'agit précisément :

- de décrire la distribution du genre *Vernonia* au Cameroun en fonction de leurs utilisations;
- d'utiliser les paramètres palynologiques, organoleptiques et agro-morphologiques pour caractériser les variétés de *V. amygdalina* et *V. calvoana* ;
- d'utiliser les paramètres biochimiques pour caractériser les variétés ;
- d'évaluer les propriétés anti-microbiennes des extraits de feuilles des différentes variétés identifiées.

## **I.2. REVUE DE LA LITTERATURE**

### **I.2.1. Elements de Botanique**

#### **I.2.1.1. Taxonomie du genre *Vernonia***

Les espèces du genre *Vernonia* sont des Angiospermes du sous-embranchement des monocotylédones, de la famille des *Asteraceae*. Ils portent des inflorescences en capitules de fleurs à anthères soudées (synanthérie). Leurs fleurs de types tubulés les regroupent au sein de la sous-famille des tubuliflores tandis que leurs feuilles dentées pétiolées ou subsessiles, leurs capitules pourpres violets ou blancs à fleurs hermaphrodites, leurs anthères à bases sagittées et leurs bras de styles dressés effilés et velus en font des Vernonieae (tribu). Le genre se distingue des onze autres tribus de la sous-famille des tubuliflores par ses aigrettes uniformes et caduques, ses akènes ovés à 4 ou 7 côtés, et ses feuilles opposées ou verticillées.



Fig. 1. Rameau fleuri de *Vernonia*.

(A = Rameau fleuri *V. amygdalina* Del. ; B = Rameau fleuri *V. calvoana* Hook. (Biholong, 1986)).

### **I.2.1.2. Taxonomie de *Vernonia amygdalina* Del.**

*Vernonia amygdalina* est un arbuste de 2 à 5 m de hauteur, très ramifié, à rhytidome vert sombre avec tâches de lichens blanchâtres, moelle liégeuse en son milieu. Ses feuilles sont simples, alternes, lancéolées, ondulées et acuminées, à limbe pubescent et à capitules en corymbes denses, axillaires ou à panicules au sommet des branchettes, avec des fleurs blanchâtres. Ses akènes sont pointues à la base, évasées au sommet. *Vernonia amygdalina* possède des aigrettes à soies brunes roux, barbelées et caduques (Biholong, 1986).

### **I.2.1.3. Taxonomie de *Vernonia calvoana* Hook.**

Arbuste de 1 à 3 m de hauteur totale, *Vernonia calvoana* possède un rhytidome fissuré longitudinalement et plus ou moins rugueux, gris sombre. Les feuilles de cette espèce sont simples, lancéolées, légèrement décurrentes ou auriculées, denticulées et acuminées, molles et pubescentes. Le capitule est gros ou petit selon les variétés avec des bractées à teintes vertes ou blanchâtres et des fleurs à corolles violacées pâles qui donneront des akènes en bâtonnets noirâtres, striés et glabres, dont les soies sont plumeuses, barbelées et caduques (Biholong, 1986). Il existe deux variétés :

- *V. calvoana* (Hook.f.) Hook.f. var. *calvoana*: à gros capitules et à grandes feuilles ;
- *V. calvoana* var. *microcephala* C.D. Adams, à petits capitules et petites feuilles.

#### **I.2.1.4. Ecologie et cycle de développement**

On trouve *V. amygdalina* principalement en forêt secondaire, près des villages ou dans les jachères des zones forestières et des savanes péri-forestières. Cependant, elle est ubiquiste et reste adaptée à diverses conditions climatiques.

C'est une plante pérenne qui peut vivre plus de 7 ans. La floraison a lieu dès le début de la saison sèche (Décembre à Janvier) et se termine avec la libération d'achènes qui seront disséminés principalement par le vent. La plante peut aussi se multiplier de façon végétative (par les boutures).

*V. calvoana* est une espèce qui pousse en lisière des forêts de montagnes à 2 000 m d'altitude environ (Nkambé, Nkonsamba, Buéa, Dschang) au Cameroun. On la trouve aussi en Uganda, au Kenya, en Tanzanie, au Nigeria et en Ethiopie (Biholong, 1986). Elle est très exigeante en eau. L'espèce est annuelle mais, elle peut revêtir un caractère d'espèce pérenne, en fonction de la nature du sol. On retrouve près des ruisseaux des plantes de 3 m de hauteur ayant probablement 2 à 3 ans d'âge (Kalanda & Lisowski, 1995). Sa floraison a lieu en début de saison sèche (entre janvier et février), mais elle est plus étalée dans le temps que celle de *V. amygdalina*. Cette floraison et la libération des akènes marquent très souvent le dessèchement du pied mère.

### **I.2.2. Culture de *Vernonia***

#### **I.2.2.1. Mode de multiplication**

*Vernonia amygdalina*, couramment appelé vernonie commune, communément appelée « bitterleaf » pour le goût amer de ses feuilles (appellation anglosaxone) ou « ndolés amer » (appellation Douala) peut se reproduire par voie sexuée (graines) ou par voie végétative (boutures). La vernonie douce (*V. calvoana*) ou « sweet bitterleaf » (appellation anglosaxon) se reproduit principalement par voie sexuée. Il y aurait deux raisons probables qui justifieraient l'échec de la multiplication végétative chez *V. calvoana* (Mbinglo, 1998). Il a été noté que les boutures du « sweet bitterleaf » ne s'enracinent pas aisément. De plus, la plupart des plants sont desséchés bien avant la saison pluvieuse suivante; par conséquent, les boutures fraîches ne sont plus disponibles. Les deux espèces sont allogames et la pollinisation se fait par les insectes, l'eau et le vent (Biholong, 1986). La culture *in vitro* des jeunes racines de *Vernonia amygdalina* est possible en présence d'auxine. Khalafalla et al. (2009) Préconisent des doses d'IBA comprises entre 0,25 et 2 mg/l.

### **I.2.2.2. Préparation de la pépinière**

On réalise un billon en planche constitué de terre noire du jardin. Du compost peut y être ajouté ou 10 g/m<sup>2</sup> de sulfate d'ammonium. On répand alors sur la planche une mince couche de sciure de bois ou de terre tamisée. Les graines sont répandues sur la planche à la volée puis arrosées immédiatement. La pépinière doit être réalisée sous ombrière pour éviter les effets de la chaleur sur la viabilité des graines et le développement des plantules. Moins de sept jours pendant lesquels un arrosage régulier est effectué, suffisent pour voir les graines germer. Le repiquage quant à lui n'aura lieu que 10 semaines plus tard avec l'apparition de 3 à 4 feuilles par plantule de 5 cm de hauteur au moins pour *V. amygdalina* tandis qu'il aura lieu 6 semaines après le semi pour *V. calvoana*.

### **I.2.2.3. Transplantation**

Les plants doivent être repiqués en champ une fois sortie de l'ombrière suivant un écartement de 75 cm entre lignes et colonnes pour la vernonie douce. Quant à la vernonie commune, un séjour supplémentaire de deux semaines à l'ombrière dans des sachets de pépinière peut être bénéfique en rendement. Portés en champ, les plants sont mis dans des trous suivant un écartement de 0,8 m dans les lignes et 1m entre les lignes. Les trous sont recouverts de terre noire. De l'engrais chimique ou organique peut y être ajouté (engrais ammoniacal). Cette transplantation doit avoir lieu en début de saison pluvieuse car la vernonie douce (*V. calvoana*) en particulier est une espèce très exigeante en eau ; à défaut, un arrosage quotidien doit être effectué. La vernonie peut aussi être cultivée sur buttes ou sur billons, en culture associée ou isolée.

### **I.2.2.4. Récolte**

Djonga (1985) propose un protocole de récolte de la vernonie commune qui commence un mois après le repiquage. Il cueille au premier mois les feuilles de la plante sans détruire l'apex. Au second mois il taille la tige à environ 20 cm du sol. On alterne ainsi tous les mois, récolte des rameaux et cueillette des feuilles pour optimiser les rendements. Cependant les propriétés organoleptiques ainsi que les dimensions des feuilles changent avec l'âge de la plante. Les feuilles d'une jeune vernonie paraissent plus attrayantes au marché et plus larges que les feuilles d'une tige âgée qui sont plus ternes, plus petites, et beaucoup plus amères. Une exploitation à l'échelle industrielle devrait tenir compte de ces changements de propriétés organoleptiques des feuilles avec l'âge de la plante.

### **I.2.2.5. Traitement post – récolte**

Une fois récoltées, les feuilles de vernonies peuvent être vendues fraîches ou séchées sur le marché. Les feuilles seront toujours lavées avant la consommation. Le lavage est un processus mécanique et/ou chimique qui consiste à réduire l'amertume et la toxicité des feuilles de « ndolés » afin de les rendre comestibles. Ce procédé réduit considérablement le taux de saponine et d'acide vernonique contenues dans les feuilles et altère ses propriétés nutritionnelles (Yeap et *al.*, 2010). La conservation de la vernonie se fait par séchage ou par le froid (congélateur).

### **I.2.2.6. Ennemies de la vernonie**

*Vernonia amygdalina* et *V. calvoana* ont en commun beaucoup d'ennemies dont les escargots qui consomment de façon dévastatrice les feuilles. On peut les capturer au couché du soleil ou à l'aurore.

*V. amygdalina* peut être attaqué par quelques viroses. Misari (1992) a listé 97 espèces d'insectes parasites de *Vernonia* spp. au nord du Nigéria dont : *Empoaca* sp., *Sphearocoris annulus*, *Fabricius* sp., *Ptyelus grossus*, *Polyclaeis* sp., *Xanthochelus vulneratus*. *Lixus camerunus* creuse des tunnels le long des branches et de la tige de *vernonia*, causant la cassure des branches et l'arrêt de la croissance.

La fusariose est une maladie de *V. calvoana*. Les aphidiens, escargots et criquets sont aussi des ennemies du « sweet bitterleaf ». *Zonocerus variegatus* n'attaque la plante qu'en fin de pluies et en début de la sécheresse.

## **I.2.3. Usages de la vernonie**

### **I.2.3.1. Usage alimentaire**

La vernonie est consommée comme légume. Localement connu sous les noms « ndolès » pour les Douala, « Atet » ou « Metet » pour les Ewondo, « Yolo yolo » pour les Boulou, le « Midoa » pour les Bakolo, « Lindoa ou Mandoa » pour les Bassa, « Lekan » pour les Dschang, « Balakan » pour les Maka, « Butmao » pour les Bangantés, bitterleaf pour les Bamenda, la vernonie constitue l'un des ingrédients d'un plat national camerounais (Kahane et *al.*, 2005). Il occupe la sixième place dans les dépenses alimentaires des populations urbaines du Cameroun parmi les Légumes Feuilles Locaux (Kahane et *al.*, 2005). Au Sud-Benin, il constitue le deuxième LFL (Légume Feuille Local) le plus consommé (Vodouhe et *al.*, 2012) du fait de sa valeur nutritionnelle et de sa disponibilité.

Atangwho et *al.* (2009) dosent et trouvent dans les feuilles de *V. amygdalina* 23,25% de protéines, 16,05% de fibres, 3,53% d'acides gras. Ils y trouvent les vitamines A, E, C,

riboflavines, thimines et niacines. Les sels minéraux sont aussi présents tels : Manganèse ( $0,07\pm 0,03$  mg/100g), Sésium, ( $0,01\pm 0,00$  mg/100g), Zinc ( $0,04\pm 0,01$  mg/100g), fer ( $0,14\pm 0,01$  mg/100g), cuivre ( $0,10\pm 0,00$  mg/100g), magnésium ( $0,43\pm 0,00$  mg/100g), chrome ( $0,04\pm 0,01$  mg/100g). Sodamade (2013) attribue à la présence de ces protéines et ces sels minéraux de nombreuses propriétés fonctionnelles dans l'organisme.

### **I.2.3.2. Vertus médicinales**

*Vernonia amygdalina* est doté de plusieurs propriétés médicinales. C'est un puissant antibactérien, antidiabétique, antihelminthique (Fig. 2), antioxydant, analgésique et antipaludéen (Anoka et al, 2008 ; Wazis et al., 2013). Sobrinko et al. (2015) lui attribuent en plus des propriétés antiplasmodiales, analgésiques, anti-inflammatoires et anti-cancéreuses. Cependant, son utilisation comme aliment est limitée par le goût amer de ses feuilles. En effet, avant leur utilisation, elles doivent préalablement passer par un fastidieux processus de transformation artisanal visant à réduire leur goût amer.

*Vernonia calvoana* est plus considéré par les populations comme un légume feuille qu'une plante médicinale. Cependant, il lui a été trouvé des vertus anti-tumorales car ses extraits inhibent l'activité des cellules tumorales (Kupchan et al., 1969 ; Kiplimo, 2012).

En pharmacopée traditionnelle, c'est l'eau qui est le solvant le plus utilisé. Les métabolites sont administrés aux patients sous forme de décoctions ou d'extraits aqueux de feuilles. *Vernonia amygdalina* possède des propriétés antiscorbutiques et digestives (Kalanda & Lisowski, 1995). Les décoctions de feuilles sont utilisées contre la fièvre, le paludisme et les vers intestinaux. Les feuilles de vernonies combattent le mal gastrique, induisent la fertilité et servent de laxatif. Au Nigeria, ces feuilles constituent un substitut de l'iode. Les propriétés antimicrobiennes de *Vernonia* sont aussi utilisées en médecine vétérinaire ou en phytopathologie.

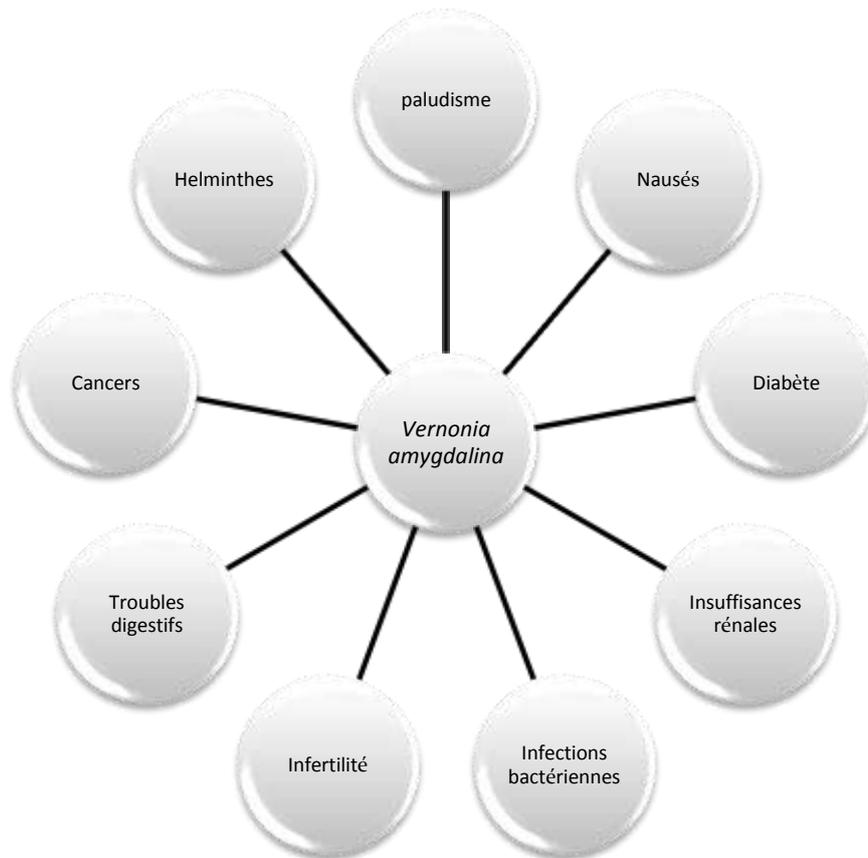


Fig. 2. Usages traditionnels de *Vernonia amygdalina* (Farombi et Owoeye, 2011).

Mbinglo (1998) mentionne diverses propriétés du *V. calvoana*. Un bain avec ses extraits de feuilles dilués guérit de la pneumonie. Les feuilles bouillies calment l'hypertension, arrêtent la diarrhée et traitent la jaunisse.

### **I.2.3.3. Autres usages**

*V. amygdalina* possède plusieurs usages. Sa tige et ses branches sont en fin de saison sèche un excellent bois de chauffage. Certaines cultures l'utilisent comme haie vive. Krief (2003) affirme que les chimpanzés consomment les feuilles de *V. amygdalina* contre les nématodes intestinaux. Les paysans Rwandais utilisent les mêmes feuilles pour lutter contre les strongles gastro-intestinaux des caprins (Aodelu et *al.*, 2007). Brunet (2008) démontre que les polyphénols contenus dans les plantes telles que le *Vernonia* détruisent les nématodes du tube digestif des ruminants. Les extraits de *Vernonia* sont utilisés comme plante support dans la phytoépuration (Agwaramgbo et *al.*, 2012) et comme pesticides (Ekpendu, 2014 ; Mwanauta et *al.*, 2014).

## I.2.4. Généralités sur le grain de pollen

### I.2.4.1. Définition

Le grain de pollen est l'organe reproducteur ou gamétophyte mâle des Angiospermes. Généralement haploïde, il dérive de la maturation de la microspore par le développement des structures spécialisées telle que l'exine. L'étude du grain de pollen ainsi que celle de la spore se fait dans le cadre d'une même science appelée palynologie (Judd et *al.*, 1999).

### I.2.4.2. Palynologie structurale

La palynologie structurale utilise soit le pollen fossilisé naturellement, soit le pollen fossilisé artificiellement ou séché naturellement (Ambougou, 1991). Le premier matériel est utilisé par la géologie, la paléobotanique, la paléoclimatologie et l'archéologie. Le second matériel intéresse surtout la botanique, l'écologie, la méliissopalynologie, l'aéropalynologie, la criminologie et la sociologie. Le grain de pollen est recouvert d'une paroi plus ou moins épaisse et fossilisable appelée sporoderme. Le sporoderme (Fig. 3) comprend une partie externe qui est l'exine recouvrant l'intine. La structure du sporoderme a été décrite par Cerceau et *al.* (1983) tenant compte des structures préalablement établies par Erdtman (1948) et Faegri (1958). La structure de l'exine constitue un critère taxonomique de choix au sein des Angiospermes.

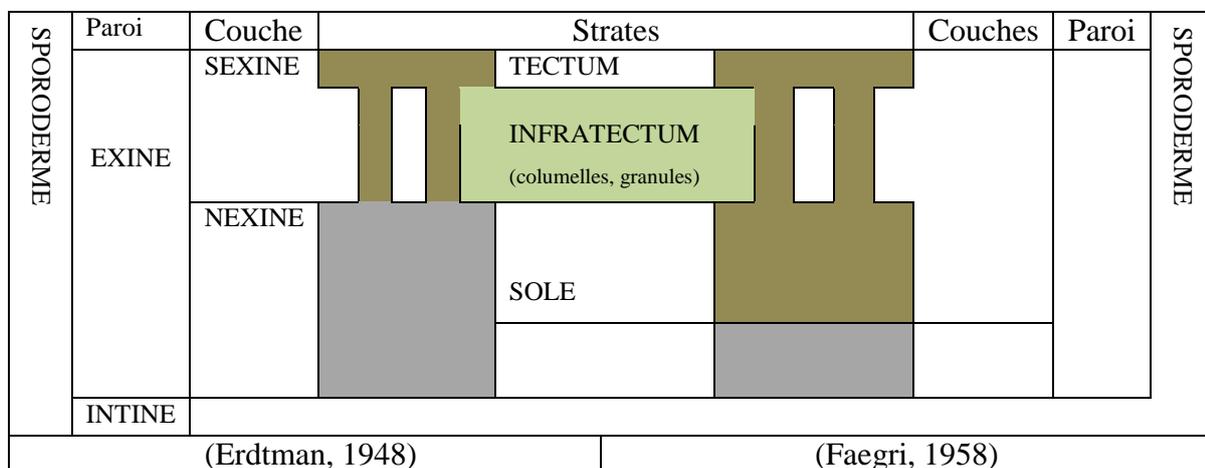


Fig. 3. Structure du sporoderme des pollens (Cerceau-Larrival & Hideux, 1983).

#### I.2.4.2.1. Exine

L'exine est la paroi la plus externe du pollen. Elle est constituée de sporopollénine, polymère oxydé de caroténoïdes et d'esters de caroténoïdes (Ambougou, 1991). Cette

composition chimique confère au pollen sa résistance et son élasticité. L'exine comprend deux couches : une sexine externe qui recouvre une nexine.

La structure lisse, échinulée, perforée, striée ou réticulée du tectum est une source importante d'informations en systématique. La sculpture du tectum définit le degré d'adhésion du grain de pollen aux pollinisateurs et, par conséquent son mode de dissémination (Judd et *al.*, 1999).

#### **I.2.4.2.2. Intine**

Située sous l'exine, l'intine est généralement plus mince le long du sporoderme mais, relativement plus épaisse au niveau des apertures. L'intine a une composition essentiellement pectocellulosique (Cerceau-Larrival., 1973) qui ne résiste pas à la fossilisation du grain par traitement physicochimique ou naturellement.

#### **I.2.4.2.3. Terminologie du grain de pollen**

La caractérisation d'un pollen ainsi que sa classification dans un taxon déterminé suit les principes des clés d'identification. Ces clés tiennent compte : de la symétrie, de la forme, des dimensions, des apertures, des structures et ornements de l'exine.

##### **I.2.4.2.3.1. Symétrie**

La symétrie est définie suivant la disposition des microspores dans la tétrade. Il existe deux sortes de symétries. L'une est définies par rapport au nombre d'apertures et l'autre par la connaissance du plan P qui joint les deux pôles et du plan E qui divise les deux pôles en deux hémisphères (Cerceau - Larrival et *al.*, 1983 cit. Djoumessi, 2002). Ambougou (1991) propose 3 types de symétrie. Le pollen est dit :

- isopolaire si les hémisphères sont semblables ;
- hétéropolaire si les hémisphères sont différentes ;
- apolaire dans le cas où l'on ne distingue pas les pôles.

##### **I.2.4.2.3.2. Forme**

La forme du pollen est étroitement liée à la symétrie (Kremp, 1965 cit. Ambougou, 1991), les pollens (sub) circulaires et octogonaux sont généralement apolaires. Les pollens subcirculaires à 3 apertures, les pollens triangulaires et les pollens trilobés sont isopolaires. Les formes convexes et subtriangulaires arrondies sont des pollens hétéropolaires.

##### **I.2.4.2.3.3. Dimensions**

On peut mesurer la taille d'un grain de pollen, les dimensions de ses apertures et l'épaisseur de l'exine. La taille du pollen est quant à elle déterminée par la mesure du

diamètre équatorial et du diamètre polaire. Des oculaires à micromètres permettent d'évaluer ces paramètres au microscope optique. Le rapport : diamètre polaire (P) sur diamètre équatorial (E) est important dans la détermination de la forme du pollen. Le grain de pollen peut être équiaxe ou sphéroïdal ( $P/E=1$ ) ; prôlé ou longiaxe ( $P/E>1$ ), oblé ou bréviaxe ( $P/E<1$ ) (Ambougou, 1991). En général, les grains de pollen ont un diamètre compris entre 10  $\mu\text{m}$  et 350  $\mu\text{m}$  (Judd et *al.*, 1999).

#### I.2.4.2.3.4. Apertures

Les apertures sont des ouvertures ou des amincissements du sporoderme dont la disposition et la morphologie sur le pollen sont déterminées dans la tétrade (Fig. 4). Ces apertures peuvent correspondre à des pores pour les pollens dits porés, ou à des sillons (colpus) pour des pollens dits colpés. Lorsque les pores et les apertures sont associés au sein du même grain de pollen, on dit qu'il est colpore. Selon qu'un pollen ait un, deux, trois ou plusieurs pores, il est dit mono, di, tri ou polypore (Fig. 4). S'il s'agit des sillons, on parle de pollens monocolpés, dicolpés, tricolpés et polycolpés. Si les pores et les sillons sont associés, on parle de pollens : monocolporés, dicolporés, tricolporés et polycolporés ou stéphanocolporés (Faegri & Iverson, 1950 ; Gifford & Foster, 1988).

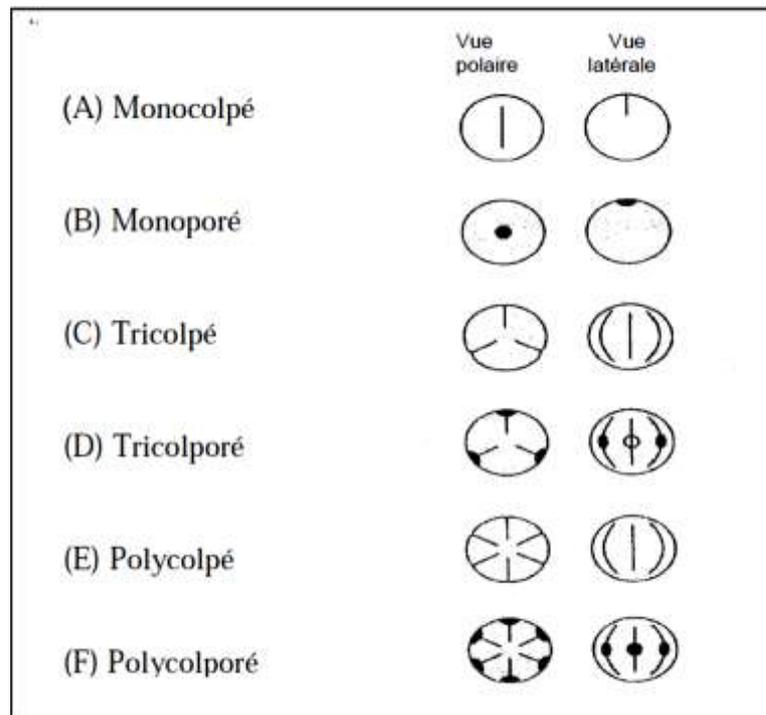


Fig. 4. Représentation schématique de quelques types d'apertures de pollens. (Gifford & Foster 1988; Faegri & Iverson 1950).

#### I.2.4.2.3.5. Ornémentations du tectum

Les gravures du tectum confèrent au grain de pollen des aspects variés : ridé ou crépelé, rugueux, lisse, échinulé, bosselé, mamelonné, verruqueux, pustuleux, dallé (Dongock, 2003). Les grains de pollens ont des tailles très variables. Les plus petits grains de pollens ont environ 10 µm de diamètre tandis que les plus grands ont 350 µm de diamètre chez les Anonacées (Judd et *al.*, 1999). Strarka (1964 cit. Dongock, 2003) et Ricciadelli (1998) proposent une classification des principales catégories de pollens en fonction de leurs tailles (Tableau I).

Tableau I. Principales catégories de tailles des grains de pollen (Strarka et *al.*, 1998 cit. Dongock, 2003)

Tailles (µm)	Catégories de grains de pollen
<10	Très petit ( <i>Alkanna tinctoria</i> Tausch)
10-25	Petit ( <i>Mentha pulegium</i> L.)
25-50	Moyen ( <i>Eriobotrya japonica</i> Lindley)
50-100	Grand ( <i>Citrullus lanatus</i> Nansfeld)
100-200	Très grand ( <i>Musa paradisiaca</i> )
>200	Géant (courge)

#### I.2.4.3. Genèse du grain de pollen

La formation du pollen se fait dans la jeune anthère. C'est une différenciation de cellules staminales spécifiques (archéosporés) qui met en place les cellules sporogènes desquelles dérivent les cellules mères de tétraspores. A partir de la cellule mère, on peut recenser 4 étapes aboutissant à la formation du grain de pollen (Ambougou, 1991) :

- le stade préméiose, caractérisé par la dilatation du périplasma et la formation des premiers éléments du substrat thécal qui entourent toute la cellule mère ;

- le stade méiose, division réductionnelle et équationnelle aboutissant à une tétrade dont la disposition des cellules est variable selon les taxons, dans une paroi spéciale callosique temporaire préalablement érigée pour préparer l'initiation du gamétophyte ;

- le stade tétrade, correspondant à la mise en place par le gamétophyte dans la tétraspore de la trame polysaccharidique génératrice des premiers dépôts protoexiniques faisant suite à de profonds changements au niveau cellulaire ;

- le stade jeune microspore, manifesté par le début de la digestion de la callose, les jeunes microspores et leurs primexines non encore sporopolléniques au contact du substrat thécal ;

- le stade microspore avancé, fait observer un accroissement et une modification de la future ectexine par pompage d'éléments figurés ou moléculaires d'origine sporophytique, ce qui assure le début de la polymérisation de la sporopollénine, l'endexine est mise en place ;

- le stade jeune pollen binuclée, pendant lequel il y a division du noyau en noyau reproducteur et en noyau végétatif, différenciation du cytoplasme, l'achèvement de la polymérisation de la sporopollénine parallèlement à la déhiscence plus ou moins marquée du tapis ;

- le stade anthèse, à pollen bi ou trinuclee suivant les familles végétales, ou le pollen adulte est libéré dans la nature en fonction des conditions climatiques externes qui agissent sur les constantes biophysiques dans l'anthère.

#### **I.2.4.4. Viabilité des grains de pollen**

La viabilité du pollen est son aptitude à féconder l'oosphère (Perry & Hiron, 1967). Cette viabilité peut être mise en évidence par sa capacité germinative, son activité enzymatique, ou encore par la présence ou non des cytoplasmes (Judd *et al.*, 1999).

La capacité germinative du pollen est son aptitude à germer, c'est-à-dire son aptitude à former un ou plusieurs tubes au travers de ses apertures. Expérimentalement, on évalue le pourcentage de germination *in vitro* des pollens par comptage du nombre de pollens germés sur le total de pollens incubés. Cette étude requiert la maîtrise des conditions de culture du pollen : température, humidité, pH, composition en sucre et en sels minéraux du milieu de culture. Youmbi (1993) distingue deux principaux types de milieux de base : le milieu liquide tel celui de Visser (1955) ; et le milieu solide auquel on a ajouté l'agar ou la gélatine tel celui de Duffield et Snow (1941). Quelques milieux de base de culture de pollens vivants ont été établis dont celui de Brink (1924), celui de Bruwbeker et Kwack (1963) et celui de Heslop-Harrison (1977).

Le test d'Alexander permet aussi d'estimer la viabilité d'un lot de pollens (Youmbi, 1993). Le colorant d'Alexander colore en rouge le cytoplasme et en vert l'exine. La stérilité du pollen étant caractérisée par l'absence du cytoplasme, une goutte d'Alexander sur un lot de pollens distingue les pollens viables colorés en rouge des pollens stériles verts.

#### **I.2.4.5. Conservation de la viabilité du pollen**

La conservation du pollen est une voie très importante dans le cadre de la conservation des ressources phytogénétiques et en amélioration végétale. Visser (1955) pense que le transport du pollen est plus aisé que celui d'une plante vivante et la transmission des maladies par le pollen n'est pas prouvée. Lorsque deux variétés ont des périodes de floraison décalées, la conservation du pollen de l'une permet la fécondation de l'autre. La protandrie est souvent un obstacle à l'autopollinisation tel chez *Vernonia galanensis* (Dierieg, 1993). La conservation du pollen de cette espèce en vue de son utilisation ultérieure pour féconder l'oosphère mature permettrait de fabriquer des lignées pures. La conservation du pollen permet donc de résoudre les problèmes de distances et de temps de floraison dans les programmes d'amélioration génétique.

La conservation du pollen semble être influencée par les facteurs génétiques, la température, l'humidité et la pollution environnementale (Djoumessi, 2002). La durée de viabilité du pollen dépend du groupe taxonomique (Judd et *al.*, 1999). En général, les facteurs génétiques influencent la conservation des pollens d'Angiospermes. Pickert (1988) pense que les pollens trinucclés germent aisément *in vitro* et se conservent longtemps tandis que les binucclés germent et se conservent difficilement. Les pollens de *Graminées* ont une durée de vie courte tandis que les pollens des espèces des genres *Prunus* et *Pyrus* sont viables pendant longtemps.

Les pollens se conservent mieux à basse température et à humidité faible (Visser, 1955). Trois principaux modes de conservation du pollen sont utilisés: la cryoconservation (-196 °C), la conservation au congélateur (-20°C) et la conservation au réfrigérateur (4°C).

#### **I.2.4.6. Libération et mode de dispersion des pollens chez les *Asteraceae***

Les *Asteraceae* présentent un mode de libération particulier de pollens (Judd et *al.*, 1999). Les étamines connectées les unes aux autres et soudées entourent le style. Au cours du développement de la fleur, le style comme un piston pubescent, émerge du tube constitué par les anthères soudées autour de lui, racle le contenu des anthères ouvertes vers l'intérieur afin de le mettre à la disposition des insectes pollinisateurs. Plus tard, le stigmate, complètement épanoui devient réceptif (Yeo, 1993).

La complexité des structures anatomiques de *Cichorium intybus* (*Asteraceae*) étudiée à travers ses organes reproducteurs, facilite la compréhension de la reproduction chez les *Asteraceae* (Fig. 5)

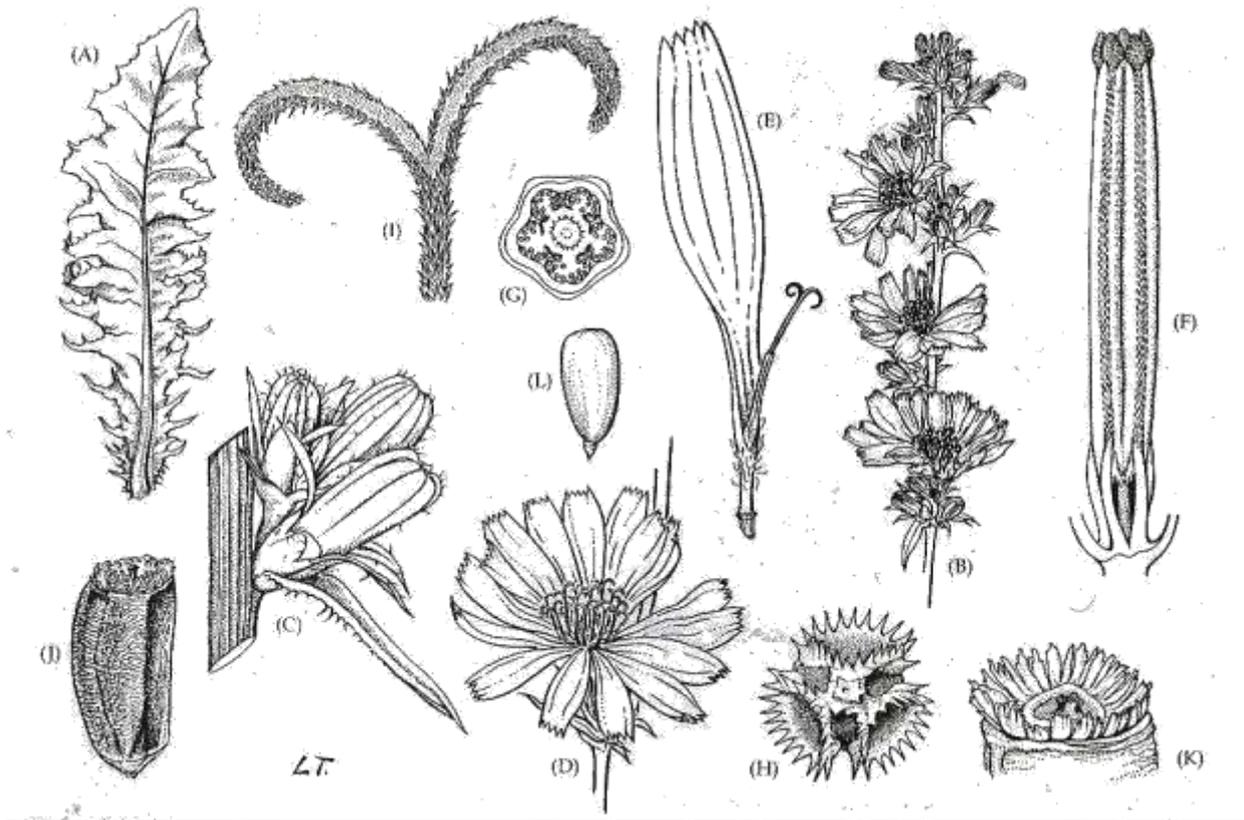


Fig. 5. Complexité des structures anatomiques des *Cichorioideae* (*Asteraceae*).

(A-L) *Cichorium intybus* : (A) feuille, (B) partie supérieure d'un rameau fleuri, (C) inflorescences axillaires, (D) Capitule, (E) fleur ligulée à 5 pétales, (F) Anthère, (G) coupe transversale de l'anthere, (H) pollen en vue pollaire, (I) style terminée par un stigmate, (J) achène, (K) détail du pappus, (L) graine (Judd et *al.*, 1999).

#### I.2.4.7. Importance du pollen

L'étude des pollens (palynologie) concerne différents secteurs d'intervention et trouve de nombreuses applications (Youmbi, 1993). La botanique et la biologie végétale sont essentiellement concernées par les travaux de morphologie pollinique, cette approche permet de progresser sans cesse dans la connaissance de différents types de pollen et est à la base de toutes les autres applications :

- en biopalynologie, la physiologie du pollen vivant est étudiée en vue de la conservation des ressources phytogénétiques et la réalisation des programmes d'amélioration génétique ;
- en aeropalynologie, le contenu pollinique de l'air est défini en accord avec les dates de floraison et les courants atmosphériques ;
- en mélioppalynologie où les contenus polliniques des miels sont étudiés en vue d'améliorer les produits et de réprimer les fraudes ;

- en géologie, les pollens trouvés dans les sédiments et les sites géologiques permettent de reconstituer la végétation du passé, de dater les strates, de caractériser les variations climatiques au cours du temps, et contribuent aux recherches de charbon et de pétrole.

- en immuno-allergie, le pollen permet de préparer des extraits de bonne qualité qui sont utilisés pour le diagnostic et le traitement de désensibilisation des maladies (Cerceau - Larrival, 1990).

## **I.2.5. Elements de phytochimie**

### **I.2.5.1. Importance des métabolites secondaires**

#### **I.2.5.1.1. Définition**

Le métabolisme secondaire peut désigner un métabolisme dont la distribution taxonomique serait restreinte et dont la contribution au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes serait insignifiante. La finalité de ce métabolisme serait la formation de molécules par les végétaux caractéristiques de certains taxons dont le rôle sur les fonctions de base qui régissent la croissance et le développement de la plante n'est pas déterminant par rapport au métabolisme primaire. Le métabolisme secondaire s'oppose ainsi au métabolisme primaire qui désigne un métabolisme à la fois universel et participant aux fonctions cellulaires (Photosynthèse, respiration, croissance et développement). Des molécules formées à l'issue du métabolisme primaire dérivent diverses réactions biochimiques aboutissant à la formation des métabolites secondaires (Crozier et *al.*, 2006).

A mesure de l'accumulation de données, il est apparu que la distribution taxonomique de certains composés était parfois centrée sur des groupes taxonomiques très ciblés. L'idée a alors germé d'utiliser ces composés comme des outils pour aider à la résolution de problèmes taxonomiques, ce qui a conduit à tout une série d'excellents développements dans le cadre de ce qu'on a appelé la « chimiotaxonomie » (Kiplimo, 2012).

L'étude et la connaissance de ces composés trouvent en effet des applications évidentes dans le domaine médical, et les perspectives de retour sur investissement ont largement contribué à leurs développements. Mais au-delà de ces applications, il faut avoir conscience que beaucoup de métabolites secondaires sont réellement au cœur de bien d'autres problématiques très concrètes: agroalimentaire (arômes, parfums, toxines, composés antinutritionnels), horticulture (pigments floraux), foresterie (problèmes de qualité du bois), écologie (allélopathie, résistances aux bioagresseurs). De très nombreux professionnels de ces filières utilisent quotidiennement tel ou tel métabolite secondaire comme critère de qualité

(répression des fraudes...), comme objectif de production (exemple du latex) ou de sélection variétale (Anonyme, 2009).

#### **I.2.5.1.2. Grands groupes de métabolites secondaires**

On distingue trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux. Ce sont : les alcaloïdes et composés azotés, les composés phénoliques, les composés terpéniques. Au dernier groupe on ajoute les hétérosides, constitués de dérivés glycosylés de composés terpéniques, phénoliques et plus rarement d'alcaloïdes. Les composés terpeniques comprennent les molécules plus complexes qui correspondent à des condensations de molécules provenant des alcaloïdes, des flavonoïdes et des phénols.

Les classifications des métabolites secondaires sont généralement basées sur la nature biochimique des molécules ou leurs origines biosynthétiques. Les alcaloïdes en particulier se distinguent par la nature biochimique de leurs structures qui leur confère des propriétés et des effets biologiques particulières. Les composés terpéniques sont par ailleurs définis par leur origine biosynthétique.

##### **I.2.5.1.2.1. Alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques qui s'extraient soit dans l'eau acide soit dans des solvants comme le chloroforme après alcalinisation. L'activité pharmacologique est très souvent mise en évidence (Wink, 1998 ; Cruzet, 2006). Ils ont la propriété de réagir avec des sels de métaux lourds tel celui du réactifs iodométalliques (réactif de Dragendorff) et sont très souvent biologiquement actifs. On retrouve en effet des molécules comme la quinine, des drogues (cocaïne), des anticancéreux (la vincristine et le taxol), des molécules utilisées comme poisons (strychnine) et des stimulants (caféine). La plupart des alcaloïdes naturels sont d'origine végétale. On les retrouve essentiellement chez les angiospermes. L'amertume est une caractéristique anti-nutritionnelle générale des alcaloïdes. Par contre très peu sont volatiles, à l'exception de la conine à l'origine de l'odeur de souris dégagée par le froissement de feuilles de cigüe.

On distingue généralement (Fig. 6) :

- les alcaloïdes vrais, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle : exemple la strychnine dérivée du tryptophane;
- les proto-alcaloïdes, qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine) ;
- les pseudo-alcaloïdes, qui ne dérivent pas d'acides aminés (exemple : la caféine).

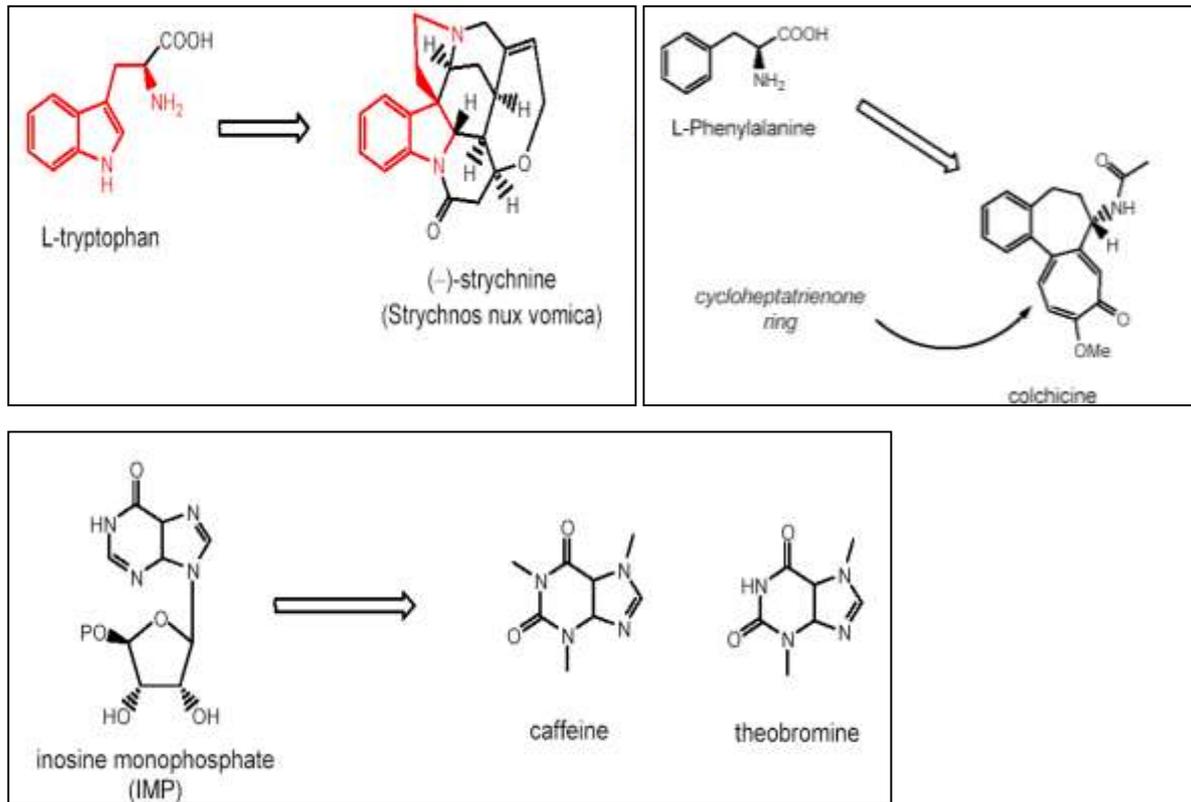


Fig. 6. Biosynthèse d'alcaloïdes à partir d'acides aminés.

Il existe une très grande diversité de sous-familles d'alcaloïdes, qui ont été classés en fonction de leurs origines biosynthétiques et de la nature des hétérocycles azotés (dépendamment bien sûr de l'avancée des connaissances sur les voies de biosynthèse). Certains alcaloïdes complexes (Fig. 7) associent des noyaux azotés dérivés d'acides aminés, à des résidus terpènes (exemple : alcaloïdes indoliques monoterpéniques de la pervenche de Madagascar qui sont utilisés comme anticancéreux).



Fig. 7. Alcaloïde complexe : la lupanine.

Au-delà des implications médicales, certains alcaloïdes sont directement au cœur de considérations agronomiques. Les graines de lupin peuvent par exemple contenir des quantités importantes d'alcaloïdes quinolizidiniques (dérivés de la lysine) qui posent à la fois des problèmes de toxicité (dans le cadre de l'alimentation animale, il existe cependant des variétés de lupins blancs pauvres en alcaloïdes) mais également d'amertume (alimentation humaine, le problème est résolu par des procédés de saumures qui permettent de s'affranchir des alcaloïdes).

Les seuls alcaloïdes glycosylés sont les alcaloïdes stéroïdiens (glucoalcaloïdes) dont le squelette carboné est largement dérivé des terpènes. On retrouve ces molécules chez les solanaceae, avec par exemple la solanine, un composé toxique présent chez la pomme de terre parfois même dans les tubercules, ou la tomatine impliquée dans la résistance de la tomate à certains pathogènes. Dans les tubercules de pommes de terre, on ressent la présence de glycoalcaloïdes à partir d'environ 14 mg/g, la sensation de brûlure dans la bouche et le système digestif survient à partir de 20 mg/g. Cependant, les faibles doses contribuent à l'arôme de pomme de terre attendu par le consommateur.

#### **I.2.5.1.2.2. Polyphénols**

Les polyphénols sont constitués en grande partie des phenylpropanoïdes qui dérivent de la phénylalanine (Fig. 8). Les polyphénols encore appelés composés aromatiques regroupent des composés non azotés présentant des cycles aromatiques, le plus souvent solubles dans l'eau et présents sous forme de glycoconjugués.

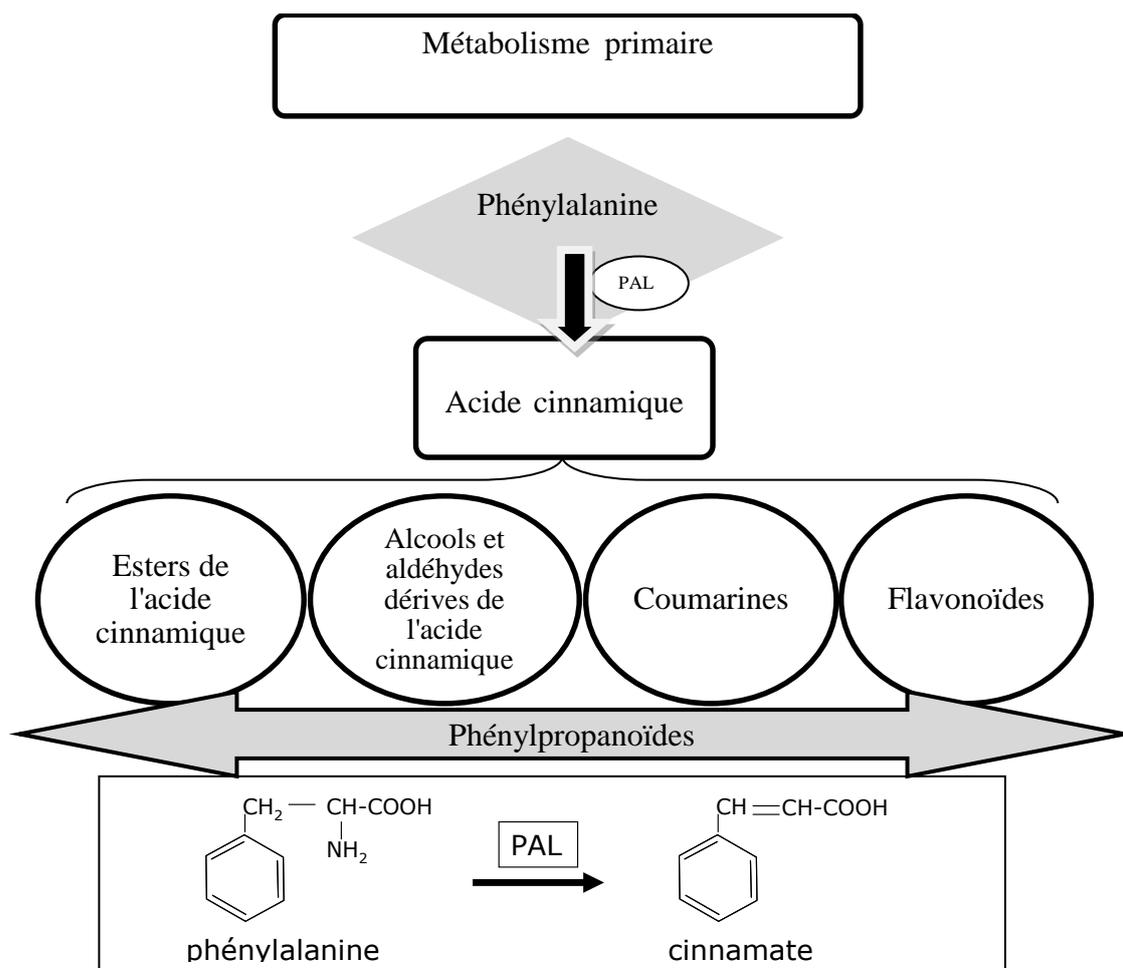


Fig. 8. Biosynthèse de polyphénols par voie d'acide cinnamique.  
PAL= Phényl Alanine Lyase.

Ils comprennent des petits composés biologiquement actifs comme l'acide salicylique et certaines isoflavones, des composés présents dans certaines huiles essentielles (en association avec des terpènes à faible poids moléculaire). Les composés anti-nutritionnels comme les tanins, et la lignine, un polymère de haut poids moléculaire formé à partir d'unités dérivées de l'acide cinnamique appartiennent aussi à cette famille de composés.

#### I.2.5.1.2.3. Esters, alcools, aldéhydes et dérivés simples de l'acide cinnamique

Ce groupe de composés est souvent utilisé dans des domaines alimentaires et cosmétiques. On retrouve notamment l'éthyl-cinnamate dans le parfum de la cannelle, l'acide rosmarinique comme constituant des huiles essentielles de Labiées. La vanilline, l'anéthol de l'aneth, l'eugénol du clou de girofle. Quelques uns présentent des propriétés anti-microbiennes.

#### I.2.5.1.2.4. Coumarines

Les coumarines sont issues de la cyclisation du résidu C3 de dérivés du cinnamate. Ces composés sont souvent synthétisés en réponse à des attaques pathogènes. On parle de coumarines pour les dérivés du noyau de base qu'est la coumarine (Fig. 9). Plusieurs coumarines ont des propriétés bactériostatiques, ces composés représentent donc des phytoalexines chez un certain nombre de plantes (ex : la scopolétine qui s'accumule chez le tabac au cours de la réaction hypersensible). La coumarine est une molécule aromatique (au sens olfactif). Elle est présente sous forme glycoconjuguée chez certaines graminées (ex : la flouve odorante), mais c'est lorsque les tissus sont endommagés par la coupe que les glycosidases libèrent la coumarine libre à l'origine de l'odeur de foin coupé. La coumarine est utilisée dans la composition de nombreux parfums et pour aromatiser des alcools telle la vodka polonaise.

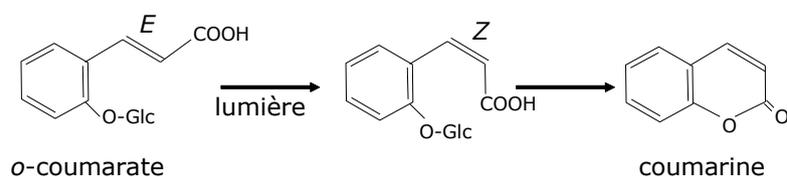


Fig. 9. Synthèse de coumarine.

#### I.2.5.1.2.5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés phénylpropanoïdes solubles dans l'eau, souvent incolores ou jaunes. Ces composés sont des dérivés de la naringénine-chalcone, elle-même issue de la condensation de trois résidus malonyl-CoA avec une molécule d'acide cinnamique. Il s'agit donc de dérivés phénylpropanoïdes. La structure de base comporte deux cycles aromatiques à 6 carbones joints par un hétérocycle à oxygène. Les flavonoïdes constituent en eux même une famille de composés extrêmement vaste, jouant des rôles physiologiques importants (interactions Légumineuses/Rhizobium, filtres UV...). La variété des composés est essentiellement liée au degré d'hydroxylation/méthylation/glycosylation de chacun des trois cycles des molécules de base. De nombreux flavonoïdes présents dans les produits de consommation présentent un intérêt d'un point de vue de la santé humaine et font l'objet de nombreuses allégations concernant la santé, particulièrement de par leur caractère anti-oxydant.

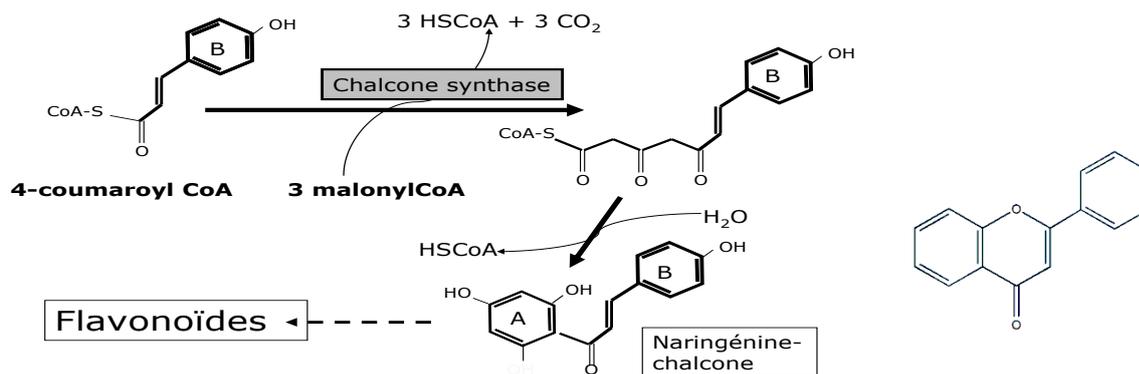


Fig. 10. Biosynthèse des flavonoïdes.

Les principales catégories (Fig. 11) de flavonoïdes sont définies par la présence ou l'absence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C, qui déterminent la planéité de la molécule.

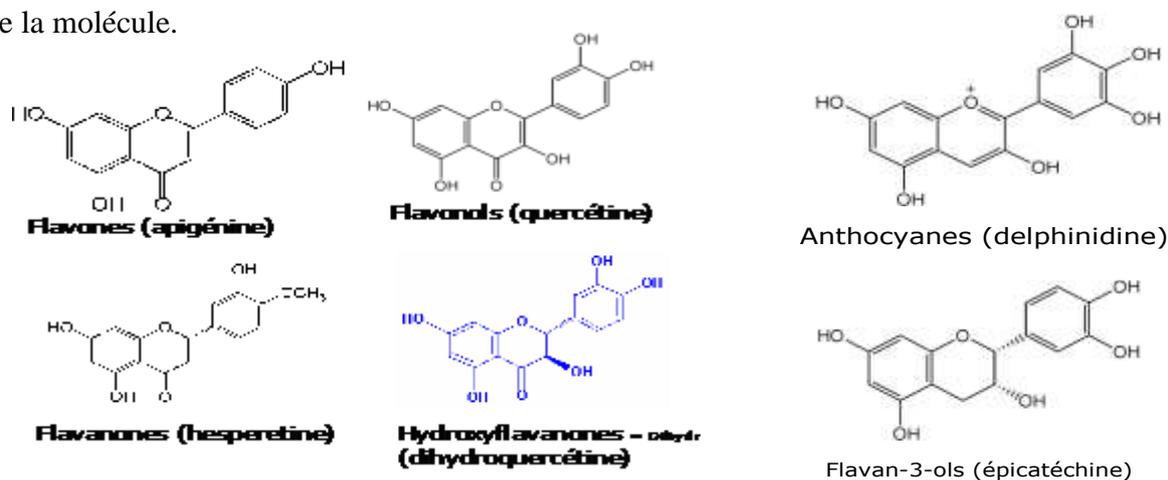


Fig. 11. Principales catégories de flavonoïdes.

Les flavones, flavonols et dérivés présentent une double liaison et sont des molécules planes, contrairement aux flavanes, flavanones et dérivés. Les flavonoides sont aussi définies par la présence de fonctions cétones, alcools et méthoxy.

#### I.2.5.1.2.5.1. Anthocyanes

Contrairement aux autres flavonoïdes qui absorbent en général essentiellement dans le spectre ultra violet, les anthocyanes sont des composés colorés (orange, pourpre à bleu). Ils sont largement impliqués dans la coloration des pétales mais on les retrouve également dans de nombreux tissus (exemple du chou rouge). Leur synthèse dans les organes foliaires est souvent activée par des stress (froid, carences, sénescence...). Ces composés sont beaucoup utilisés comme colorants alimentaires et présentent des propriétés anti-oxydantes.

### I.2.5.1.2.5.2. Isoflavones

Les isoflavones (Fig. 12) sont des composés particuliers retrouvés chez les légumineuses (exemple de la daidzéine du soja dont les propriétés phytoestrogènes sont particulièrement étudiées), pour lesquels le cycle B est relié au carbone 3 du cycle C. Certains dérivés d'isoflavones sont des bactériostatiques et sont spécifiquement induits lors d'infections par des organismes phytopathogènes. On retrouve en particulier de nombreuses phytoalexines des légumineuses (ex : phaseolline du haricot, glyceolline du soja).

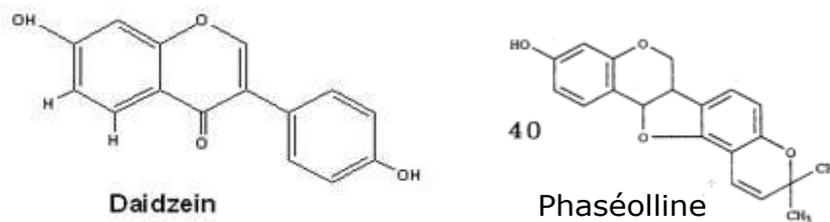


Fig. 12. Isoflavones

### I.2.5.1.2.5.3. Flavan-3-ols

Les flavan-3-ol sont des composés phagodétendants ayant la propriété de faire précipiter les protéines et impliqués dans la défense contre les pathogènes et phytophages. Ces propriétés font qu'on assimile parfois aux tanins ces molécules de faibles poids moléculaires.

### I.2.5.1.2.6. Tanins

Les tanins sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Brunet, 2008). Cette propriété de tannage provient de la possibilité de liaison qui existe entre les molécules de tanins et les fibres de collagène de la peau. Grâce aux méthodes d'analyse plus récentes, on peut aussi définir les tanins comme des polyphénols de masse moléculaires allant jusqu'à 20 000 Da (Haslam, 1989 ; Hagerman, 1992). Ce sont des molécules solubles dans l'alcool et dans l'acétone. Elles sont solubles dans l'eau en fonction de leurs poids moléculaires.

Les tanins sont inhibiteurs de certaines enzymes directement par inactivation de cette dernière ou indirectement par encombrement stérique (Zimmer et Cordesse, 1996). Plusieurs de ces molécules sont antioxydantes du fait de leurs fonctions phénoliques très nucléophiles. Elles piègent les radicaux libres et perturbent la réplication de l'ADN induisant des mutations cancéreuses. On leur reconnaît aussi des propriétés antiseptiques ainsi qu'un effet positif dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Bruneton, 1999). On distingue suivant leurs

structures biochimiques deux grands groupes de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Chung et *al.*, 1998 ; Jung et Ellis, 2001 ; Richelle et *al.*, 2001).

#### **I.2.5.1.2.6.1. Tanins non-hydrolysables : proanthocyanidines**

Il est possible d'oxyder les tanins dans certaines conditions, ce qui permet de libérer des monomères colorés d'anthocyanes. C'est ainsi que les tanins condensés sont aussi appelés proanthocyanidines (Fig. 13). Ces polymères de 2 à 7 résidus flavan-3-ols reliés par des liaisons C-C non-hydrolysables sont des composés phagodétendants capables de faire précipiter les protéines.

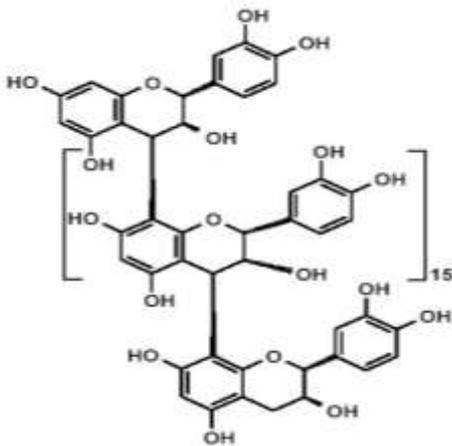


Fig. 13. Squelette moléculaire de proanthocyanidine.

L'astringence conférée dans le vin résulte de la précipitation des protéines de la salive par les tanins contenus dans ce vin. La précipitation par les tanins des enzymes secrétées par les champignons phytopathogènes nécrotrophes est une propriété qui peut contribuer à la résistance chez certaines plantes. La synthèse des tanins est dans certains cas induite par la perception de stress et médiée par des mécanismes de signalisation impliquant l'acide jasmonique ou l'éthylène.

#### **I.2.5.1.2.6.2. Tanins hydrolysables : gallotanins et ellagitanins**

Les tanins hydrolysables sont des oligo-esters ou des poly-esters d'un sucre, en général le glucose et de molécules d'acide-phénol (Mueller-Harvey, 2001). Il s'agit d'esters d'acide gallique ou d'acide élagique (dérivé du shikimate) et de glucose comme le pentagalloylglucose. On retrouve des gallotanins accumulés dans certaines galles de végétaux qui étaient utilisées pour la fabrication d'encre. Les tanins ellagiques ont quant à eux un acide hexahydroxyphénique obtenu suite à un couplage oxydatif entre les molécules d'acides galliques (Hagerman, 1992).

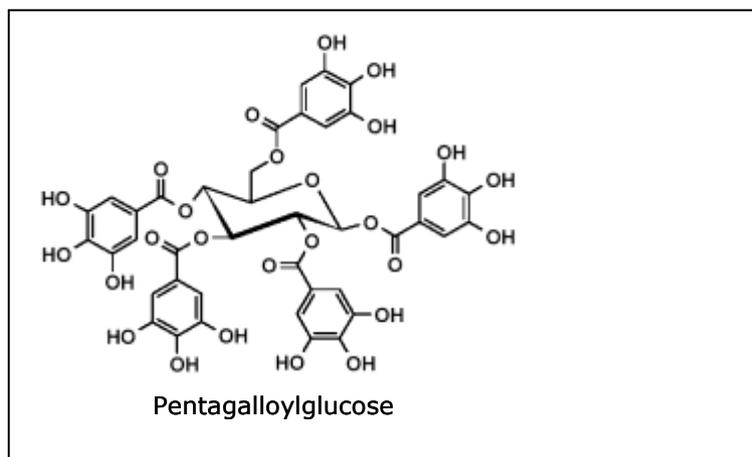


Fig. 14. Pentagalloylglucose.

#### I.2.5.1.2.7. Terpenoïdes ou isoprénoïdes

Les isoprénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpénoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes.

De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le caoutchouc. Cette voie de biosynthèse donne naissance à de très nombreux métabolites secondaires, mais participe également à la synthèse de composés comme le  $\beta$ -carotène, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire.

La classification des terpenoïdes repose sur le nombre d'unités terpéniques

C5 : hémiterpènes (une unité isoprène)

C10 : monoterpènes (deux unités isoprène)

C15 : sesquiterpènes (trois unités isoprène)

C20 : diterpènes (quatre unités isoprène)

C30 : triterpènes

C40 : tetraterpènes (caroténoïdes)

C45 et C50 : queues terpéniques des molécules d'ubiquinone et de plastoquinones

Au-delà : polyterpènes (caoutchouc...).

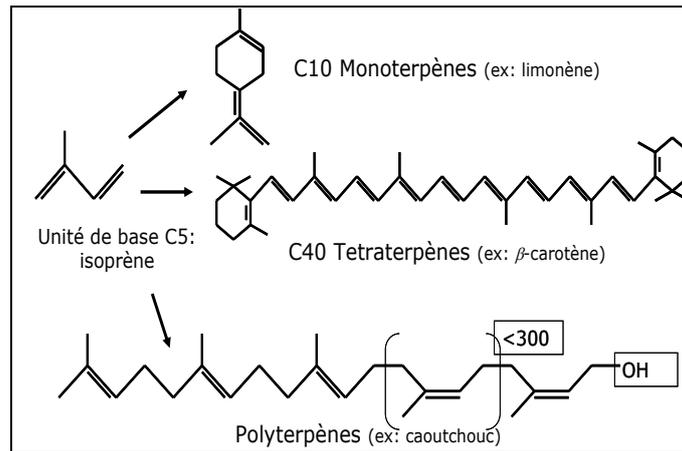


Fig. 15. Exemple de polyterpènes: le caoutchouc.

Certains composés importants sont des produits du catabolisme des terpènes, par exemple certains arômes de la tomate et l'acide abscissique (une hormone en C15 de réponse au stress hydrique, très importante chez les plantes) sont des produits du catabolisme de caroténoïdes (C40).

#### I.2.5.1.2.7.1. Monoterpènes

Les monoterpènes sont des composés à 10 carbones (Fig. 16), souvent volatils, aromatiques (sens olfactif) et biologiquement actifs (bactériostatiques, signalisation plantes-insectes). Ils sont largement présents dans les résines et les huiles essentielles (exemples du pinène constituant majeur de l'essence de térébenthine et du menthol).

On distingue les monoterpènes linéaires, des monoterpènes monocycliques et bicycliques.

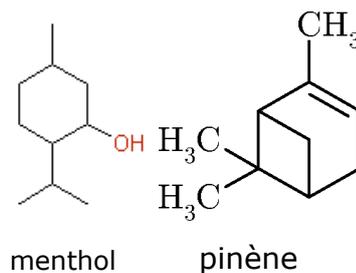


Fig. 16. Exemples de monoterpènes : menthol et pinène.

#### I.2.5.1.2.7.2. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont composés de 15 carbones assez universellement représentés chez les végétaux. Le farnésol (Fig. 17) est un exemple de sesquiterpène linéaire des nombreuses huiles essentielles, abondamment utilisé en parfumerie. On distingue également les sesquiterpènes monocycliques et polycycliques tel, le caryophyllène (Fig. 17), un sesquiterpène bicyclique en partie responsable du piquant du poivre.

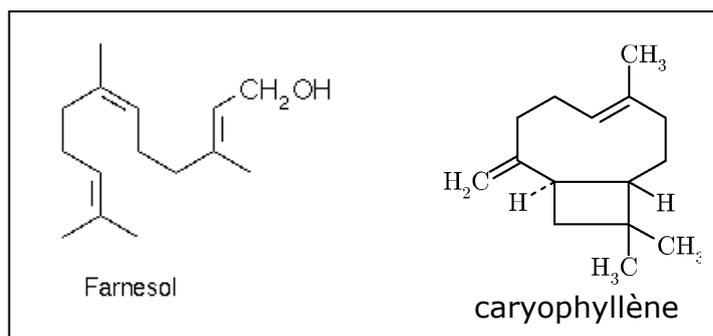


Fig. 17. Farnesol et caryophyllène, respectivement sesquiterpènes linéaire et cyclique.

#### I.2.5.1.2.7.3. Diterpènes

Les diterpènes sont des composés terpéniques à 20 carbones. On retrouve parmi les dérivés de diterpènes la queue phytol des chlorophylles a et b et les résidus terpéniques du tocophérol (vitamine E) et de la phylloquinone (vitamine K1).

#### I.2.5.1.2.7.4. Triterpénoïdes

Cette famille regroupe des composés dérivés d'une unité à 30 carbones, le squalène. On distingue en fonction du nombre de cycles les monoterpènes pentacycliques des monoterpènes stéroïdiens (tetracycliques). Bien que les composés stéroïdiens soient largement représentés dans le monde animal, de nombreux phytostérols sont spécifiques des végétaux. Les saponosides et les cardénolides sont des hétérosides formés à partir d'un triterpène qui constitue la génine (fraction aglycone) et de résidus glucidiques.

#### I.2.5.1.2.7.5. Tetraterpènes

Les tetraterpénoïdes sont une famille de terpènes (Fig. 18) à 40 carbones qui compte en particulier les caroténoïdes dont un pigment photosynthétique majeur (le beta-carotène) mais également des pigments aux propriétés anti-oxydantes comme le lycopène de la tomate.

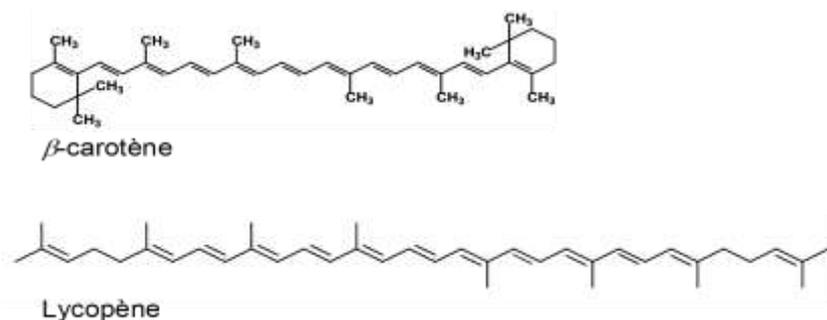


Fig. 18. Exemples de tetraterpénoïdes :  $\beta$ - carotène et lycopène.

Les sesquiterpènes peuvent constituer des traceurs chimiotaxonomiques comme c'est le cas chez les *Vernonia*. Un certain nombre de composés caractéristiques du genre ont été

isolé du *Vernonia* (Tableau II ; Fig. 19). Certains de ces composés présentent des propriétés antimicrobiennes.

Tableau II. Quelques composés bioactifs isolés du *Vernonia amygdalina*.

(Farombi et Owoeye, 2011).

Noms des composés	Classes des composés	Auteurs
Vernodaline	Sesquiterpène lactone	Kupchan et al. (1969)
Vernomygdaline	Sesquiterpène lactone	Kupchan et al. (1969)
Vernoniosides A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , B <sub>1</sub>	Steroïde glucosides	Jisaka et al. (1992)
Vernoniosides A <sub>4</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub>	Steroïdes glucosides	Jisaka et al. (1992)
Vernoniosides D et E	Steroïdes glycosides	Igile et al. (1995)
Vernodalol	Sesquiterpène lactone	Erasto et al. (2006)
Epivernodalol	Sesquiterpène lactone	Owoeye et al. (2010)

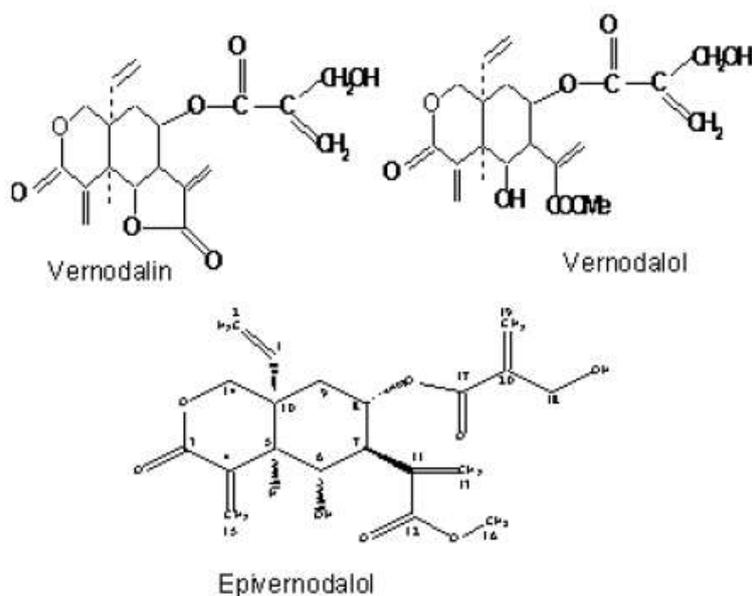


Fig. 19. Structures de quelques composés isolés chez *Vernonia amygdalina*.

(Farombi et Owoeye, 2011).

### I.2.5.2. Relations entre métabolisme primaire et métabolisme secondaire

Les jonctions entre métabolisme primaire et secondaire sont nombreuses et parfois complexes. Les principales sont synthétisées dans le schéma suivant qui indique également l'origine biosynthétique des principales phytohormones (Fig. 20). Les étapes enzymatiques les plus représentatives sont :

- la phénylalanine ammonia lyase (PAL) qui initie la synthèse de la plupart des composés phénoliques à partir d'un acide aminé
- la chalcone synthase qui initie la synthèse des flavonoïdes à partir du malonyl CoA et d'un élément phénylpropane
- la voie mévalonate indépendante de biosynthèse de l'isopentényl diphosphate (IPP), à l'origine de la synthèse de plus grande partie des terpénoïdes.

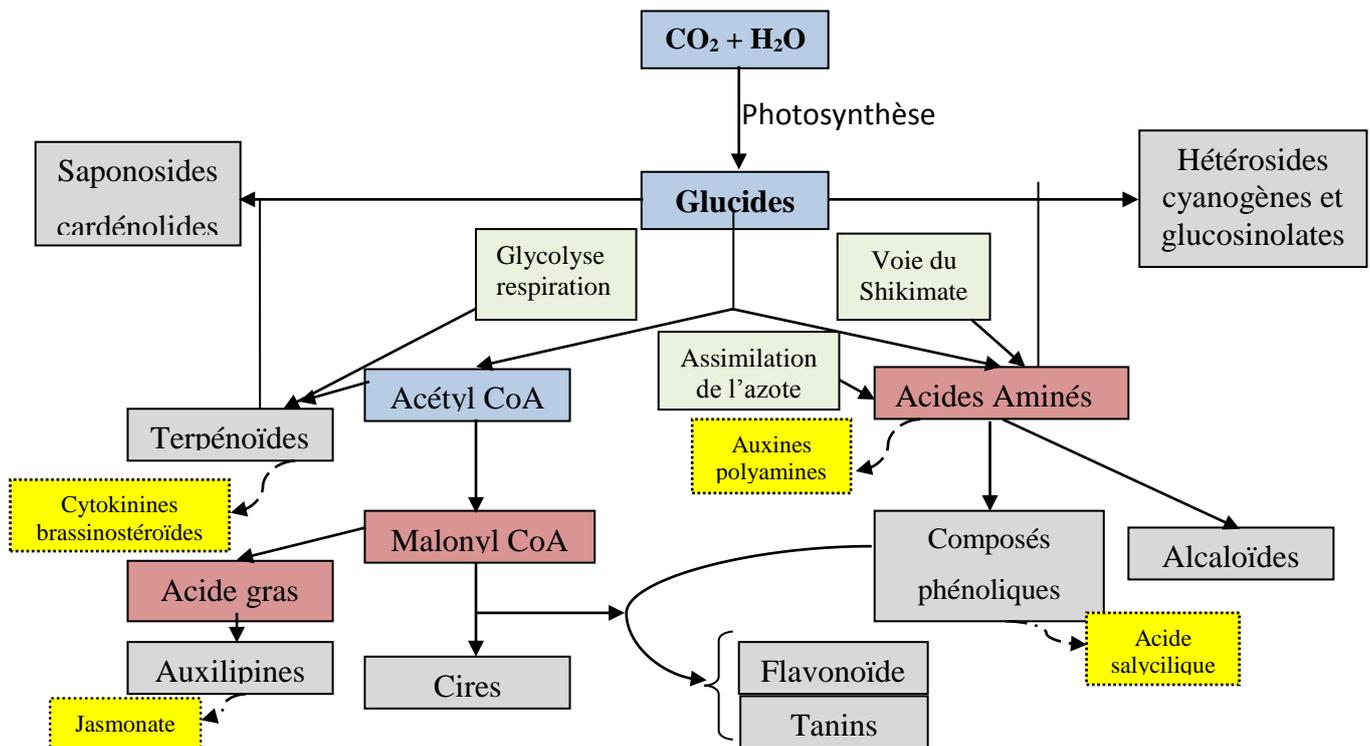


Fig. 20. Schéma synthétique de biosynthèse des grands groupes de métabolites secondaires.

### I.2.5.3. Activité antioxydante des métabolites secondaires

L'organisme génère en permanence des radicaux libres. Ils sont produits en plus grands nombres lorsque le corps est agressé. La cigarette, les infections et les situations de pollution peuvent constituer des situations d'agression du corps humain susceptibles de générer la production de radicaux libres. Ces derniers endommagent les cellules en les oxydant. On parle de stress oxydatif car, les radicaux libres possèdent un ou plusieurs électrons libres qui leur confèrent une grande réactivité. Les antioxydants sont des composés réducteurs capables de piéger ces radicaux libres et ainsi d'aider le corps à prévenir l'oxydation.

Le corps produit lui-même ses propres antioxydants. Cependant, ceux-ci ne suffisent pas souvent à neutraliser toute la quantité de radicaux libres. C'est ainsi que l'alimentation est

souvent source d'approvisionnement en antioxydants. De nombreux aliments comme les fruits et les légumes comportent de grandes quantités d'antioxydants.

#### I.2.5.4. Screening phytochimique

C'est un ensemble de tests qui permet de réaliser une analyse qualitative des constituants chimiques de la plante. Il existe plusieurs tests exploitant les propriétés chimiques des différents groupes de métabolites secondaires qui permettent d'identifier la présence spécifique d'un groupe de composés dans un extrait de plantes (Tableau III).

Tableau III. Synthèse des tests chimiques servant à identifier les familles de composés secondaires dans une solution (Halilu et *al.*, 2012).

Familles de composés	Tests	Réactifs	Revelations
Alcaloïdes	Meyer	Iodure mercurique de potassium	Précipité jaune
	Wagner	Iodine dans l'iodure de potassium	Précipité brun
	Dragendoff	Iodure bismuth de potassium	Précipité pourpre
Hydrate de carbone	Molish	$\alpha$ - naphthol diluée	Coloration violette
	Fehling	- Acide chloridrique dilué - Neutraliser avec une base - Liqueur de Fehling	Précipité rouge brique
Triterpènes	Salkowski	Gouttes d'acide sulfurique	Coloration jaune
Phytostérol	Libermann Buchard	- Gouttes d'anhydride acétique - Goutte d'acide sulfurique	Coloration brune
Glycosides cardiaques	Keller-kiliani	- 1ml de solution de subacétate - Chloroforme - Chlorure ferrique - Acide acétique - Acide sulfurique	- Coloration brune à l'interphase - Coloration verte du surnageant
Saponines	« Frothing test »	Eau distillée	Alvéoles de mousses
Flavonoïdes	Shinoda	Acide chloridrique concentré+ feuillets de magnésium	Succéssivement couleurs : orange, rouge, violette.
	Hydroxyde de sodium	Quelques gouttes d'hydroxyde de sodium en solution	Jaune intense qui change avec l'ajout d'acide dilué.
Tanins	Subacétate	Gouttes de la solution de subacétate	Précipité coloré de tanins
	Eau de brome	Gouttes d'eau de brome	Pas de précipité, présence de tanins hydrolysables
Composés phénoliques	Chlorure ferrique	Gouttes de chlorure ferrique	Couleur bleu sombre
Anthraquinone	Borntrager	Après extraction à l'ether de pétrole, ajout de d'une solution d'ammonique a 25% et agitation.	Couleur rouge de la solution alcaline

### **I.2.5.5. Méthodes modernes de chimiotaxonomie : la Chromatographie Haute Performance (HPLC)**

La chimiotaxonomie est l'étude des rapports entre le classement des substances chimiques et la composition des substances vivantes. Elle a pour objectif d'établir le rapport entre la composition chimique des espèces vivantes et leur classification systématique. Elle se propose d'aider les botanistes dans l'étude systématique et phylogénique du règne végétal. Les individus d'une même espèce qui diffèrent par l'absence ou la présence d'une ou de plusieurs substances chimiques sont des chémotypes ou des chimiotypes. C'est ainsi que la composition qualitative en métabolites secondaires tels les flavonoïdes est une constante de l'espèce tandis que sa composition quantitative relative est un caractère variétal (Lebreton et Méneret, 1964). Le développement des techniques chromatographiques a contribué au développement de la chimiotaxonomie.

La chromatographie est un procédé de séparation des constituants d'un mélange. Cette technique est qualitative et quantitative pour les composés d'une phase liquide ou gazeuse homogène. Le principe repose sur les équilibres de concentration des composés présents entre deux phases non miscibles dont l'une dite stationnaire est emprisonnée dans une colonne, ou fixée sur un support, et l'autre dite mobile qui se déplace au contact de la première. L'entraînement, à des vitesses différentes, des composés présents par la phase mobile conduit à leur séparation.

La chromatographie sur couche mince (CCM), appelé aussi chromatographie planaire, repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. La réussite d'une bonne séparation chromatographique dépend dans une large mesure du choix de la phase stationnaire. En général, les phases polaires (polyéthylène glycols, ...) retiennent plus les composés polaires, les colonnes apolaires (polysiloxanes, ...) retiennent plus les composés du même nom.

En HPLC, la phase mobile est un liquide. Elle sera donc préférée à la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) dans le cas de composés thermosensibles ou de masses moléculaires très grandes et/ou polaires. De plus, la possibilité d'agir sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant (donc l'interaction soluté/phase mobile/phase stationnaire) rend la HPLC très utile.

Une chaîne HPLC est composée principalement d'un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile, la pompe : elle est munie d'un système de gradients permettant

d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse ;
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant.

La vanne d'injection est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utilisons généralement au laboratoire une boucle de 20 $\mu$ l. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées. Les principales phases stationnaires utilisées sont : la phase dite « normale », constituée de gel de silice et la phase inverse, majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Le gel de silice est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant peu polaire (apolaire). Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. La phase inverse est très peu polaire (apolaire) et nécessite donc un éluant polaire. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

Les principaux détecteurs utilisés sur la plateforme sont les suivants: le détecteur U.V. et le détecteur électrochimique. Le détecteur UV-visible (classique ou à barrette de diodes) mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. On opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. La lampe Deutérium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption  $\lambda$  soit suffisamment grand. Il faut en plus que la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

Le détecteur à barrette de diodes permet d'obtenir un domaine de longueurs d'ondes simultanément. Il fournit en plus du chromatogramme des renseignements spectraux à fin d'assurer l'identité des composés séparés. Ce détecteur est composé d'une rangée de diodes, chacune indiquent l'absorbance moyenne sur un intervalle très étroit de longueur d'onde.

Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une station d'acquisition.

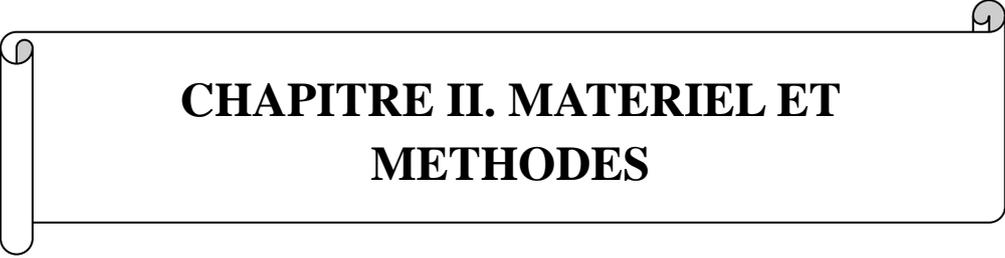
### **I.2.6. Variabilité génétique de *Vernonia***

Le genre *Vernonia* est très diversifié (Biholong, 1986). Cette affirmation est faite sur la base des études de systématique végétale à l'échelle infra générique. A l'échelle de l'espèce, un certains nombres d'analyses restent à faire de sorte que l'on puisse révéler la véritable richesse intra spécifique des *Vernonia*. De façon empirique, les populations locales du Cameroun connaissent des variétés de *Vernonia amygdalina* amères et des variétés non amères. D'autres populations distinguent les variétés à larges feuilles et des variétés à petites feuilles.

La description de la variabilité génétique a longtemps reposé sur l'analyse des caractères morphologiques, physiologiques et agronomiques. Cette démarche est de plus en plus complétée par de nouvelles approches (Charrier et *al.*, 1994) dont :

- L'une conceptuelle à savoir l'étude des rapports entre les espèces cultivées et les formes spontanées apparentées qui a conduit aux concepts de pools génétiques et de complexes d'espèces;
- L'autre est la nature technologique basée sur l'étude du polymorphisme moléculaire au niveau des protéines, de l'ADN ou de divers marqueurs moléculaires.

Les études portant sur les *Vernonia* comestibles dont *V. amygdalina*, *V. calvoana* et *V. colorata* se sont orientées vers l'analyse des constituants biochimiques de la plante compte tenu de son utilisation binaire : alimentaire et médicinale. Les caryotypes de *V. amygdalina* et de *V. calvoana* sont tout de même connus. Ils sont respectivement de  $2n=40$  et de  $2n=20$  (Grubben et Denton, 2004).



**CHAPITRE II. MATERIEL ET  
METHODES**

## II.1. MATERIEL

### II.1.1. Sites d'étude

L'étude sur le mode de dispersion des pollens a été réalisée à Mfou dans la Région du Centre Cameroun. Mfou, chef lieu du département de la Mefou-et-Afamba est située à 4°27'00'' de latitude Nord et 11°38'00'' de longitude Est. La zone de Mfou est caractérisée par un climat de type équatorial guinéen avec quatre saisons : une grande saison de pluie de mi-août à mi-novembre, une grande saison sèche de mi-novembre à mi-mars, une courte saison de pluie de mi-mars à mi-juin et une courte saison sèche de mi-juin à mi-août. La température journalière moyenne varie de 23 à 24 °C avec une pluviométrie annuelle de 1 600 -1 800 mm. Le sol du site est ferrallitique, acide et fortement désaturé de faciès ocre, présentant un horizon concrétionné qui peut affleurer au sommet des collines. Le site était une jachère de deux ans d'âge dominée par *Chromolaena odorata* (L.).

La caractérisation agromorphologique s'est faite en pépinière à l'Université de Yaoundé I. Le climat qui y règne est proche de celui de Mfou. L'analyse des caractères morphologiques et physiologiques des pollens s'est déroulée à l'Unité de Physiologie et Amélioration des Plantes du Laboratoire de Biotechnologies et Environnement de l'Université de Yaoundé I.

Le screening phytochimique a été effectué au Laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I. Les dosages des grands groupes métaboliques et le test antimicrobiens ont été réalisés à l'Unité des agents antimicrobiens et de bio-contrôle du Laboratoire de phyto biochimie et d'étude des plantes médicinales de l'Université de Yaoundé I. La HPLC (High Potential Liquid Chromatography) a été effectuée au Laboratoire de Biotechnologies pharmaceutiques de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Médecine et Pharmacie Iuliu Hatieganu de Roumanie.

La collecte des accessions de *Vernonia* s'est faite dans quatre localités (Alou, Fongo Tongo et Dschang) de la région de l'Ouest du Cameroun (Fig. 21). Le climat est de type "camerounien d'altitude", marqué par deux saisons d'inégales longueurs: une saison sèche, qui va de la mi-novembre à la mi-mars, et une saison des pluies qui dure de la mi-mars à la mi-novembre. Les températures moyennes sont basses (19 °C), et les pluies abondantes (1 500 -2 000 mm) tombent suivant une configuration monomodale.

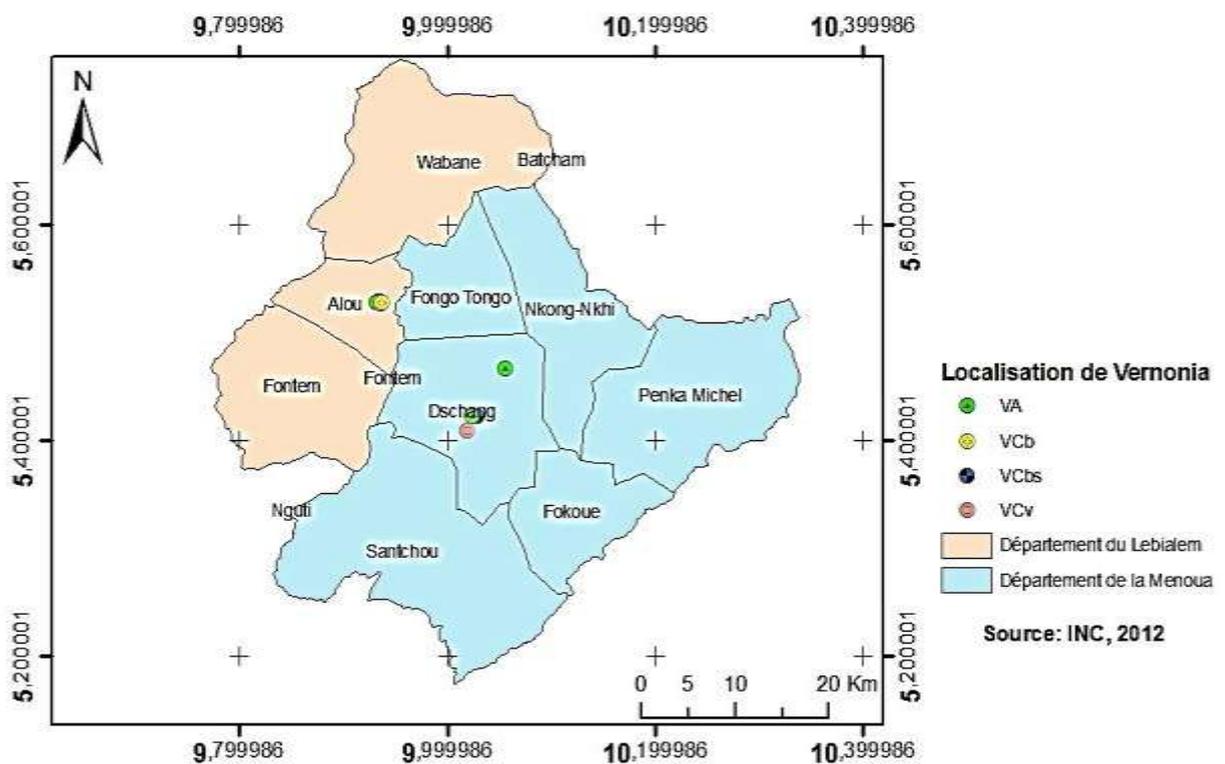


Fig. 21. Sites de récolte des accessions de *Vernonia*.

### II.1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de six accessions (Tableau IV) des espèces suivantes :

- *Vernonia amygdalina* ;
- *V. calvoana*.

On a distingué au sein de *V. calvoana* deux variétés dont : *Vernonia calvoana* (Hook. f.) Hook. f. var. *calvoana* à gros capitules et à grandes feuilles et *Vernonia calvoana* var. *microcephala* C.D. Adams à petits capitules et à petites feuilles.

La couleur des fleurs a permis de distinguer deux sous-variétés au sein de la variété *Vernonia calvoana* (Hook. f.) Hook. f. var. *calvoana* (Fig. 22):

- *Vernonia calvoana* (Hook. f.) Hook. f. var. *calvoana* à gros capitules et à grandes feuilles. Les fleurs sont violacées au centre du capitule, circonscrites par des fleurs blanches marginales ;
- *Vernonia calvoana* (Hook. f.) Hook. f. var. *calvoana* à fleurs blanches.

Tableau IV. Récapitulatif des caractéristiques du matériel végétal utilisé.

VA= *Vernonia amygdalina*, VC= *Vernonia calvoana*.

Espèces	Variétés	Accessions	Caractéristiques
<i>Vernonia amygdalina</i>	<i>V. amygdalina</i>	VAA	Amer
		VALF	Larges Feuilles
<i>Vernonia calvoana</i>	<i>V. calvoana</i> var. <i>calvoana</i>	VCAV	Feuilles Amères, à fleurons violacés
		VCAB	Feuilles Amères, à fleurons Blancs
	<i>V. calvoana</i> var. <i>microcephala</i>	VCSB	Feuilles Sucrées, à fleurons Blancs
		VCSV	Feuilles Sucrées, à fleurons violacés



Fig. 22. Ports végétatifs et inflorescences *Vernonia amygdalina* et *V. calvoana*.

A: plant de *Vernonia amygdalina*, B: rameau fleuri de *V. amygdalina*, C: plant de *V. calvoana*, D: capitule de *V. calvoana*.

### II.1.3. Matériel microbien

Les trois bactéries utilisées pour les tests antimicrobiens sont :

- *Salmonella enterica* ATCC NR4311 ;
- *Klebsiella pneumonia* ATCC NR41916 et

- *Staphylococcus aureus* ATCC NR50003.

Les trois levures utilisées pour les tests antimicrobiens sont :

- *Candida albicans* NR-29450 (CA) ;
- *C. krusei* ATCC 6258 (CK) et
- *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CP).

Ces souches ont été choisies sur la base des résultats d'enquêtes et des résultats d'études ethnobotaniques réalisées sur les *Vernonia*. Ces résultats montrent que les populations utilisent les *Vernonia* pour le traitement des infections du tube digestif.

#### **II.1.4. Matériel de laboratoire et de terrain**

Un matériel varié a été utilisé pour les expérimentations. Il est regroupé en deux groupes : le matériel de terrain et le matériel de laboratoire.

##### **II.1.4.1. Matériel de terrain**

Le matériel de terrain utilisé est constitué de:

- un GPS (Global Positioning System) de marque GARMIN 60CSx utilisé pour la prise des coordonnées géographiques des sites expérimentaux ;
- un pied à coulisse (1/128 IN) a servi à mesurer le diamètre au collet des courges ;
- une machette, un daba, une pioche, les pointes, les ficelles, les lattes ont servi à défricher et à construire l'abri pour la pépinière ;
- les moustiquaires, les piquets, les pointes, les tôles en plastique, le marteau etc. ont été utilisés pour la construction des dispositifs de l'étude sur le mode de dispersion des pollens.

##### **II.1.3.2. Matériel de laboratoire**

Le matériel de laboratoire utilisé est constitué de :

- une étuve (SELECTA) utilisée pour sécher les échantillons d'herbier;
- un microscope optique (OLYMPUS) utilisé pour les observations des pollens ;
- une balance sensible (SARTORIUS) a permis de peser les produits chimiques ;
- un distillateur d'eau (BÜCHI K350) ;
- une centrifugeuse (JOUAN) a permis de réaliser l'acétolyse des pollens ;
- les milieux Muller Hinton Agar et Muller Hinton Broth pour les tests sur les bactéries ;
- les milieux Sabouraud Dextrose Agar et Sabouraud Dextrose Broth pour les tests sur les levures.

Un système HPLC Agilent 1100 Series (Agilent, USA) équipé d'un dégazeur, d'une pompe à gradient binaire, d'un thermostat de la colonne, d'un passeur d'échantillon automatique et d'un détecteur UV, est utilisé pour les analyses chimiotaxonomiques. Ce système est couplé avec un spectromètre de masse Agilent 1100 (LC/MSD Ion Trap VL). Une colonne analytique en phase inverse (Zorbax SB-C18 100 x 3,0 mm de diamètre intérieur, 3,5 µm particules) est utilisée pour la séparation des molécules. La détection des composés a été effectuée à la fois sur le mode UV et MS. Le système comprend un détecteur UV. Le système MS fonctionne à l'aide d'une source d'ions par électropulvérisation en mode négatif.

## **II.2. METHODES**

### **II.2.1. Etude de la distribution des *Vernonia***

L'étude s'est intéressée à l'ensemble des *Vernonia* qu'il a été possible de recenser au Cameroun. La méthode par triangulation est utilisée pour la collecte des données. Elle a consisté en la consultation des échantillons d'herbier de L'Herbier National du Cameroun (HCN) dans un premier temps. En second lieu, des sorties de terrains sont effectuées pour relever les coordonnées des points où les *Vernonia* sont présents. Ces données collectées sont complétées par les données de la littérature. Au total, 438 relevés GPS ont servi à l'élaboration des cartes de distribution des *Vernonia* du Cameroun. Dans le cadre des sorties de terrain un GPS est utilisé. Lorsque seul le nom du lieu est mentionné sur l'échantillon à défaut de ses coordonnées géographiques, les informations précises sur la localité sans coordonnées GPS sont obtenues grâce au GEOnet Names Server 2004 « Gazetteers » qui permet de retrouver distinctement les emplacements des différentes espèces sauf en cas de forte proximité de lieux de récolte. Le logiciel QGIS a servi à l'élaboration des cartes de distribution. Une attention particulière a été portée sur les espèces exploitées ou cultivées pour leurs qualités nutritionnelles ou pour leurs vertues médicinales.

### **II.2.2. Analyse de la richesse intraspécifique de *Vernonia* spp. Sur la base des paramètres palynologiques, organoleptiques et agro-morphologiques**

Il s'agit au cours de cette expérimentation de mettre en évidence la diversité génétique de *Vernonia* spp., à travers l'analyse de quelques caractères morphologiques et physiologiques de la plante.

#### **II.2.2.1. Evaluation des critères de reconnaissance des cultivars et méthode de régénération utilisées par les paysans**

Au cours de cette étude, les méthodes de régénération et les critères de choix des morphotypes consommés sont collectées auprès des producteurs enquêtés. Il est question

d'identifier les critères de reconnaissance utilisés par les populations afin de servir de point de départ à la caractérisation agro-morphologique de la vernonie. La détermination de la méthode de régénération couramment utilisée permet de prévoir et d'expliquer la diversité génétique d'une espèce car la multiplication sexuée et allogame favorise les brassages génétiques alors que la multiplication végétative et l'autogamie garde les mutations figées.

L'enquête est réalisée grâce à un questionnaire adressé aux populations rencontrées sur le terrain. L'exploitation des échantillons d'herbier de l'Herbier National du Cameroun a servi de point de départ à la détermination du site de collecte des accessions. En effet, le site de collecte est circonscrit autour des zones de collecte du plus grand nombre d'échantillons d'herbier concernant les espèces comestibles uniquement. La méthode d'obtention des données et de collecte des morphotypes a consisté en des entretiens directs avec les paysans et les commerçants aléatoirement choisis dans les circonscriptions : Alou, Fongo Tongo et Dschang de la région de l'Ouest du Cameroun. La taille de l'échantillonnage était de 146 enquêtés.

#### **II.2.2.2. Détermination des caractéristiques organoleptiques de *Vernonia* spp.**

Les données sur les caractéristiques organoleptiques des feuilles fraîches sont réalisées avant l'apparition des premiers bourgeons floraux. Un échantillon de 30 dégustateurs âgés de 25 à 30 ans a servi en laboratoire à la détermination des caractéristiques organoleptiques des feuilles crues de *Vernonia* spp.. Chaque dégustateur est isolé des autres pour éviter toute influence de son avis par la voie de l'autre ou toute autre forme de communication. Les codes sont attribués aux échantillons à déguster et le dégustateur doit porter sur une fiche (Annexe 3), le goût et la couleur de la feuille qui lui est présentée. Il lui est proposé sur la fiche de déterminer si la dite feuille est très amère, amère, pas amère, sucrée ou autres. Les couleurs proposées sont : vert sombre, vert claire, autres. Entre deux dégustations plusieurs rincages de la bouche à l'eau potable sont prévus. Cinq minutes séparent deux dégustations.

#### **II.2.2.3. Détermination des caractères agro-morphologiques de *Vernonia* spp.**

Les boutures des accessions récoltées sur le terrain ont servi de semences pour la régénération des nouveaux plants en pépinière. La pépinière a été réalisée sur le site d'expérimentation de l'Université de Yaoundé I suivant un dispositif en randomisation total (Fig. 23). Les paramètres agromorphologiques ont été collectés directement en pépinière. Trois plants choisis au hasard parmi les dix répétitions par morphotypes ont servi à la prise

des paramètres morphologiques. La caractérisation agro-morphologique a porté sur les paramètres tels que : les dimensions, le nombre et la couleur des feuilles ; la couleur des fleurs ; la hauteur des tiges ; le pourcentage de germination et le temps de germination des graines ; le pourcentage de debourrement des tiges ; les dimensions du pollen ; la durée du cycle de vie et le nombre de fleurs par capitule des différents morphotypes.

VALF <sub>1</sub>	VCAV <sub>6</sub>	VCAB <sub>2</sub>	VAA <sub>3</sub>	VCAB <sub>5</sub>	VCAV <sub>3</sub>	VCSB <sub>5</sub>	VCAB <sub>8</sub>	VCSB <sub>10</sub>	VAA <sub>8</sub>
VCSB <sub>1</sub>	VAA <sub>2</sub>	VCSV <sub>2</sub>	VCAV <sub>5</sub>	VCSV <sub>9</sub>	VALF <sub>6</sub>	VCSV <sub>4</sub>	VCSV <sub>8</sub>	VAA <sub>7</sub>	VALF <sub>10</sub>
VCAV <sub>7</sub>	VALF <sub>2</sub>	VCAV <sub>1</sub>	VCSV <sub>5</sub>	VCAV <sub>10</sub>	VCAB <sub>7</sub>	VCSV <sub>6</sub>	VCAV <sub>2</sub>	VCSB <sub>7</sub>	VCAB <sub>10</sub>
VCAB <sub>1</sub>	VCSV <sub>1</sub>	VCAV <sub>4</sub>	VCSB <sub>3</sub>	VALF <sub>5</sub>	VAA <sub>4</sub>	VALF <sub>7</sub>	VAA <sub>6</sub>	VALF <sub>9</sub>	VAA <sub>9</sub>
VCAV <sub>9</sub>	VCSB <sub>2</sub>	VALF <sub>3</sub>	VCAV <sub>8</sub>	VCSV <sub>10</sub>	VCAV <sub>4</sub>	VCSB <sub>8</sub>	VCSB <sub>6</sub>	VCSV <sub>3</sub>	VCAV <sub>1</sub>
VAA <sub>1</sub>	VCAB <sub>3</sub>	VCSB <sub>9</sub>	VALF <sub>4</sub>	VCAB <sub>6</sub>	VCSV <sub>7</sub>	VAA <sub>5</sub>	VALF <sub>8</sub>	VCAB <sub>9</sub>	VAA <sub>10</sub>

Fig. 23. Dispositif de randomisation total mis sur pied en pépinière.

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

### II.2.2.3.1. Analyses morphologiques et physiologiques des grains de pollen

Les variations observées au niveau des pollens des Astéraceae sont numériques et perceptibles (Dematteis et Salgado, 2001) constituant ainsi un critère taxonomique de choix.

#### II.2.2.3.1.1. Analyse morphologique des pollens

##### II.2.2.3.1.1.1. Récolte du pollen

Les capitules matures de *Vernonia* sont récoltés dans la pépinière et transportés au laboratoire. Les anthères de chacune des variétés sont ensuite isolées des fleurs à l'aide d'une pince et d'un scalpel. Des soins sont pris pour éviter les mélanges des pollens de deux taxons pendant la récolte. Les pollens ainsi récoltés sont mis dans quatre tubes à centrifuger en attendant la préparation du mélange acétolysant.

##### II.2.2.3.1.1.2. Acétolyse des pollens d'après la méthode d'Erdtman (1952)

L'acétolyse permet d'observer plus clairement la structure de l'exine du pollen. Il s'agit d'une fossilisation par voie chimique du pollen suivant le protocole ci-après :

- préparer sous une hôte le mélange acétolysant en ajoutant à 9 volumes d'anhydride acétique pure, 1 volume d'acide sulfurique concentré dans une éprouvette, agiter doucement avec un agitateur, remplir les quatre tubes à centrifuger contenant les pollens à analyser ;

- mettre après agitation les tubes dans un panier, puis dans un bain-marie froid le panier ;
- chauffer le bain-marie tout en agitant périodiquement les tubes pour mettre en suspension les pollens ;
- attendre que l'eau du bain-marie arrive à ébullition puis compter 1 mn pendant laquelle on ne cesse d'agiter ;
- au bout de la minute, retirer les tubes du bain-marie, les laisser refroidir quelques instants ;
- ajouter dans chaque tube un peu d'acide acétique pour refroidir le liquide ;
- centrifuger 10 mn à 1 800 tr/mn ;
- au bout de 10 mn, arrêter la centrifugeuse, retirer les tubes, éliminer le surnageant et le remplacer par l'acide acétique ;
- remettre les pollens en suspension, laisser reposer quelques minutes puis centrifuger à nouveau comme précédemment ;
- éliminer le surnageant, le remplacer par l'eau distillée, centrifuger à nouveau ;
- éliminer le surnageant, le remplacer par l'eau glyciné à moitié, laisser reposer au minimum 30 mn, centrifuger ;
- éliminer le surnageant, retourner les tubes et les laisser éssorer au moins 30 mn
- monter entre lames et lamelles.

Les lames contenant chacune les pollens acétolysés des quatre taxons de *Vernonia* sont montées au microscope photonique de marque Olympus. Les observations se font aux grossissements 40 et 100x. Les ornements de l'exine sont décrites. La taille des pollens est mesurée sur un échantillon de 50 pollens par variété à l'aide d'un objectif à micromètre fixé sur le microscope. Les clichés des différents types de pollens sont réalisés et les lames sont scellées et conservées au laboratoire de Biotechnologie et Environnement de l'Université de Yaoundé I.

#### **II.2.2.3.1.2. Etude de la germination des pollens**

La capacité d'un pollen à germer est un caractère physiologique qui dépend des facteurs génétiques entre autres (Visser, 1955). L'étude de la germination constitue dans la présente étude un critère de différenciation taxonomique.

##### **II.2.2.3.1.2.1. Obtention des grains de pollen**

Les capitules sont récoltés dès 6 heures en pépinière. Ils sont ramenés dans des enveloppes en papier et par variété pour éviter les mélanges. Ces capitules sont disséqués au

laboratoire. On isole ainsi les fleurs desquels on isolera les anthères. L'extraction des anthères de *Vernonia* est une opération extrêmement fine qui requiert pinces et scalpel. Une fois les anthères isolées, on les ouvre délicatement pour en retirer la poudre blanche de pollen d'aspect gélinifé. La poudre gélinifée est déposée dans des piluliers en attendant d'être ensemencée. La durée de l'extraction doit être brève car le pollen perd très vite sa viabilité.

#### **II.2.2.3.1.2.2. Préparation des milieux de culture**

Deux principaux types de milieux de germination de pollens ont été testés (Youmbi, 1993) : le milieu liquide et le milieu solide auquel on a ajouté l'agar. Les deux milieux utilisent comme solution de base, la solution de Brewbaker et Kwack (BK) et la solution d'Heslop-Harrison (HH). Le milieu BK comprend pour 100 ml d'eau distillée : 0,05 g d'acide borique ; 0,03 g de nitrate de calcium ; 0,01 g de nitrate de potassium ; 0,02 g de sulfate de magnésium. Le milieu HH comprend pour 100 ml d'eau distillée : 0,06 g d'acide borique et 0,4 g de nitrate de calcium.

A l'aide d'une pipette graduée, 12,5 ml de la solution de base sont prélevés et mis dans un bécher de 200 ml. Le bécher est ensuite placé sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition. S'il s'agit de la préparation du milieu liquide, la solution est laissée à température de laboratoire pour refroidissement, avant d'être transvasée dans des boîtes de ciracuse faites pour la germination des pollens. S'il s'agit du milieu solide, 0,125 g d'agar est ajouté au milieu de base constamment agité sur la plaque chauffante. Après dissolution totale de l'agar, du saccharose en quantité bien déterminée est ajouté à la préparation. Le mélange est agité fréquemment jusqu'à dissolution totale du sucre. La préparation est alors sortie du bain-marie et déposée 1 à 2 mn sur la pailasse avant d'être coulée sur trois lames préalablement étiquetées. Une fois le milieu solidifié, il est prêt à être ensemencé.

#### **II.2.2.3.1.2.3. Test de viabilité des pollens**

Les pollens sont mis à germer en milieu solide et en milieu liquide. A l'aide d'une pince fine, les pollens préalablement mis en pilulier sont prélevés et étalés sur le milieu de culture. Ceux des pollens cultivés en milieu liquide sont ensemencés dans des boîtes de ciracuse contenant les milieux de culture non gélinifiés. Ces lames ou ces boîtes sont ensuite classées dans des boîtes de Pétri et couvertes d'un papier filtre humidifié. Le tout est porté à l'étuve pendant 24 heures. Au terme de l'incubation, chaque préparation, sortie de l'étuve est immédiatement soumise au test d'Alexander. Une goutte du colorant d'Alexander déposée sur chaque lame puis recouverte par la lamelle facilite l'observation et le comptage des pollens au microscope. On considère comme Visser (1955) qu'un grain de pollen a germé lorsqu'après la

sortie du tube pollinique par les apertures, celui-ci s'est allongé et atteint au moins la moitié du diamètre du pollen. Le pourcentage de germination est déterminé sur la base d'un ensemble d'au moins 500 pollens.

#### **II.2.2.3.1.2.4. Détermination du meilleur milieu de germination des pollens**

##### **II.2.2.3.1.2.4.1. Evaluation de l'effet des solutions de base et de la teneur en sucre sur la germination des pollens**

L'influence des solutions de base HH et BK sur la germination des pollens des 4 taxons de *Vernonia* spp. et l'effet de la teneur en saccharose ont été étudiés. Pour cela, nous incubons à 20 °C pour chaque milieu de base et pour des concentrations variables de 0 à 50 % en saccharose, les pollens des 4 variétés à étudier. Trois répétitions sont effectuées par traitement. Un traitement correspond à l'effet d'une teneur en sucre bien déterminée dans l'une des deux solutions de base. On fait varier les concentrations en sucre de 5 % d'un traitement à un autre, de 0 à 50 %. On ensemence pour chaque variété 33 lames.

##### **II.2.2.3.1.2.4.2. Evaluation de l'effet de la température sur la germination des pollens**

La meilleure solution de base ainsi que la meilleure concentration en saccharose sont retenues pour chaque taxon à la suite de l'étude de l'effet des solutions de base et de la teneur en sucre sur la germination des pollens. On teste alors sur ces meilleurs milieux l'effet de la température d'incubation sur la germination des pollens. On fait varier les températures d'incubation de 10 °C à 50 °C.

##### **II.2.2.3.1.2.4.3. Evaluation de l'effet du pH sur la germination des pollens**

On maintient les meilleures conditions de culture obtenues à l'issue des manipulations précédentes. A partir de ce milieu on fait varier le pH de 0,3 unités, de trois valeurs en plus et de trois valeurs en moins.

##### **II.2.2.3.1.2.4.4. Effet de la teneur en acide borique sur la germination des pollens**

Des meilleures conditions de culture obtenues par variété après l'évaluation de l'influence de la température d'incubation, on fait varier la teneur en acide borique par unités de 0,1 g/l autour de la valeur du témoin.

##### **II.2.2.3.1.2.4.5. Durée de vie et conservation des pollens**

Une première expérience a permis de déterminer le stade de développement approprié pour la récolte des pollens. On évalue le taux de germination des pollens à deux stades de développement de la fleur. Au stade le plus jeune (Stade I), les pétales ne sont pas encore ouverts : ce sont les fleurs situées au centre du capitule. Au second stade (Stade II), les pétales

sont ouverts et le stigmate fait sailli au milieu de l'anthère synanthérée. La durée de vie des pollens est évaluée sur des pollens conservés suivant trois conditions différentes : en condition de laboratoire, au réfrigérateur, et au congélateur. Pour chacune des conditions, on teste toutes les trois heures la viabilité du pollen.

Le résumé de la méthodologie de l'étude sur la morphologie du pollen est synthétisé dans la figure 24.

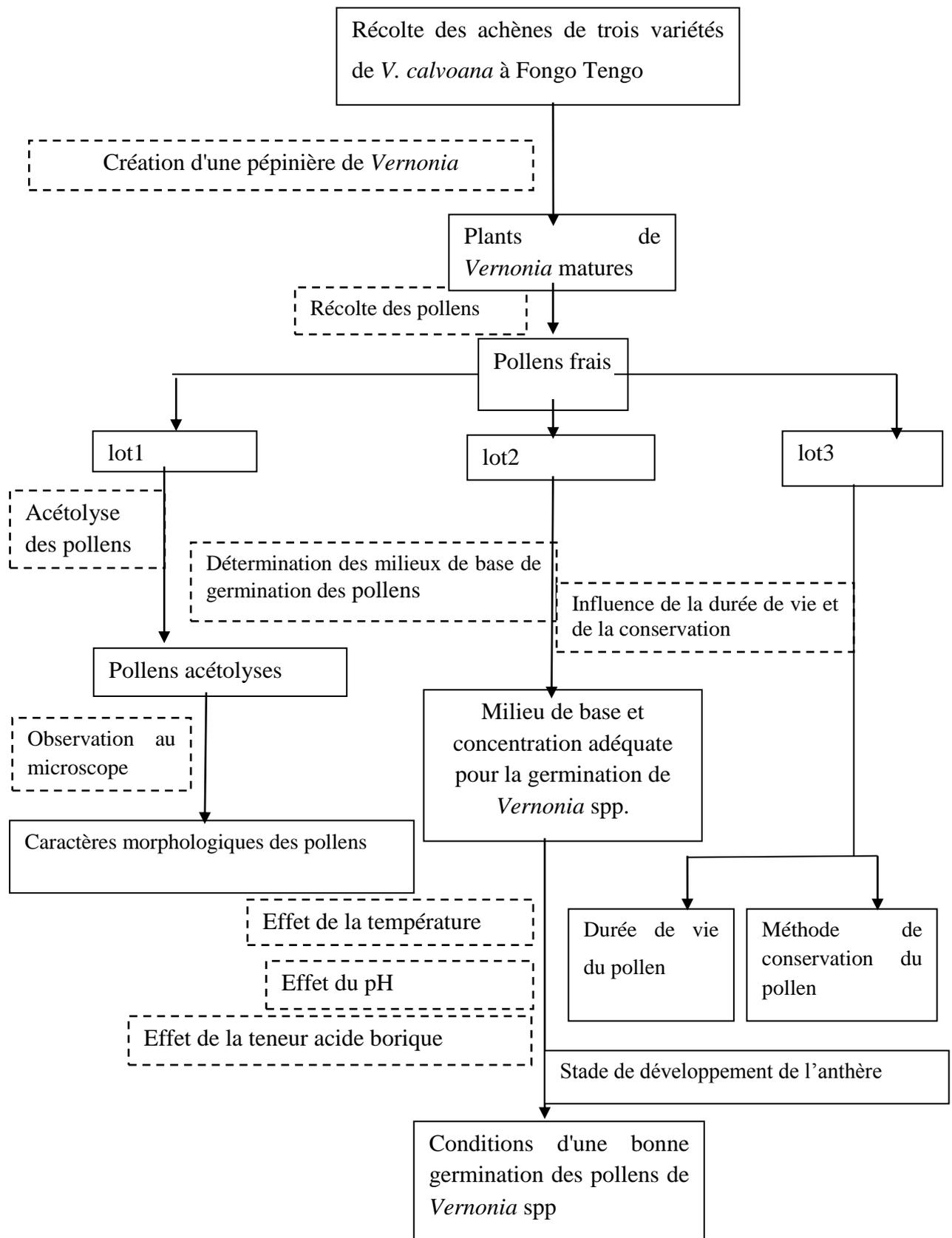


Fig. 24. Schéma synoptique de la démarche expérimentale pour l'analyse des pollens.

### **II.2.2.3.2. Evaluation du mode de dispersion des pollens**

Le dispositif mis en place vise à comparer les modes de dispersion des pollens de *V. amygdalina* et *V. calvoana* afin de les caractériser et de pouvoir expliquer la biodiversité au sein de ces espèces. L'expérimentation s'est déroulée de novembre 2014 à février 2015. Neuf (9) pieds de *V. amygdalina* sont choisis de façon aléatoire dans la jachère. Neuf pieds de *V. calvoana* à au moins 5 m de distance un pied de l'autre, sont repiqués après désherbage de la parcelle de 50 m<sup>2</sup>. Les dispositifs expérimentaux (Fig. 25, 26 et 27 ; Annexe 3) sont mis en place dès la formation du premier bouton floral. On considère que l'élément isolé n'est pas responsable de la pollinisation lorsqu'à la fin du processus, les achènes obtenus germent.

Les graines sont mises dans des enveloppes, étiquetées et conservées dans les mêmes conditions (à l'abri de l'humidité). Les tests de germination effectués sur les graines obtenues à l'issue des expériences réalisées en champs sont faits au laboratoire. Les graines sont mises à germer dans des boîtes de pétri sur du coton imbibé d'eau courante.

#### **II.2.2.3.2.1. Dispositif d'isolement des insectes et du vent : évaluation du rôle de la pluie dans la dispersion des pollens**

Pour la construction de l'enclos (Fig. 25), quatre piquets d'environ 3 m de long, plus haut que le plant de *Vernonia* sont plantés comme tuteurs. Ensuite, ils sont entourés d'un papier plastique transparent, le toit étant ouvert à la pluie. Trois enclos distincts, sur trois pieds différents de *Vernonia* ont été construits pour chaque espèce. Un dispositif conique constitué d'un squelette en fil de fer qu'enveloppe une moustiquaire imprégnée de mailles fines est construit. Un ruban adhésif souple et mince sert à maintenir la pointe du cône d'isolation préfabriqué fixé sur la branche du rameau.

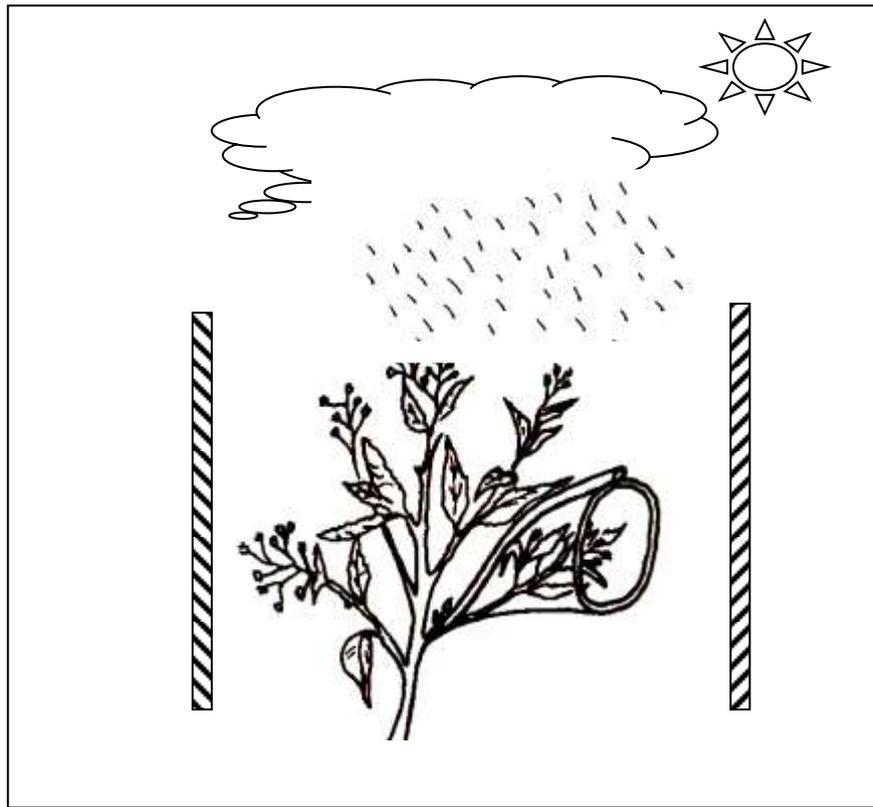


Fig. 25. Dispositif d'étude du rôle de la pluie dans la dispersion des pollens de *Vernonia*.

Trois rameaux différents du même pied sont isolés à l'aide des moustiquaires. Pour chaque espèce de *Vernonia*, 18 rameaux appartenant à 6 plants, à raison de trois par pied sont ainsi isolés de la visite des insectes. Le but de l'expérience est d'exclure l'action du vent et des insectes dans le processus de pollinisation sans toutefois supprimer l'action de l'eau de pluie qui tombe par le sommet de l'enclos.

#### **II.2.2.3.2.2. Dispositif d'isolement des insectes et de la pluie : évaluation du rôle du vent comme facteur de dispersion des pollens**

Huit piquets en bois ont servi à la construction d'un hangar (Fig. 26) autour de la plante faisant l'objet de l'expérimentation.

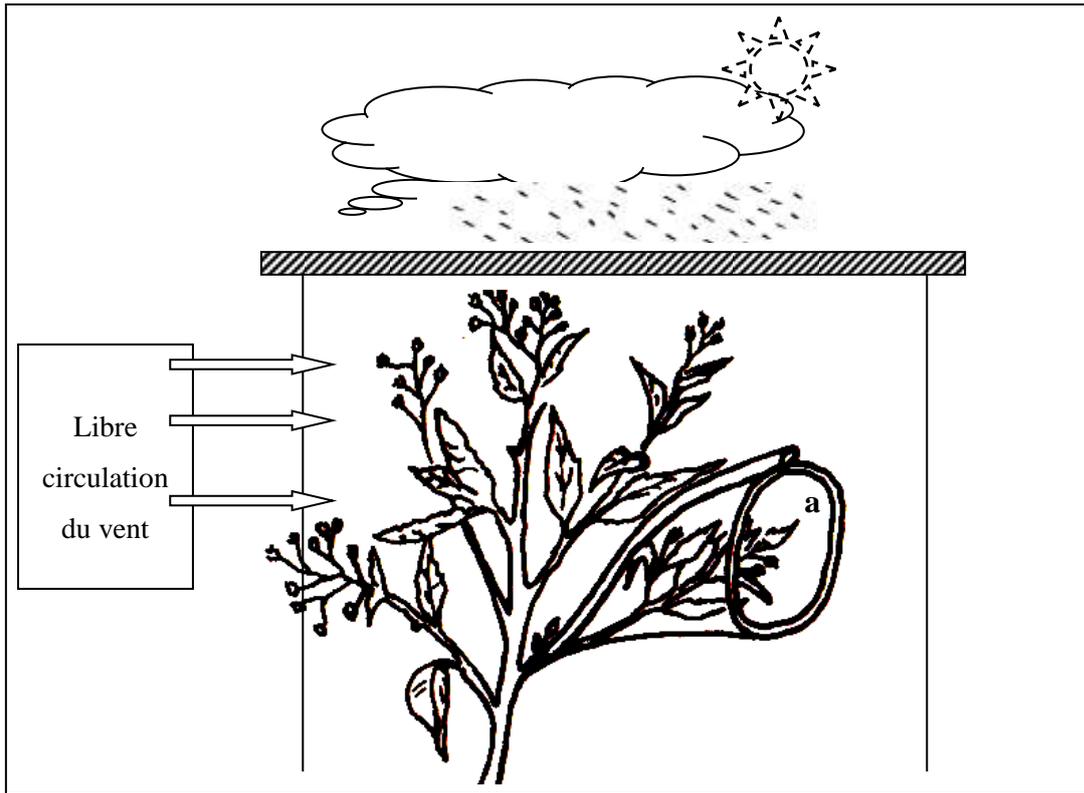


Fig. 26. Dispositif d'étude de l'effet du vent sur la dispersion des pollens. (a) moustiquaire

Pour chaque espèce, trois hangars distincts sont construits sur trois pieds différents. Leurs toits sont recouverts d'un plastique transparent. Trois rameaux fleuris sont chacun protégé des insectes par le dispositif conique pour éviter la pollinisation entomophile. Le but est d'exclure l'action de l'eau de pluie et des insectes dans le processus de pollinisation tout en préservant uniquement l'action du vent. L'approvisionnement en eau se fait par arrosage au pied du plant.

#### II.2.2.3.2.3. Evaluation du rôle des insectes dans la dispersion des pollens

Ce troisième dispositif permet d'isoler la pluie comme facteur de dispersion grâce à une bâche en plastique transparent montée au dessus du plant et soutenu par quatre piquets. Un écran est constitué par une bâche en plastique érigée autour du plan pour parer l'effet du vent. Deux mètres séparent la limite du toit à l'écran pare-vent pour permettre le passage des insectes pollinisateurs (Fig. 27).

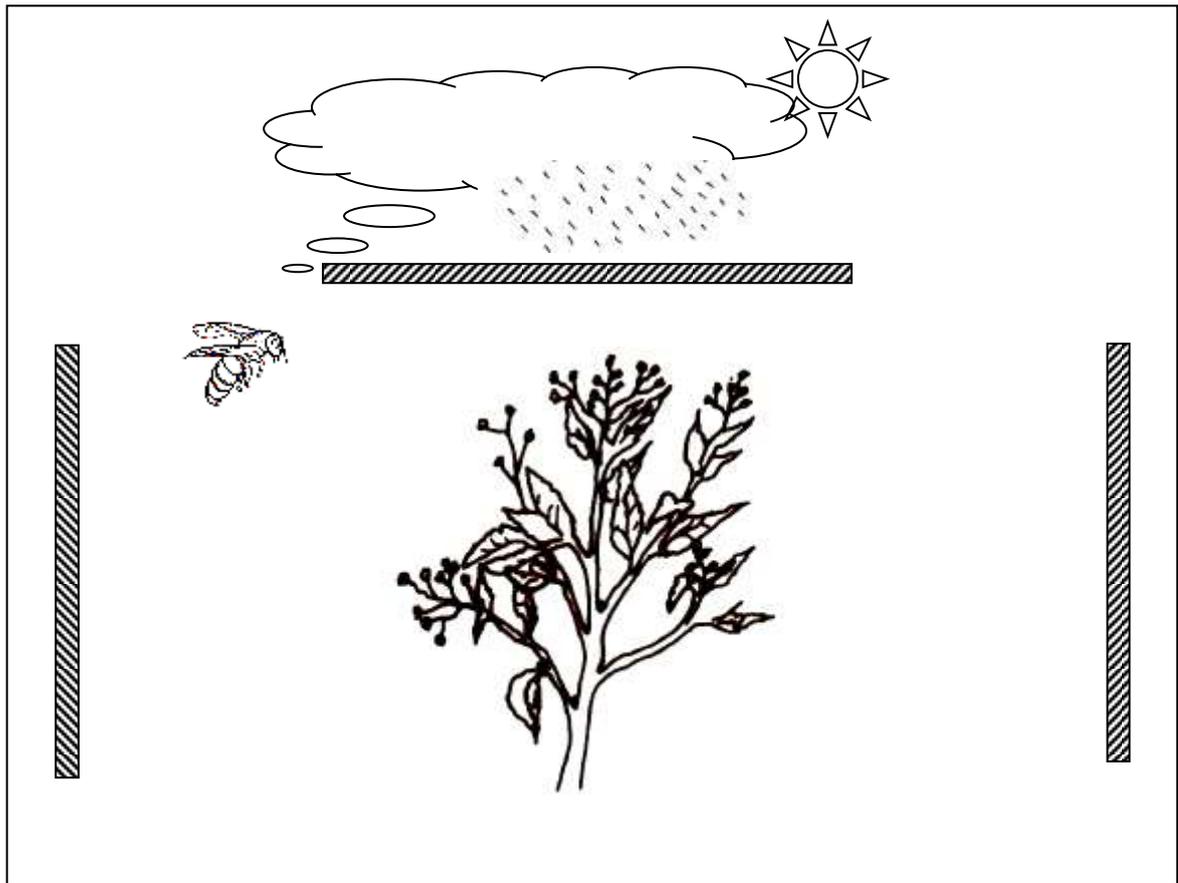


Fig. 27. Dispositif de mise en évidence de la fécondation entomophile de *Vernonia* spp..

Six plants sont utilisés pour cette expérimentation, à raison de trois plants par espèce. Sur chacun des plants, trois rameaux fleuris sont isolés grâce à des moustiquaires (Fig. 27). Tous ces plants sont exposés aux vents et aux pluies durant la période de l'expérimentation en champs. Au bout du processus, les graines isolées des insectes et les graines non isolées sont récoltées. Les graines non isolées ont constituées le traitement témoin pour toute l'expérimentation.

#### II.2.2.3.3. Mode de fécondation

Sur la base de l'analyse morphologique de la fleur de *Vernonia* spp., de la morphologie du pollen (Nguimkeng et *al.*, 2015), et des expérimentations faites sur le mode de dispersion des pollens des deux espèces de *Vernonia* étudiées, des hypothèses sont émises. La première hypothèse émise est celle couramment admise à savoir (Judd et *al.*, 1999) : la fécondation chez *Vernonia* spp. se fait par allogamie. Sachant que les fleurs du même capitule ne s'épanouissent pas au même moment chez *Vernonia* spp., une seconde hypothèse est émise à savoir : la fécondation chez *Vernonia* spp. peut se faire par autogamie.

## II.2.3. Analyse de la diversité de *Vernonia* spp. sur la base des critères chimiotaxonomiques

### II.2.3.1. Méthode d'extraction

Les analyses phytochimiques de *Vernonia* spp. sont réalisées sur les échantillons de feuilles de chaque accession (Fig. 28). Les données sur la composition chimique des feuilles sont réalisées avant l'apparition des premiers bourgeons floraux. Les feuilles fraîches sont récoltées et séchées à l'étuve à 35 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Ces feuilles sont ensuite broyées pour obtenir une poudre grâce à un broyeur électrique. La poudre de chacune des accessions est divisée en deux échantillons. Les échantillons sont destinés à deux types d'extractions différentes. La première extraction est faite au méthanol, et les extraits servent à faire le screening phytochimique et les dosages de sucres totaux, de protéines totaux, de phénol, de flavonoides et de tanins. La seconde extraction sert à réaliser les analyses HPLC.

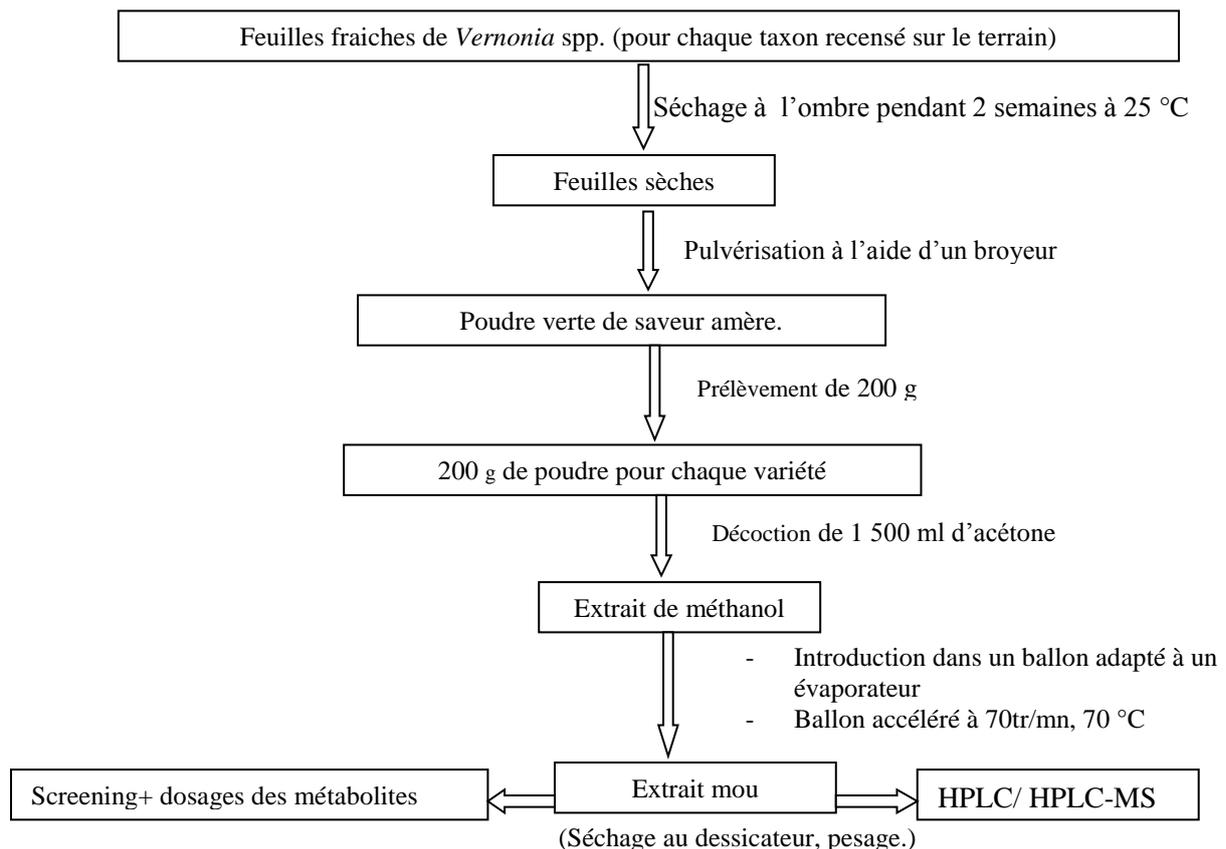


Fig. 28. Protocole d'obtention d'extraits méthanoliques

### **II.2.3.2. Screening phytochimique**

Les analyses chimiques qualitatives ont pour but de rechercher la présence des grands groupes de métabolites suivants : alcaloïdes, flavonoïdes, phénols et tanins.

Le réactif de Dragendorff est utilisé pour la détection de la présence des alcaloïdes dans les extraits méthanoliques. Les extraits de chaque morphotype, préalablement dissous dans une solution diluée d'acide chloridrique, sont filtrés pour recueillir les filtrats à analyser. Quelques gouttes du réactif de Dragendorff dans les filtrats révèlent la présence des alcaloïdes s'il y a formation d'un précipité jaune.

Le test de Shinoda est utilisé pour la révélation des flavonoïdes dans les extraits. Les extraits méthanoliques de chaque morphotypes sont dissous dans 2 ml d'eau distillée puis agités. Les paillettes de magnésium sont ajoutées au mélange. Quatre gouttes d'acide sulfurique concentré sont déposées délicatement le long des parois du tube à essai pour éviter tout risque d'explosion. L'apparition immédiate de la coloration orange dénote la présence de flavones. L'apparition de la coloration rouge traduit la présence de flavonoles. La couleur rose révèle la présence de flavones.

L'eau de brome est l'indicateur coloré utilisé pour la révélation des phénols. L'extrait est traité par trois gouttes d'eau de brome. L'absence de formation d'un précipité coloré révèle la présence de tanins hydrolysables.

Un millilitre de chaque extrait à analyser est dilué à l'eau distillée. Quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique y sont ajoutées. L'apparition de la coloration bleu sombre indique la présence de tanins dans la solution.

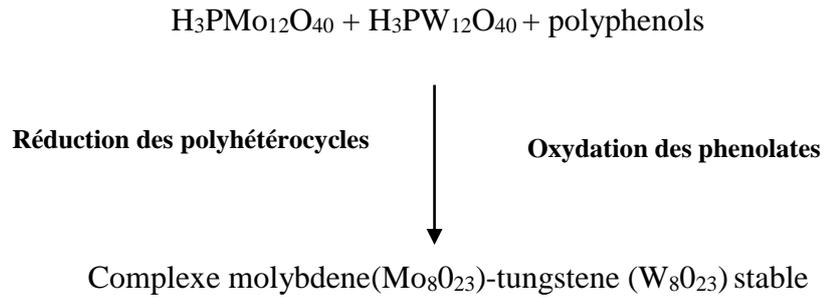
### **II.2.3.3. Dosage de quelques grands groupes métaboliques**

#### **II.2.3.3.1. Dosage des composés phénoliques solubles totaux (CPT)**

##### **II.2.3.3.1.1. Principe**

Les teneurs en CPT (Composés Phénoliques Totaux) solubles ont été estimées suivant le protocole décrit par Jaafar et *al.* (2010).

En présence de polyphénols, le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange des acides phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) et phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ )) est réduit en un complexe bleu de tungstène et de molybdène. Ce complexe dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en composés phénoliques, présente un maximum d'absorption au voisinage de 725 nm.



### II.2.3.3.1.2. Mode opératoire

Le dosage des CPT est fait selon le tableau V ci-dessous.

Tableau V. Protocole de dosage des polyphénols solubles totaux

N° des tubes	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	Essai
Acide chlorogénique 10µg/ml (ml)	0	0,06	0,08	0,12	0,14	0,16	0,2	0
Eau distillée (ml)	0,2	0,14	0,12	0,08	0,06	0,04	0	0
Extrait (ml)	0	0	0	0	0	0	0	0,2
Réactif de Folin-ciocalteu 10% (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 20%(ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8		0,8	0,8
<b>Incubation pendant 2h à 22°C et lecture de l'absorbance à 725 nm contre un blanc T<sub>0</sub></b>								
DO à 725nm	0	0,01	0,019	0,022	0,023	0,028		

Les résultats sont exprimés en mg/g de matière sèche, à partir de la courbe ci-dessous (Fig. 29).

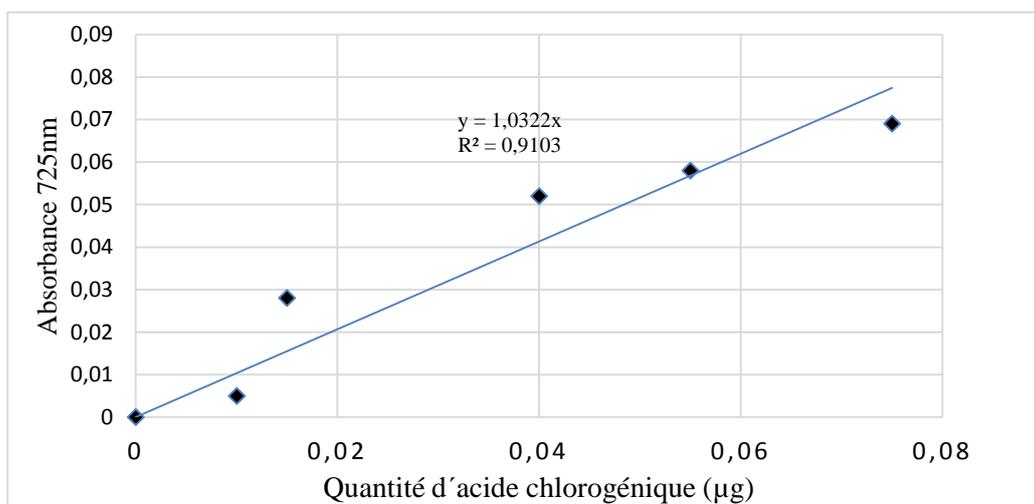


Fig. 29. Courbe d'étalonnage en vue du dosage des composés phénoliques solubles totaux.

### **II.2.3.3.2. Dosage des flavonoïdes solubles totaux**

La teneur en flavonoïdes des extraits est estimée selon la méthode décrite par Kramling et Singleton (1969).

#### **II.2.3.3.2.1. Principe**

Cette méthode est basée sur la précipitation par le formaldéhyde des flavonoïdes présents dans les extraits et leur quantification par différence entre la quantité de phénols totaux et celle des phénols non flavonoïdes restants dans l'extrait.

#### **II.2.3.3.2.2. Mode opératoire**

A 4 ml d'extrait phénolique, sont ajoutés respectivement 2 ml de HCl dilué à 50 % et 2 ml de formaldéhyde à (8 mg/l dans l'eau). Le mélange est incubé pendant 24 h à température ambiante puis filtré pour enlever le produit condensé. Le filtrat ainsi recueilli représentant les composés phénoliques non flavonoïdes est dosé conformément au protocole décrit plus haut (Jaafar et *al.*, 2010) et la teneur en flavonoïdes est déterminée selon la formule suivante:

$$T_{\text{Flavonoïdes}} = T_{\text{(Phénols totaux)}} - T_{\text{(Phénols non flavonoïdes)}}$$

### **II.2.3.3.3. Dosage des tanins totaux**

#### **II.2.3.3.3.1. Principe**

La méthode de Folin-Ciocalteu (réactif spécifique des phénols) se décompose en deux dosages colorimétriques successifs : le dosage des phénols totaux puis le dosage des phénols non-tanniques d'un extrait acétonique (Bruneton, 1999; Makkar, 2000). Ce second dosage est réalisé après la déplétion des tanins de l'extrait par le polyvinyl pyrrolidone (PVPP) (Makkar, 2000; Schofield et *al.*, 2001). Le PVPP est une molécule capable de se lier aux tanins présents dans l'extrait et les complexes 'tanin/PVPP' sont retirés de l'extrait par centrifugation (Makkar et *al.*, 1995). Indirectement, la teneur en tanins totaux (TTs) d'un échantillon est déterminée par la différence entre les teneurs en phénols totaux et en phénols non-tanniques.

#### **II.2.3.3.3.2. Mode opératoire**

Les tanins totaux sont estimés en mélangeant 100 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) avec 2 ml d'eau distillée et 2 ml du premier extrait. L'ensemble est agité et maintenu à 4 °C pendant 15 min, ensuite il est centrifugé à 3 000 g et à 4 °C pendant 10 min. Le surnageant, qui en résulte, est utilisé pour la détermination des tanins totaux qui correspond à

la différence entre les phénols totaux (mesurés par le procédé de Folin–Ciocalteu) avant et après traitement avec le PVPP.

#### II.2.3.3.4. Dosage des sucres

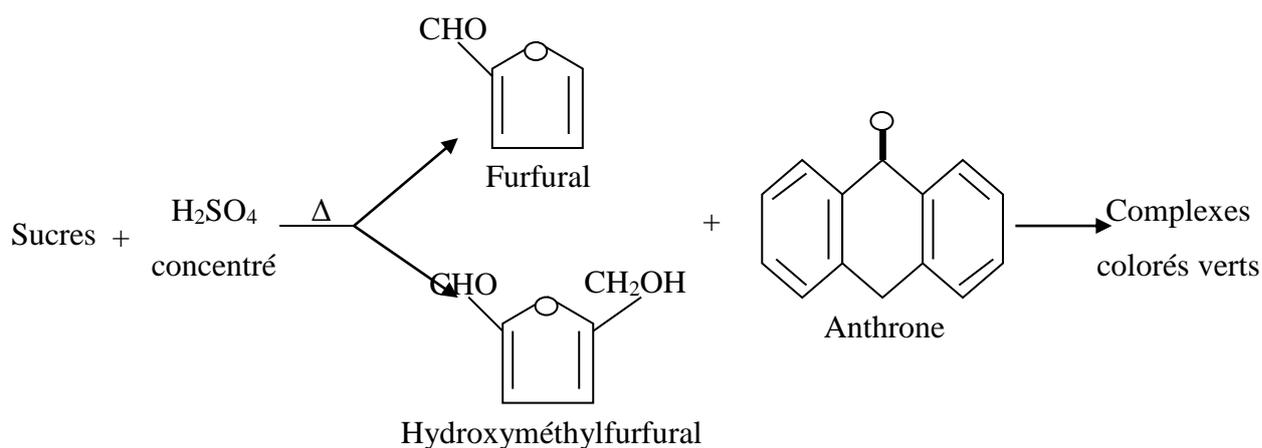
##### II.2.3.3.4.1. Extraction

Les sucres solubles ont été déterminés à partir d'un extrait méthanolique. Le matériel végétal (0,5g) a été broyé dans 5 ml d'éthanol 80 % puis centrifugé à 5 000 g pendant 15 min (Singh *et al*, 1990). Le surnageant est par la suite récupéré et conservé pour le dosage.

##### II.2.3.3.4.2. Dosage

###### II.2.3.3.4.2.1. Principe

Le dosage des sucres totaux est réalisé selon la méthode à l'antrone décrite par Yemm et Willis (1954). Chauffés en milieu acide concentré, les oses donnent des furfuraldéhydes par cyclisation et déshydratation. Les furfurals et leurs dérivés ont la propriété de se condenser avec l'antrone pour former des complexes colorés verts.



###### II.2.3.3.4.2.2. Mode opératoire

Le dosage des sucres totaux est fait selon le tableau VI en utilisant la méthode de Yemm et Willis (1954).

Tableau VI. Protocole de dosage des sucres totaux.

N° des tubes	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	Essai
Glucose (μl)	0	10	20	30	40	50	0
Anthrone (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Extrait (μl)							25
Chauffage au bain marie pendant 20 min suivi d'un refroidissement							
DO à 620nm	0	0,125	0,218	0,352	0,411	0,482	

Les résultats sont exprimés en mg/g de matière sèche, à partir de la courbe ci-dessous (Fig. 30).

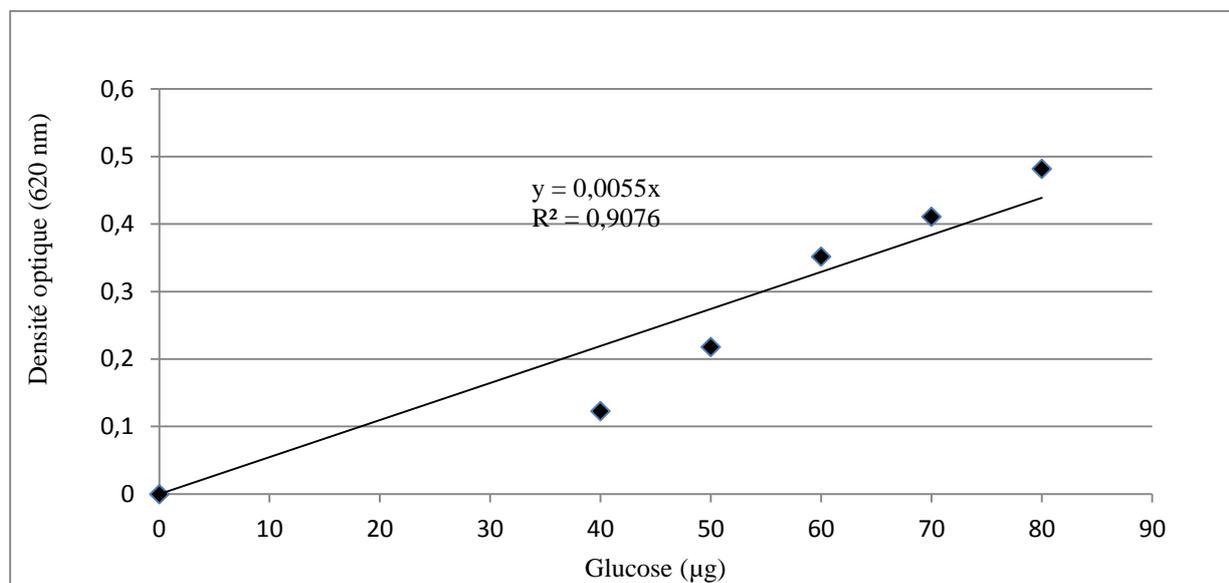


Fig. 30. Courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en sucres.

#### II.2.3.3.5. Identification et détermination quantitative de polyphénols par la HPLC-MS

Le système de HPLC a été couplé avec un spectromètre de masse. La phase mobile était un gradient binaire préparé à partir de méthanol et d'une solution d'acide acétique 0,1 % (v/v). L'élution a commencé avec un gradient linéaire en commençant avec 5 % de méthanol et se terminant à 42 % de méthanol, pendant 35 minutes; élution isocratique suivie pour les 3 prochaines minutes avec 42 % de méthanol. Le débit était de 1 ml/min et le volume d'injection était de 5  $\mu\text{L}$ .

Le signal MS a été utilisé uniquement pour l'analyse qualitative basée sur des spectres de masse spécifique de chaque polyphénol. Les spectres MS obtenus à partir d'une solution standard de polyphénols ont été intégrés dans une bibliothèque de spectres de masse. Plus tard, la trace MS/spectres des échantillons analysés ont été comparés aux spectres de la bibliothèque, ce qui permet une identification positive des composés. La trace UV a été utilisée pour la quantification de composés identifiés à partir de la détection MS. En utilisant les conditions de Chromatographie décrites ci-dessus, les polyphénols, ont élués en moins de 35 min (Tableau VIII). Quatre polyphénols ne peuvent pas être quantifiés dans des conditions chromatographiques actuelles due au chevauchement (acide caftarique avec de l'acide gentsique et l'acide caféique avec de l'acide chlorogénique). Cependant, les quatre composés peuvent être identifiés de manière sélective par la détection MS (analyse qualitative) basée sur

les différences entre leur masse moléculaire et les spectres MS. Les limites de détection ont été calculées comme la concentration minimale produisant un pic reproductible avec un rapport signal sur bruit supérieur à trois. Les déterminations quantitatives ont été effectuées en utilisant une méthode avec standard externe. Les courbes d'étalonnage dans la gamme de 0,5-50 µg/ml avec une bonne linéarité ( $R^2 > 0,999$ ) pour un tracé de cinq points ont été utilisées pour déterminer la concentration de polyphénols dans des échantillons de plantes.

Tableau VII. Liste des composés à analyser par la HPLC

N°	Noms des composé	Temps de rétention (mn)	Equations de calibrage
1	Acide caftarique	2,10	qualitative
2	Acide gentisique	2,15	qualitative
3	Acide caféique	5,6	qualitative
4	Acide clorogénique	5,6	qualitative
5	Acide p-coumarique	8,7	$A = -0,325 + 33,23 x$
6	Acide ferulique	12,2	$A = -1,016 + 39,55 x$
7	Acide sinapique	14,3	$A = -0,236 + 37,10 x$
8	Hyperozide	18,6	$A = 0,107 + 19,29 x$
9	Isoquercitrine	19,6	$A = -0,273 + 12,97 x$
10	Rutine	20,2	$A = 0,226 + 13,47 x$
11	Miricetol	20,7	$A = -0,544 + 26,45 x$
12	Fisetine	22,6	$A = 0,241 + 19,19 x$
13	Quercitrine	23,0	$A = 0,047 + 10,69 x$
14	Quercétol	26,8	$A = -1,152 + 36,32 x$
15	Patulétine	28,7	$A = -0,429 + 31,44 x$
16	Lutéoline	29,1	$A = -0,760 + 28,97 x$
17	Kaempferol	31,6	$A = -1,270 + 30,15 x$
18	Apigénine	33,1	$A = -0,908 + 20,40 x$

## II.2.4. Tests d'activités antimicrobiennes

### II.2.4.1. Tests antimicrobiens préliminaires par la méthode des disques

#### II.2.4.1.1. Préparation du milieu de culture

Les milieux Muller Hinton Agar pour les levures et Muller Hinton Broth pour les bactéries sont préparés à partir d'une base déshydratée disponible dans le commerce selon les instructions du fabricant. Immédiatement après passage à l'autoclavage, les milieux sont refroidis dans un bain d'eau entre 45 et 50 °C. Ils sont ensuite coulés et refroidis dans des boîtes de Pétri en verre ou en plastique, à fond plat sur une surface plane et horizontale pour donner une profondeur uniforme d'environ 4 mm (15 ml/boîte de Pétri). Le milieu gélose est refroidi à température ambiante.

#### **II.2.4.1.2. Préparation et standardisation de la suspension d'inoculum**

Plusieurs colonies des microorganismes à tester sont suspendues dans une solution saline (0,85 % NaCl). Ensuite, réglez l'inoculum à une turbidité équivalente à un standard McFarland 0,5 en comparant la turbidité des suspensions et en plaçant les tubes (tests et standard) en face d'un papier blanc.

#### **II.2.4.1.3. Préparation d'extraits de plantes et de solutions mères de contrôles positifs**

Les extraits de plantes ou références sont pesés avec précision et dissous dans les diluants appropriés (DMSO à 10 %) pour obtenir la concentration requise (20 mg/ml), en utilisant la verrerie stérile.

#### **II.2.4.1.4. Inoculation des plaques**

La surface des plaques sontensemencée en partant du haut avec le tampon. La totalité de la plaque a été balayée d'avant en arrière, d'un bout à l'autre de la plaque par l'inoculum afin d'en recouvrir uniformément la totalité de la plaque. La plaque est ainsi à peu près à 60 ° et trois fois de suite l'objet de la même procédure. La plaque est laissée sans couvercle pendant 3 à 5 min, mais pas plus de 15 min, pour permettre que toute l'humidité de surface en excès soit absorbée avant d'appliquer les disques imprégnés d'agents antimicrobiens.

#### **II.2.4.1.5. Préparation des disques de papier filtre séché**

Le papier Whatman n° 1 est utilisé pour préparer des disques d'environ 6 mm de diamètre, qui sont emballés avec du papier d'aluminium et stérilisés par autoclavage. Ensuite, 10 µl de solutions mères d'extraits de plantes, des composés ou contrôle positif sont introduits dans chaque disque.

#### **II.2.4.1.6. Application des disques antimicrobiens**

Les disques contenant les extraits végétaux sont appliqués sur les plaques de gélose (Fig. 31). Les disques sont placés sur la plaque un à un y compris les disques imbibés de chloremphénicol et de fluconazol servant respectivement de témoins comme composés antibactérien et antifongique. Le soin est pris d'appuyer sur chaque disque fermement pour assurer un contact complet et homogène avec l'agar-agar. Les plaques sont ensuite retournées et placées dans l'incubateur à 37 °C.

#### **II.2.4.1.7. Lecture des plaques et interprétation des résultats**

Au bout de 24 h (pour les bactéries) ou 48 h (pour les levures) d'incubation, chaque plaque est examinée. Les diamètres des zones d'inhibition complète (à en juger à l'oeil nu) sont mesurées, y compris le diamètre du disque. Les zones sont mesurées au millimètre entier

le plus proche, en utilisant un pied à coulisse ou d'une règle, qui se tient à l'arrière de la plaque de Pétri inversée.



Fig. 31. Modèle de disposition des disques sur une plaque de gélose.

#### **II.2.4.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)**

Les méthodes de micro dilution utilisant les protocoles M07-A9 décrit par le CLSI en 2012 pour les bactéries et M27-A3 décrit par le CLSI de 2008 pour les levures ont été utilisées, avec quelques ajustements (Anonyme, 2012).

##### **II.2.4.2.1. Principe**

Cette méthode est basée sur l'observation visuelle du culot formé par le dépôt de levures ou de bactéries et/ou du trouble dans le bouillon nutritif.

##### **II.2.4.2.2. Préparation des solutions stocks d'extraits**

Une masse de chacun des extraits est pesée puis dissoute dans le DMSO 100 % pour une concentration requise de 200 mg/ml, dans des tubes stériles. Le Chloramphénicol et le Fluconazole sont préparés à la concentration de 2 mg/ml et servent de contrôle positif pour les bactéries et levures respectivement.

##### **II.2.4.2.3. Préparation des solutions d'inocula bactériens et fongiques**

Les suspensions de levures utilisées pour les tests de sensibilité aux extraits sont préparées au titre  $2,5 \times 10^3$  cellules/ml à partir des cultures de 48 h,

S'agissant des bactéries, les suspensions sont préparées à partir de cultures jeunes de 24 h au titre de 0,5 McFarland ( $10^8$  Cellules/ml), par correspondance visuelle de turbidité vis-à-vis du standard de McFarland.

#### **II.2.4.2.4. Mode opératoire**

Les essais sont effectués dans des microplaques de 96 puits (12 lignes et 8 colonnes). Le milieu de culture utilisé est le Muller Hinton Broth pour les bactéries et le Sabouraut Dextrose Broth pour les Levures, préparé suivant les instructions des fabricants.

En premier, 100 µl de milieu de culture sont introduits dans toutes les cupules de la plaque; ensuite, 100 µl d'une solution stérile de composé sont prélevés et ajoutés aux 100 µl des puits de la première ligne, exception faite chez le 3<sup>eme</sup> et le 6<sup>eme</sup> puits. Une série de dilutions de raison géométrique 2 est effectuée de la ligne 1 à la ligne 11. Enfin, 100 µl d'une suspension d'une seule levure à  $2,5 \times 10^3$  cellules/ml ou d'une seule bactérie à 0,5 McFarland ( $10^8$  cellules/ml), estensemencée dans les cupules de la plaque, excepté celles des colonnes 3 et 6 ne contenant que le milieu de culture et servant de blanc ; les puits de la ligne 12 contenant le milieu de culture et l'inoculum servaient de contrôle négatif.

Les témoins positifs (Chloramphenicol pour les bactéries, Fluconazole pour les levures) sont testés sur les levures et les bactéries. Les essais sont effectués en duplicate. Les microplaques sont recouvertes puis incubées à 35 °C pendant 24 h ou 48 h pour les bactéries ou les levures respectivement.

A l'issue du temps d'incubation, la plus petite concentration à laquelle aucune croissance visible n'est notée, marquée par l'absence de turbidité ou de culot dans la cupule, ne correspond à la CMI de l'extrait concerné.

#### **II.2.4.3. Détermination des Concentrations Minimales Fongicides et bactéricides (CMF et CMB)**

La détermination des CMF et CMB est effectuée par subculture en milieu liquide des préparations prélevées sur les plaques de détermination des CMI.

En effet, à l'issue du temps d'incubation des plaques de détermination des CMI, le contenu des plaques est prélevé à raison de 50 µl de la cupule correspondant à la CMI et les quatre cupules précédentes respectivement, puis transférés dans cinq puits d'une autre plaque préalablement préparée et contenant dans chaque cupule 150 µl de milieu Muller Hinton Broth pour les bactéries et Sabouraut Dextrose Broth pour les levures. Ainsi, les quantités d'extraits contenues dans ces différentes cupules sont diluées suffisamment pour éliminer l'effet inhibiteur de l'extrait testé.

Les lignes 6 et 7 de chaque plaque servent de contrôle de stérilité du milieu de culture. Les plaques sont recouvertes et incubées à 35 °C pendant 24 h pour les bactéries et 48 h pour

les levures; les puits comportant la plus petite concentration d'un extrait n'ayant montré aucune croissance visible de la bactérie ou de la levure, voit son équivalent de la plaque de CMI correspondante considéré comme contenant la concentration fongicide ou bactéricide (CMF ou CMB) de l'extrait.

Après la détermination des CMI et CMF ou CMB des extraits testés, la fongicidie ou la bactéricidie de ces derniers est évaluée par calcul des ratios CMF/CMI ou CMF/CMB respectivement. Une valeur inférieure ou égale à 4 traduisait la fongicidie ou la bactéricidie ; une valeur supérieure traduisait l'effet fongistatique ou bactériostatique de l'extrait (Carbonnelle et *al.*, 1987).

### **II.2.5. Analyse des données**

Les paramètres étudiés sont testés pour la normalité par le test Ryan Joiner et l'homogénéité des variances par le test de Levene.

Les données obtenues sur les dimensions des pollens sont traitées par une analyse de variance (ANOVA) à deux critères de classification. Celles obtenues sur le taux de germination en fonction des paramètres de germination ont subi une ANOVA à un facteur grâce au logiciel Graph Pad Prism.

Pour l'expérimentation sur le mode de dispersion des pollens, les données sur le pourcentage de germination des graines des deux espèces de *Vernonia* étudiées sont traitées par une ANOVA à un facteur à l'aide du logiciel Minitab version 16.

Pour la caractérisation agromorphologique, les traits qualitatifs et quantitatifs sont analysés séparément. La statistique descriptive (moyenne, écart type, minimum, maximum, variance et coefficient de variation) est faite sur les caractères quantitatifs. Les données sur les traits quantitatifs sont traitées par une ANOVA à un facteur en utilisant le logiciel SAS (Statistical Analysis Software) Version 9.2. L'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse de correspondance multiple (ACM) sont faites grâce aux logiciels SAS, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) et Minitab. Le test de corrélation de Pearson est effectué pour explorer les liens entre les différents traits quantitatifs et qualitatifs. L'ACP et l'ACM, et la classification ascendante hiérarchique (CAH) sont réalisées respectivement pour définir les liens qui existent entre les variables agro morphologiques étudiées et de regrouper les morphotypes en des classes plus ou moins homogènes.

Les données sur les tests antimicrobiens sont analysées par une ANOVA à un facteur par le logiciel Minitab Version 16.

Les moyennes sont classées grâce aux tests SNK (Student et Newman-keuls) au seuil 5%. Les graphes sont réalisés dans le logiciel Excel du programme Microsoft.

Le logiciel ChemStation et DataAnalysis (Agilent, USA) traite les données chromatographiques.



**CHAPITRE III. RESULTATS ET  
DISCUSSION**

## III.1. RESULTATS

### III.1.1. Distribution des *Vernonia* au Cameroun

Sur plus de 23 000 espèces d'*Asteraceae*, organisées en 1 535 genres, 251 constituent les *Asteraceae* du Cameroun dont 48 ont été dénombrées comme représentant les *Vernonia* du Cameroun.

#### III.1.1.1. Distribution des espèces de *Vernonia* comestibles

L'aire de distribution des *Vernonia* comestibles (*Vernonia amygdalina* Delile, *V. colorata* (Willd.), *V. calvoana* Hook.) est présentée dans la Figure 32. En dehors de *V. amygdalina* qui est distribué sur toute la superficie du Cameroun, les deux autres espèces comestibles ne sont répandues que dans la zone de formation d'altitude humide et îlots subalpins. Dans toutes les zones où ces espèces sont récoltées, les populations locales la consomment comme légume feuille.

#### III.1.1.2. Distribution des espèces de *Vernonia* médicinales

Les espèces médicinales de *Vernonia* recensées sont *V. amygdalina* Delile, *V. conferta* Benth., *V. colorata* Willd., *V. purpurea* Sch.Bip., *V. glabra* (Steetz) Vatke, *V. guineensis* Benth, *V. smithiana*, *V. pauciflora*. Ces espèces sont distribuées sur la majeure partie du territoire (Fig. 33), bien que les trois premières soient particulièrement ubiquistes. Les zones agro-écologiques les plus riches en *Vernonia* médicinales sont : la forêt semi-décidue à sterculiacées, la zone post-foestière congo-guinéenne de transition et la formation d'altitude humide et îlots subalpins.

#### III.1.1.3. Distribution des espèces de *Vernonia* sauvages

Toutes les espèces herbacées du genre *Vernonia* (*Vernonia purpurea*, *V. biafrae*, *V. bamendae*, *V. ambigua*, *V. acrocephala*, *V. glabra*, *V. undulata*, *V. tufnelliae*, *V. smithiana*, *V. scoparia*, *V. schweinfurthii*, *V. perrottetii*, *V. nigritiana*, *V. glaberrima*, *V. cinerea*, *V. chapmanii*, *V. blumeoides*) recensées sont fortement répandues dans la zone des hauts plateaux de l'Ouest, la zone de la forêt humide à pluviométrie monomodale et la zone de forêt humide à pluviométrie bimodale (Fig. 34). Une faible distribution de ces *Vernonia* est observée dans la zone des hautes savanes guinéennes tandis que quelques plants seulement sont relevés dans la zone soudano-sahélienne.

Les espèces sauvages du genre *Vernonia* (*Vernonia conferta*, *V. colorata*, *V. auriculifera*, *V. ampla*, *V. thomsoniana*, *V. tenoreana*, *V. stenostegia*, *V. scoparia*, *V. saussureoides*, *V. leucocalyx*, *V. myriantha*, *V. frondosa*) relevées sont très faiblement

distribuées dans la zone soudano-sahélienne, faiblement distribuées dans la zone des hautes savanes guinéennes et très fortement distribuées dans la zone des hauts plateaux de l'Ouest, la zone de la forêt humide à pluviométrie monomodale et la zone de forêt humide à pluviométrie bimodale (Fig. 34).

#### **III.1.1.4. Distribution des espèces de *Vernonia* ubiquistes**

Les espèces ubiquistes du genre *Vernonia* sont : *Vernonia conferta*, *V. colorata*, *V. amygdalina* (Fig. 35). Elles ont été recensées dans presque toutes les zones agro-écologiques du Cameroun sauf dans la prairie inondable sahelosoudanienne du Yaéré, la forêt atlantique et congolaise et la formation soudanienne d'altitude. *V. conferta* est très présente dans les zones forestières (forêt ombrophile sempervirente, forêt semi-décidue à sterculiacée).

### Legend

#### Espèces\_Comestibles

- Vernonia amygdalina
- Vernonia calvoana
- ▲ Vernonia colorata

#### Zone\_Phytogéographique\_Cameroun

- Forêt Atlantique et congolaise
- Forêt Hemi\_ombrophile congolaise
- Forêt Ombrophile Sempevirente
- Forêt semi\_décidue à Sterculiacée
- Formations d'altitude humides et îlots subalpins
- Formations soudaniennes d'altitude
- Prairie inondable sahélo-soudanienne du yaéré
- Savanes soudaniennes arborées et forêts claires sèches soudaniennes
- Savanes arbustives soudano-guinéennes
- Steppe à épineux sahélo-soudanienne
- Zone post-forestière congo-guinéenne et savane soudanoguinéenne de transit

Sources: Olivry, 1987/Herbier National  
Réalisée: NBENDA H. P.

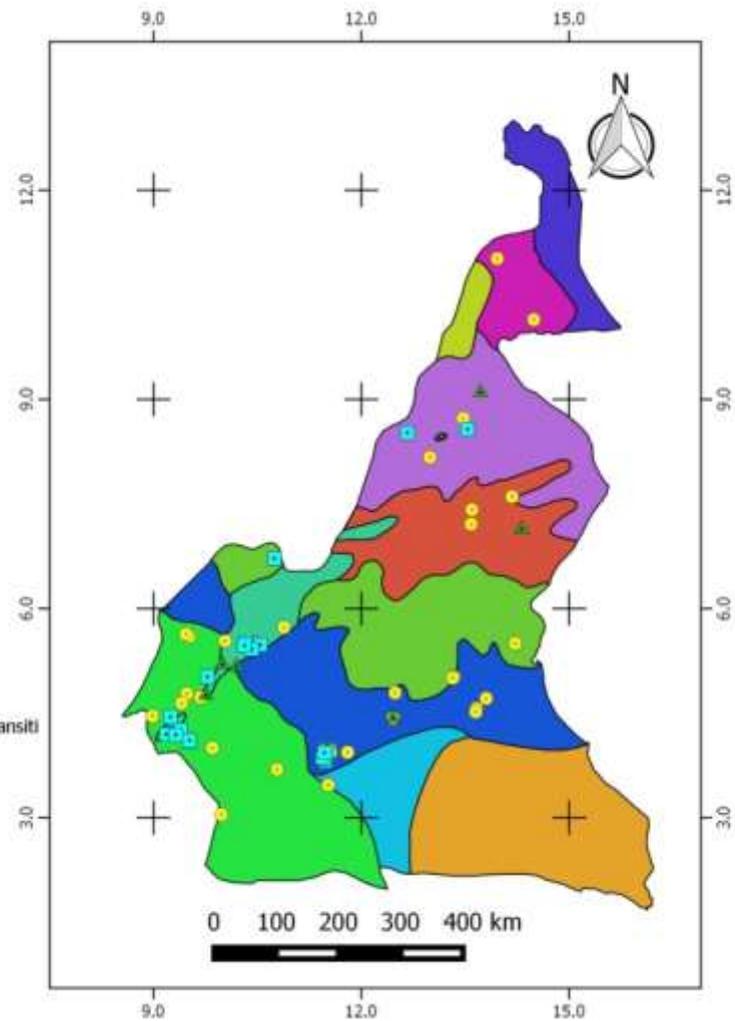


Fig. 32. Distribution des espèces de Vernonia comestibles.

### Légende

#### Espèces\_Médicinales

- *Vernonia amygdalina*
- *Vernonia colorata*
- *Vernonia conferta*
- *Vernonia glabra*
- *Vernonia guineensis*
- *Vernonia pauciflora*
- *Vernonia purpurea*
- *Vernonia smithiana*

#### Zone\_Phytogéographique\_Cameroun

- Forêt Atlantique et congolaise
- Forêt Hemi\_ombrophile congolaise
- Forêt Ombrophile Sempevirente
- Forêt semi\_décidue à Sterculiacée
- Formations d'altitude humides et îlots subalpins
- Formations soudanaises d'altitude
- Prairie inondable sahelo-soudanienne du yaéré
- Savanes soudanaises arborées et forêts claires sèches soudanaises
- Savanes arbustives soudano-guinéennes
- Steppe à épineux sahelo-soudanienne
- Zone post-forestière congo-guinéenne et savane soudanoguinéenne de transit

Sources: Olivry, 1987/Herbier National  
Réalisée: NBENDA P.

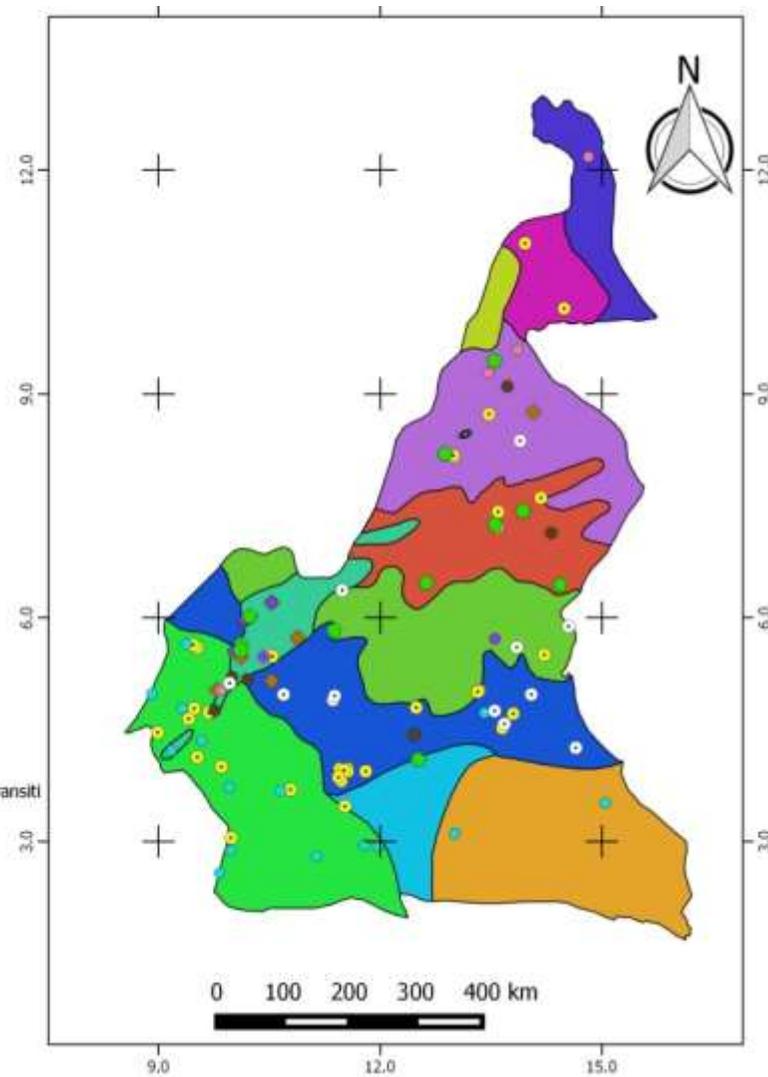


Fig.33. Distribution des espèces de *Vernonia* médicinales au Cameroun.

## Légende

### Espèces\_Sauvages

- Vernonia acrocephala Klatt
- Vernonia ambigua Kotschy & Peyr.
- Vernonia ampla O.Hoffm.
- Vernonia auriculifera (Welw.) Hiern
- Vernonia bambilorensis Benth.
- Vernonia bamendae C.D.Adams
- Vernonia biafrae Oliv. & Hiern
- Vernonia blumeoides Hook.f.
- Vernonia camporum A. Chev.
- Vernonia chapmani C.D.Adams
- Vernonia chtonocephala O.Hoffm.
- Vernonia cinerea (L.) Less.
- Vernonia conferta Benth.
- Vernonia frondosa Oliv. & Hiern
- Vernonia gerberiformis Oliv. & Hiern
- Vernonia glaberrima Welw. ex O. Hoffm.
- Vernonia glaberrima Welw. ex O.Hoffm.
- Vernonia glabra (Steetz) Vatke
- Vernonia guineensis Benth.
- Vernonia guineensis Benth. var. Cameroonica C.D.Adams
- Vernonia hymenolepis A.Rich.
- Vernonia inulaefolia Steud.
- Vernonia kotschyana Sch. Bip.
- Vernonia leucocalyx O.Hoffm. var. auriculifera C.D.Adams
- Vernonia leucocalyx O.Hoffm. var. macrocephala C.D.Adams
- Vernonia leucocalyx O.Hoffm. var. leucocalyx
- Vernonia macrocyanus O.Hoffm.
- Vernonia migeodii S.Moore
- Vernonia myriantha Hook.f.
- Vernonia nestor S.Moore
- Vernonia nigriflora Oliv. & Hiern
- Vernonia nigriflora Oliv. & Hiern
- Vernonia oocephala Baker
- Vernonia pauciflora (Willd.) Less.
- Vernonia perrottetii Sch. Bip. ex Walp.
- Vernonia poskeana Vatke & Hildebr. var. elegantissima (Hutch. & Dalziel) C.D.Adams
- Vernonia pumila Kotschy & Peyr.
- Vernonia purpurea Sch.Bip.
- Vernonia richardiana (Kuntze) Pichi-Sermolli
- Vernonia saussureoides Hutch.
- Vernonia schweinfurthii Oliv. & Hiern
- Vernonia scoparia O.Hoffm.
- Vernonia smithiana Less.
- Vernonia sp.
- Vernonia stellulifera (Benth.) C.Jeffrey
- Vernonia stenostegia (Stapf) Hutch. & Dalziel
- Vernonia subuligera O.Hoffm.
- Vernonia tenoreana Oliv.
- Vernonia thomsoniana Oliv. & Hiern
- Vernonia tuftnelliae S.Moore
- Vernonia undulata Oliv. & Hiern
- Vernonia uniflora Hutch. & Dalziel

### Zone\_Phytogéographique\_Cameroun

- Forêt Atlantique et congolaise
- Forêt Hemi\_ombrophile congolaise
- Forêt Ombrophile Sempervirente
- Forêt semi\_décidue à Sterculiacée
- Formations d'altitude humides et îlots subalpins
- Formations soudaniennes d'altitude
- Prairie inondable sahelo-soudanienne du yaéré
- Savanes soudaniennes arborées et forêts claires sèches soudaniennes
- Savanes arbustives soudano-guinéennes
- Steppe à épineux sahelo-soudanienne
- Zone post-forestière congo-guinéenne et savane soudano-guinéenne de transit

Sources: Olivry, 1987/Herbier National  
Réalisée: NBENDA P.

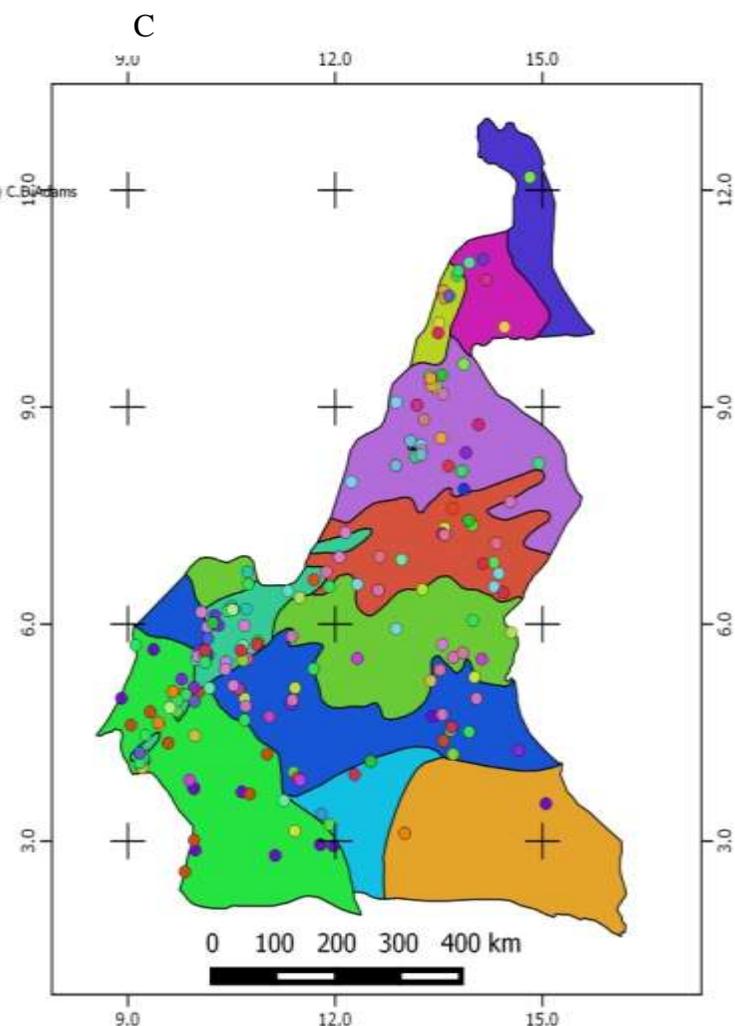


Fig. 34. Distribution des espèces de *Vernonia* sauvages au Cameroun.

### Légende

#### Espèces\_Ubiquistes

- *Vernonia amygdalina*
- *Vernonia colorata*
- *Vernonia conferta*

#### Zone\_Phytogéographique\_Cameroun

- Forêt Atlantique et congolaise
- Forêt Hemi\_ombrophile congolaise
- Forêt Ombrophile Sempevirente
- Forêt semi\_décidue à Sterculiacée
- Formations d'altitude humides et îlots subalpins
- Formations soudaniennes d'altitude
- Prairie inondable sahelo-soudanienne du yaéré
- Savanes soudaniennes arborées et forêts claires sèches soudaniennes
- Savanes arbustives soudano-guinéennes
- Steppe à épineux sahelo-soudanienne
- Zone post-forestière congo-guinéenne et savane soudanoguinéenne de transiti

Sources: Olivry, 1987/Herbier National  
Réalisée: NBENDA P.

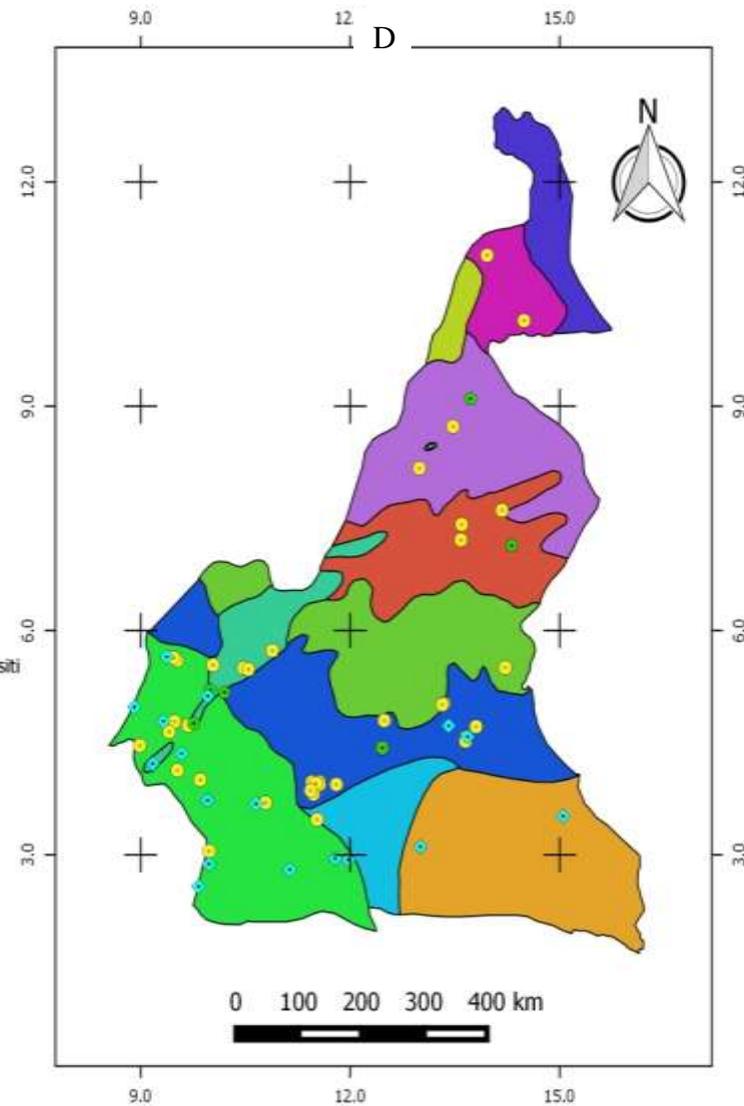


Fig. 35. Distribution des espèces de *Vernonia* ubiquiste au Cameroun.

La zone phytogéographique, siège de la plus grande diversité des *Vernonia* est la formation d'altitude humide et ilot subalpin (Tableau VIII). Les zones de faible diversité des *Vernonia* sont : la forêt atlantique et congolaise, la formation soudanienne d'altitude, la steppe à épineux sahelo-soudanienne et la prairie inondable sahelo-soudanienne (Tableau VIII).

Tableau VIII. Diversité des espèces de *Vernonia* en fonction des zones phytogéographiques du Cameroun.

Zones phytogeographiques	Nombres d'espèces
Forêt ombrophile sempervirente atlantique	12
Forêt atlantique et congolaise	2
Forêt hemiombrophile congolaise	11
Forêt semidécidue a sterculiacées	8
Savane soudanoguineenne de transition	12
Savane arbustive soudanoguineenne de l'Adamaoua	6
Formation d'altitude humide et ilot subalpin	21
Savane arbustive soudanoguineenne de l'Adamaoua	6
Savane soudanienne arborée et forêt claire sèche soudanienne	5
Formation soudanienne d'altitude	2
Steppe à épineux sahelo-soudanienne d'altitude	2
Prairie inondable sahelo-soudanienne	2
Total	48

### III.1.2. Caractérisation de *Vernonia* spp. Sur la base des paramètres palynologiques, organoleptiques et agro-morphologiques

#### III.1.2.1. Critères de reconnaissance des cultivars et méthodes de régénérations utilisées par les populations locales sur la base de l'enquête

La population locale utilise essentiellement trois critères de reconnaissance des *Vernonia* comestibles (Fig. 36). Le goût est le critère le plus utilisé pour 46,49 % des enquêtés. Il est suivi de la morphologie des feuilles pour 34,21 %. La coloration des feuilles est un critère de reconnaissance pour 19,3 % d'enquêtés. Aucun enquêté n'a dit connaitre un autre critère de reconnaissance des différents taxons comestibles.

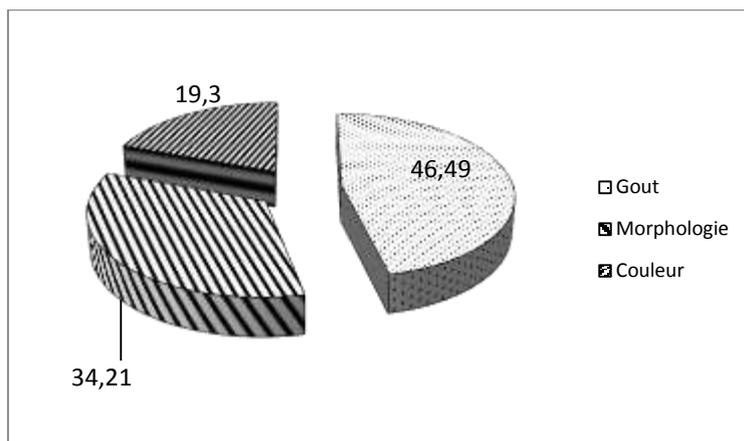


Fig. 36. Critères de reconnaissance des cultivars de vernonies par les populations locales.

Les cultivateurs (99 %) utilisent comme matériel de multiplication les graines pour les cultivars de *V. calvoana* (Fig. 37). Seulement 1 % de cultivateurs affirment utiliser les boutures ou les graines pour multiplier l'espèce. Par ailleurs, la technique du bouturage est utilisée par 95 % des cultivateurs de *V. amygdalina* contre 5 % qui utilisent les graines comme semences.

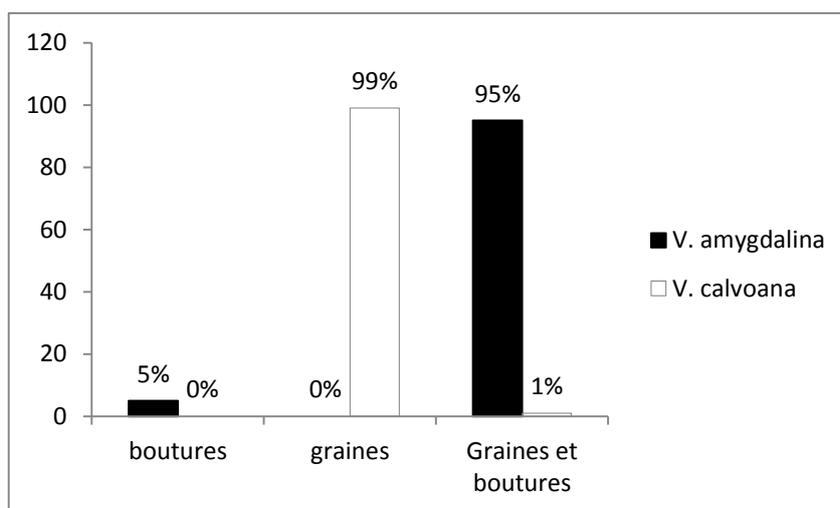


Fig. 37. Méthodes de régénération utilisées par les paysans.

### III.1.2.2. Caractérisation de *Vernonia* spp. sur la base du test organoleptique

Le test de dégustation a permis de regrouper les accessions en trois grands groupes reconnaissables par le goût des feuilles (Tableau IX). Les morphotypes VAA et VALF de l'espèce *V. amygdalina* ont en commun le caractère amer, attribué par 49,91 % de dégustateurs. La plus grande diversité de goûts est relevée chez l'espèce *V. calvoana*, pour laquelle deux morphotypes sont non amers (VCSV et VCSB), un morphotype est trop amère

(VCAV), et un morphotype est amère (VCAB). Les pourcentages respectifs de dégustateurs en faveur de ces avis sont: 52,38 ; 69,57 ; 76,19 et 59,09.

Tableau IX. Fréquences de dégustateurs ayant attribué à chaque morphotype un goût.

Espèces	Morphotypes	Gouts	Trop amère (%)	Amère (%)	Moins amère (%)	Pas amère (%)	Sucrée (%)	Autre (%)
<i>V. amygdalina</i>	VAA		22,73	40,91	27,27	4,54	0	4,54
	VALF		31,82	40,91	22,73	4,55	0	0
<i>V. calvoana</i>	VCAB		18,18	59,09	22,73	0	0	0
	VCAV		76,19	23,81	0	0	0	0
	VCSV		0	0	23,81	52,38	23,81	0
	VCSB		0	8,66	21,74	69,57	0	0

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV: *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB: *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

### III.1.2.3. Caractérisation de *Vernonia* spp. sur la base des paramètres palynologiques et agro-morphologiques

#### III.1.2.3.1. Caractérisation morphologique des grains de pollens

Après observation au microscope photonique des pollens acétolysés, il en ressort que les quatre formes de *Vernonia* étudiées se caractérisent toutes par une symétrie apolaire et une forme sphérique (Tableau X) du pollen. En effet, les rapports P/E sont tous proches de 1. Il est de 1,11; 1,03; 1,05 et 1,05 respectivement chez *V. amygdalina* ; *V. calvoana* à fleurs blanches; *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches violacées et *V. microcephala*. Des quatre variétés étudiées, le plus gros pollen est celui de *V. calvoana* var. *microcephala* avec 69,42 µm de diamètre polaire et 66,30 µm de diamètre équatorial. *V. amygdalina* a le pollen de plus petite taille dont le diamètre polaire vaut 49,30 µm et le diamètre équatorial 44,30 µm. *V. calvoana* (à fleurs blanches) et *V. calvoana* var. *calvona* respectivement, de diamètre polaire 64,53 µm et 69,24 µm et de diamètre équatorial 62,40 µm et 65,42 µm ont des dimensions qui se rapprochent de celles de *V. calvoana* var. *microcephala* tel que le montre le test de Newman avec une différence très peu significative au seuil de 0,0001. Une différence très significative est établie par le biais du même test entre les dimensions des pollens des taxa *V. amygdalina* et *V. calvoana*.

On établit par le test de Fisher une différence significative entre les dimensions des pollens des quatre variétés étudiées. Ce résultat permet de confirmer qu'il existe une

différence perceptible observée sur les pollens, au sein du genre *Vernonia*, permettant de mettre en évidence une grande diversité biologique.

Le pollen se présente comme une sphère portant trois couronnes d'épines distinctes délimitant trois fenêtres sans issue. La présence des pores, des échinules et des fenêtres est mise en évidence sur les pollens des variétés étudiés (Fig. 38). En effet, les ouvertures s'ouvrent seulement dans les espaces séparant les fenêtres d'où peuvent émerger les tubes polliniques (Fig. 38).

On a pu noter au moment de l'extraction du pollen de l'anthere des quatre variétés que, celui-ci est entouré d'une substance gélatineuse et blanchâtre. Les pollens étudiés sont tous fenêtrés, porés et échinulés. Ce sont en effet trois couronnes d'épines dressées autour d'une sphère qui en font des pollens fenêtrés.

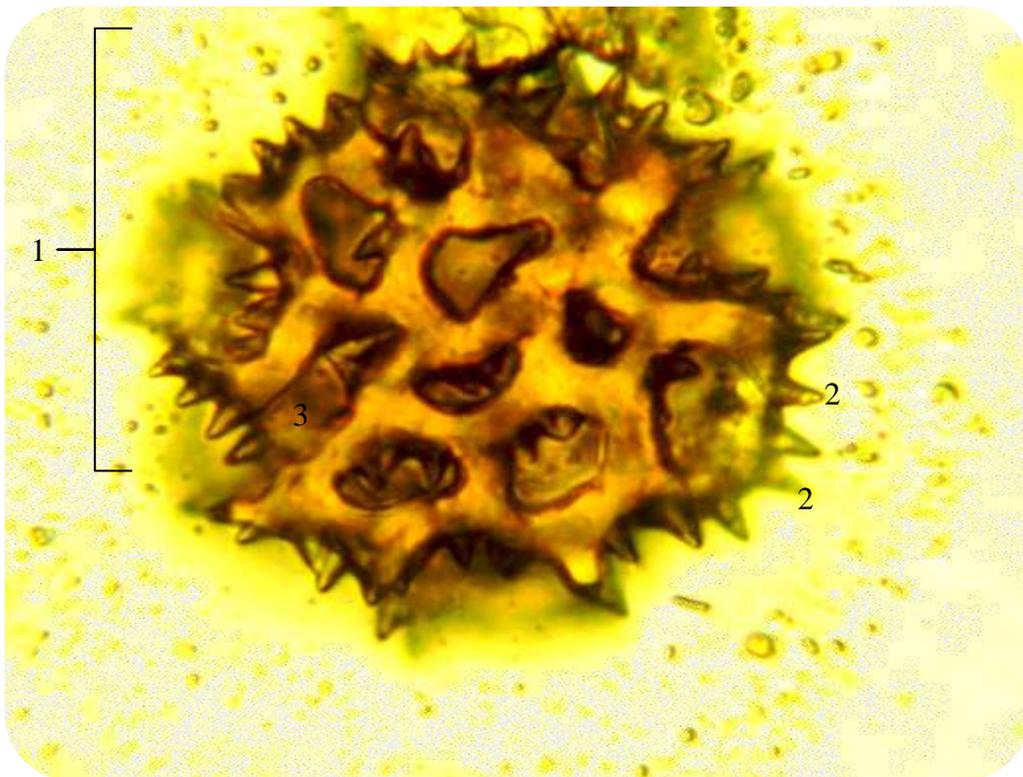


Fig. 38. Morphologie du pollen de *Vernonia* spp. vu au microscope optique.  
1 = Fenêtre ; 2 = Echinule ; 3 = Pore.

Tableau IX. Récapitulatif des caractères morphologiques du pollen de *Vernonia* spp.  
Diamètre équatorial (E), Diamètre polaire (P).

Espèces	Variétés	Accessions	Apertures	Ornementation	Forme	E (µm)	P (µm)	P/E
<i>V. amygdalina</i>		VAA	Porés	Echinulé et Fenêtré	Sphérique	44,30±4,86	49,30±5,12	1,11
		VALF						
<i>V. calvoana</i>	<i>V. calvoana</i> var. <i>calvoana</i>	VCAV				65,42±4,68	69,24 ±5,36	1,05
		VCAB						
	<i>V. calvoana</i> var. <i>microcephala</i>	VCSB				66,30±4,42	69,42 ±4,65	1,05
VCSV								

### III.1.2.3.2. Caractères physiologiques des pollens de différentes variétés

#### III.1.2.3.2.1. Influence des milieux de base de germination et de la concentration en saccharose sur la germination des pollens

Les pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* germent aussi bien sur milieu HH que sur milieu BK. Les résultats obtenus (Fig. 39) montrent que le pollen de cette variété germe mieux sur milieu solide HH que sur milieu solide BK avec un maximum de germination de 25 % à 28,76 % de concentration en sucre. Les concentrations en deçà de 15 % en sucre et au-delà de 40 % en sucre ne permettent pas la germination de ces pollens.

Les pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* n'ont pas germé en milieu liquide, en présence ou en absence de saccharose.

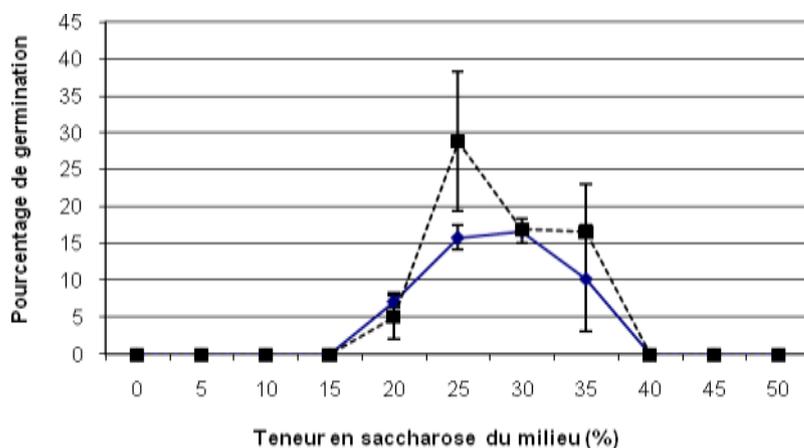


Fig. 39. Influence du taux de saccharose sur la germination des pollens *V. calvoana* var. *calvoana* sur milieu HH et sur milieu BK.

—●— Milieu BK      ---■--- Milieu HH

La teneur en sucre du milieu de culture a une influence sur la germination des pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches (Fig. 40). Les pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches germent mieux sur milieu solide HH tout comme chez *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs violacées. Les pics de germination sont situés entre 25 % et 35 % de concentration en saccharose. Le maximum de germination est de 55,98 % sur milieu solide

HH, obtenu à 35 % de sucre. Il est de 31,55 % de germination seulement sur milieu solide BK. Le pollen n'a pas germé sur milieu liquide. L'analyse statistique montre une différence hautement significative au seuil de probabilité 0,0001 entre les traitements HH et BK à 35 % de sucre. Le milieu de base de germination des pollens de *V. calvoana* à fleurs blanches est donc le milieu solide de Heslop- Harrison à 35 % de sucre. L'analyse de variance montre une différence significative entre les pourcentages de germination liés aux variations de la teneur en sucre du milieu au seuil de signification 5 %.

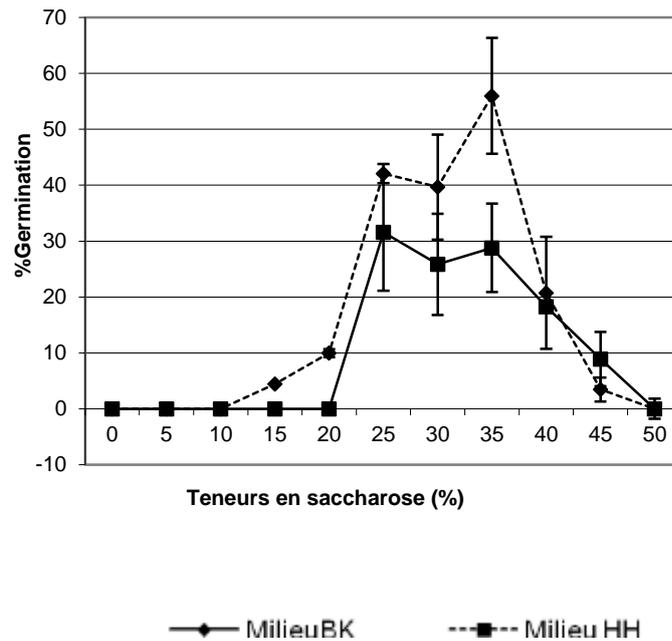


Fig. 40. Influence du taux de saccharose sur la germination des pollens *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches sur milieu HH et sur milieu BK.

Les pollens de *V. calvoana* var. *microcephala* germent sur milieu solide pour des valeurs de concentration en sucre comprises entre 20 % et 40 %. Le taux de germination est à la fois fonction de la teneur en sucre du milieu et fonction des constituants du milieu de base. Le pollen germe mieux sur milieu HH que sur milieu BK (Fig. 41). On atteint 12,62 % de germination sur milieu HH à 25 % de concentration en sucre dans le milieu contre 4,55 % de germination à 30 % de concentration en sucre du milieu de culture. Le test de Newman montre une différence très significative ( $p = 0,0132$ ) entre les taux de germination obtenus à 25 % de la concentration en sucre sur milieu HH et sur milieu BK. Cependant, le même test statistique ne ressort pas de différence significative entre le pourcentage de germination obtenu à 25 % de sucre sur milieu HH et à 30 % sur milieu BK.

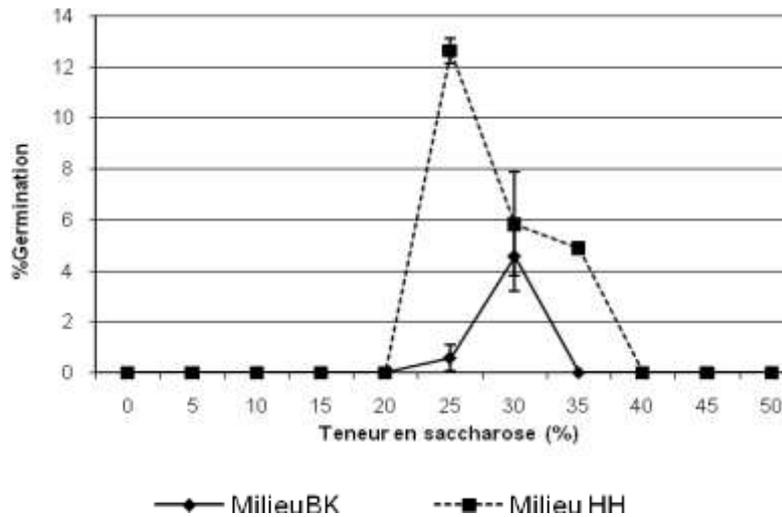


Fig. 41. Influence du taux de saccharose sur la germination des pollens *V. calvoana* var. *microcephala* sur milieu HH et sur milieu BK.

Le pollen de *V. amygdalina* n'a pas germé sur milieu liquide. La germination sur milieu BK n'a pas eu lieu (Fig. 42). On a obtenu seulement 24,29 % de germination sur milieu BK avec 25 % de sucre dans le milieu de culture. Le pollen de *V. amygdalina* s'est montré particulièrement récalcitrant. Son meilleur milieu de base de germination est le milieu BK additionné de 25 % de saccharose.

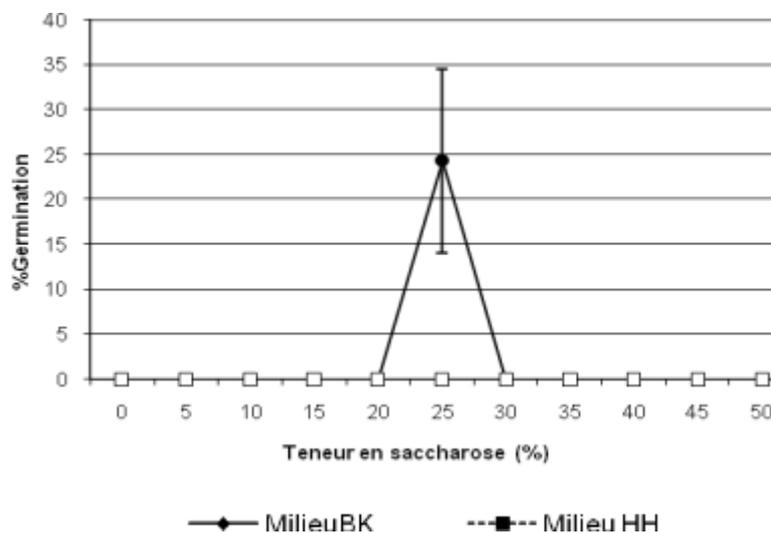


Fig. 42. Influence du taux de saccharose sur la germination des pollens *V. amygdalina* sur milieu HH et sur milieu BK.

### III.1.2.3.2.2. Effet de la température d'incubation sur la germination des pollens

La température a une influence sur la germination des grains de pollen de *Vernonia* spp. (Fig. 43). L'effet de la température sur la germination des pollens est très bénéfique

autour de 25 °C pour les taxons: *V. amygdalina*, *V. calvoana* var. *calvoana*, *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches. La variété *V. calvoana* var. *microcephala* s'individualise avec un optimum de température situé à 35 °C. La germination a été testée dans l'intervalle de température compris entre 10 et 35 °C. Les pollens ont germé hors mis ceux de *V. calvoana* var. *microcephala* qui ont commencé à germer à partir de 20 °C jusqu'à 35 °C de température.

Pour ce qui est des pollens de *V. amygdalina*, l'augmentation de la température d'incubation a une influence positive sur le taux de germination des pollens au-dessus de 20 °C de température pour atteindre son optimum à 25 °C avec un taux de germination de 26,89 %. Au-delà de 25 °C, le pourcentage de germination décroît avec l'augmentation de la température. La comparaison des moyennes établit une différence très significative entre le pourcentage de germination obtenu à 20 °C et celui obtenu à 25 °C ( $p = 0,0123$ ). Il n'établit pas de différence significative pour la germination des pollens de *V. amygdalina*, entre les traitements 10, 15, et 20 °C de température d'incubation; de même entre les traitements 25, 30, et 35 °C de température d'incubation.

Les pollens de *V. calvoana* à fleurs blanches atteignent leur optimum de germination à 25 °C avec un taux de germination de 25,6 %. Après cet optimum, le pourcentage de germination décroît avec l'élévation de la température d'incubation. L'analyse statistique montre une différence hautement significative entre les pourcentages de germination obtenus à: 20 et 25 °C ( $p = 0,0001$ ); 15 et 25 °C ( $p = 0,0001$ ); 20 et 35 °C ( $p = 0,0007$ ); 10 et 25 °C ( $p = 0,0015$ ); 15 et 35 °C ( $p = 0,003$ ); 15 et 30 °C ( $p = 0,0176$ ); 10 et 35 °C ( $p = 0,0265$ ).

On obtient les taux de germination les plus bas chez *V. calvoana* var. *calvoana* entre 10 °C et 20 °C. L'optimum de germination est obtenu à 25 °C avec 20,25 % de pollens germés. Après cet optimum, le pourcentage de germination décroît avec l'augmentation de la température. L'analyse des données par le test de Newman relève une différence significative ( $p = 0,0198$ ) entre les taux de germination de pollens relevés à la suite des incubations de pollens à 15 et à 25 °C de température. Il n'y a pas de différence significative au seuil de 5 % sur les pourcentages de germination des pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* lorsqu'on incube le pollen à des températures de 10, 15, et 20 °C. L'incubation des pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* à 25, 30, et 35 °C ne permet pas d'améliorer de façon significative au seuil 5 % le pourcentage de germination.

Le taux de germination croît chez *V. calvoana* var. *microcephala* avec l'augmentation de la température d'incubation. Le pourcentage de germination est plus élevé à 35 °C avec un pourcentage de germination de 13,82. Pour des valeurs de température 15 °C, le pollen ne

germe pas. L'analyse statistique n'établit pas de différence significative au seuil 5 % entre les différents traitements faisant varier la température. Au seuil 5 % de probabilité, l'augmentation de la température d'incubation entre 20 et 35 °C n'influence pas la germination des pollens de *V. calvoana* var. *microcephala*.

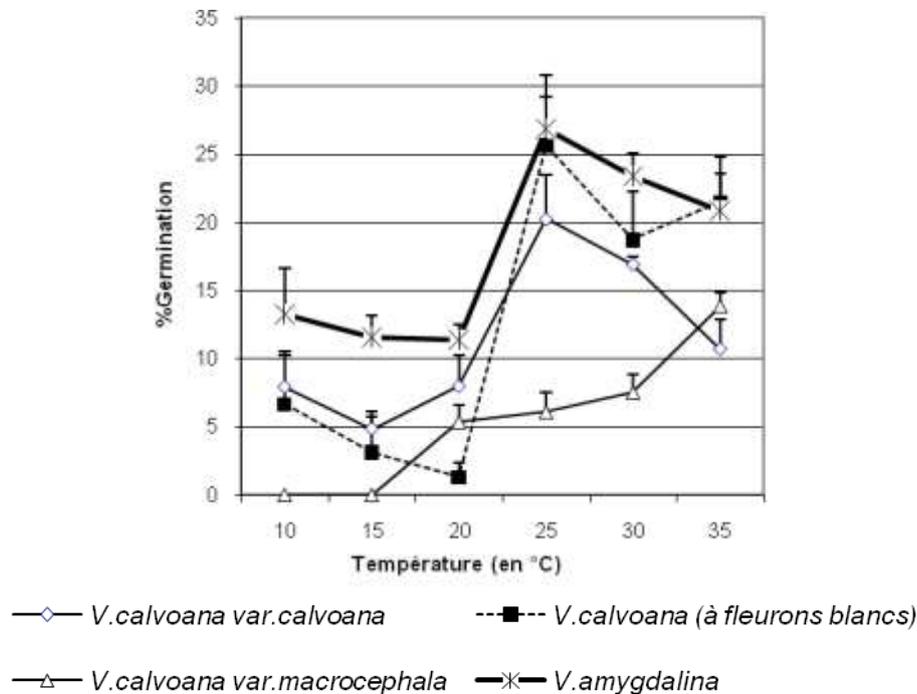


Fig. 43. Effet de la température sur la germination des pollens de *Vernonia* spp.

### III.1.2.3.2.3. Influence du stade de développement de l'anthere sur la germination des pollens récoltés

Le stade de développement de l'anthere a une influence sur le taux de germination des pollens (Fig. 44). En effet, récoltés hors de l'anthere, on a obtenu un taux de germination nul pour les quatre taxons étudiés.

Le pourcentage de germination est plus élevé pour les quatre variétés lorsqu' on récolte le pollen au stade I pendant lequel, pétale et anthère sont encore fermés. Au stade II où les pétales sont ouverts mais l'anthere fermé, le taux de germination est bas. Le pourcentage de germination passe de 30,44 à 2,79 chez *V. amygdalina* ; de 21,60 à 1,65 chez *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches ; de 6,05 à 1,65 chez *V. calvoana* var. *calvoana* ; et de 1 à 0 chez *V. calvoana* var. *microcephala*. L'analyse statistique permet d'établir une différence significative au seuil 5 % entre les pourcentages de germination de pollens enregistrés aux stades I et II pour les quatre taxons.

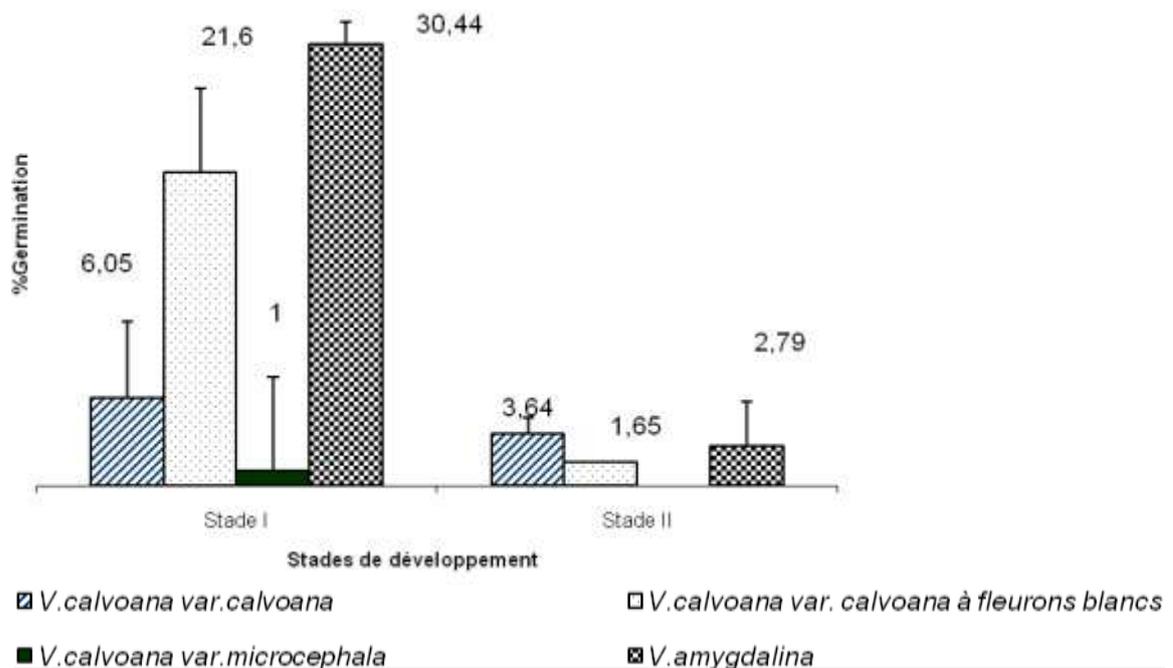


Fig. 44. Influence du stade de développement de l’anthère sur la germination des pollens de *Vernonia* spp.

#### III.1.2.3.2.4. Effet du pH sur la germination des pollens

Le pH a une influence sur la germination des pollens des *Vernonia* spp. étudiés (Fig. 45). Le pouvoir germinatif des pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs violacées atteint son optimum à pH 5,6 (Fig. 45b). Le taux de germination est de 13,44 % à cet optimum. Pour cette même variété, le pouvoir germinatif du pollen croît avec l’augmentation du pH de 4,4 à 5 unités de pH ; au delà de 5,6 il décroît. L’analyse de variance n’enregistre pas de différence significative entre les traitements au seuil 5 %.

Les pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches germent mieux dans les milieux dont le pH est compris entre 4,7 et 5,0 (Fig. 45c). A l’extérieur de cet intervalle de pH, le pouvoir germinatif baisse. La comparaison des moyennes établit une différence significative entre les traitements à pH 5,0 et à pH = 5,6 au seuil 5 % ; puis entre les traitements à pH 4,7 et à pH 5,6 au seuil 5 %. Les valeurs de pH indiqués pour la germination des pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches sont celles comprises entre 4,7 et 5,0.

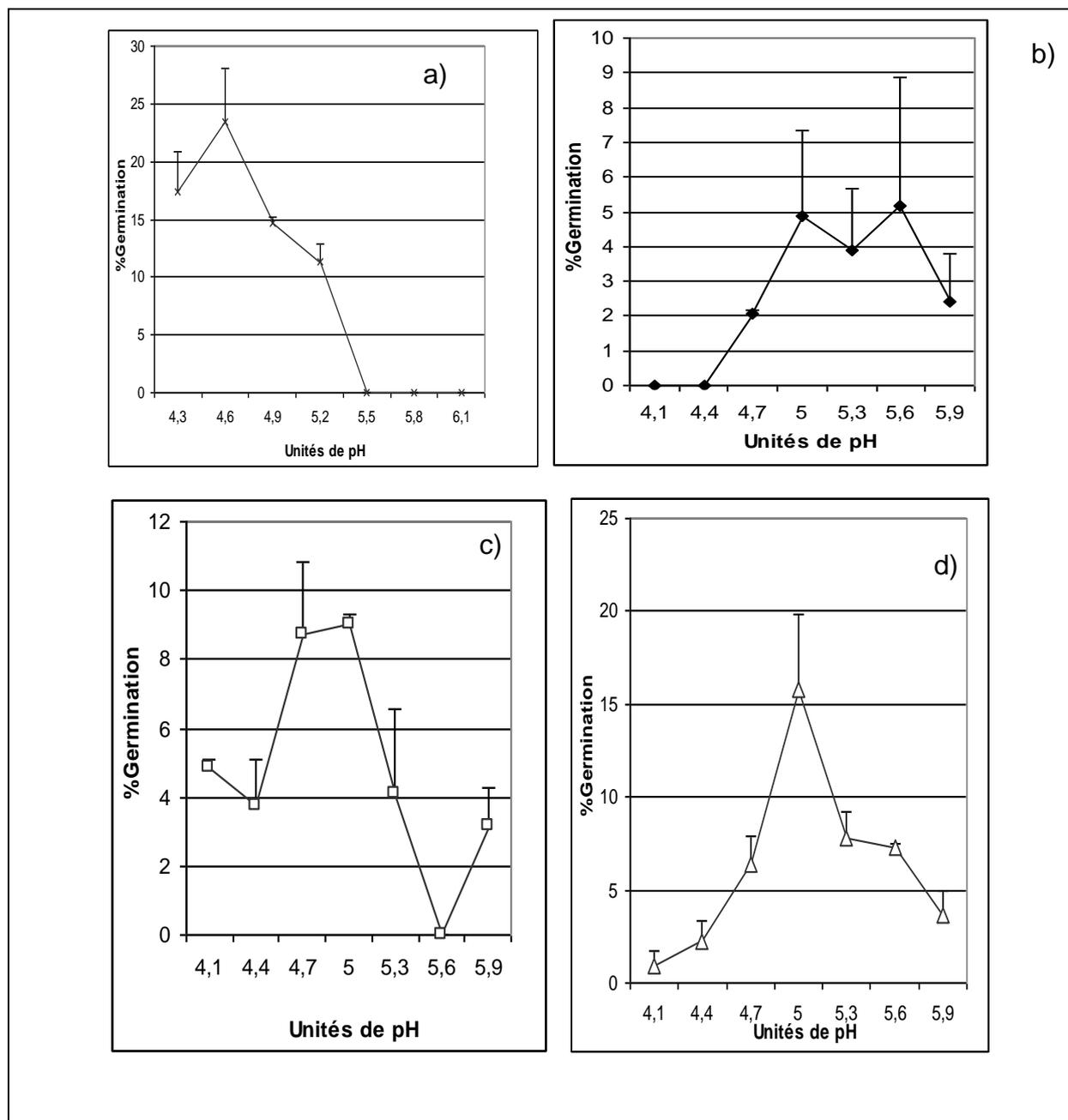


Fig. 45. Influence du pH sur la germination des pollens de *Vernonia* spp.  
 a) *V. amygdalina* ; b) *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs violacées; c) *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches ; d) *V. calvoana* var. *microcephala*.

Le taux de germination de *V. calvoana* var. *microcephala* est à son optimum lorsque le pH atteint 5,0 (Fig. 45d). Il est croissant avec l'augmentation du pH jusqu'à l'optimum de germination qui est 15,76 % au pH 5,0 ; puis décroissant après ce même extremum. Les tests statistiques mettent en évidence une différence significative au seuil 5 % entre les différents traitements. Une différence hautement significative est établie entre les traitements pH 5,0 et les traitements pH 4,1. Il en est de même pour les traitements pH 4,4 et pH 5,9.

La courbe du pouvoir germinatif de *V. amygdalina* est croissante entre 4,3 et 4,6 unités de pH (Fig. 45a). Elle décroît ensuite jusqu'à pH 5,5 pour lequel le pouvoir germinatif s'annule. Le pourcentage de germination le plus élevé enregistré vaut 23,38 %, obtenu à pH 4,6 contre 11,36 % seulement obtenu dans le traitement témoin à pH 5,2. L'analyse statistique des résultats de l'influence du pH sur le pouvoir germinatif des pollens de *V. amygdalina* montre une différence très significative entre les différents traitements appliqués ( $p < 0,001$ ).

#### **III.1.2.3.2.5. Effet de la teneur en acide borique du milieu de culture sur la germination des pollens**

La teneur en acide borique du milieu de culture des pollens de *Vernonia* a une influence sur le pouvoir germinatif de ces pollens. En effet, l'influence de la teneur en acide borique sur la germination des pollens des quatre taxons de *Vernonia* étudiés montre que les pollens de *V. amygdalina* ne germent pas dans un milieu de culture où la teneur en acide borique ne se situe pas dans l'intervalle de concentration compris entre 0,3 et 0,7 g/l (Fig. 46). L'allure générale de la courbe est parabolique et l'optimum de germination est atteint à 0,4 g/l de concentration en acide borique du milieu avec 22,02 % de pollens germés. L'analyse statistique montre que le pouvoir germinatif obtenu à 0,4 g/l d'acide borique dans le milieu de culture se distingue de tous les autres milieux sauf celui à 0,5 g/l de concentration en acide borique au seuil de significativité 5 %.

L'influence de la teneur en acide borique du milieu de culture sur la germination des pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* (Fig. 46), a permis d'obtenir une courbe de variation dont l'allure hyperbolique montre que le pollen peut germer pour des concentrations en acide borique comprises entre 0,4 et 0,8 g/l. Dans cet intervalle, le meilleur pourcentage de germination des pollens, 13,44 %, est obtenu à 0,4 g/l d'acide borique. 0,6 g/l d'acide borique dans le milieu de culture est la concentration pour laquelle le taux de germination est plus faible : 3,46 %. La comparaison des moyennes permet d'établir qu'il n'existe pas de différences significatives au seuil 5 % entre les traitements à 0,5 ; 0,6 ; 0,7 et 0,8 g/l d'acide borique. La différence significative avec tous les autres traitements est obtenue à 0,4 g/l d'acide borique dans le milieu de culture.

Pour la variété *V. calvoana* à fleurs blanches, de faibles variations du pouvoir germinatif non significatives au seuil 5 % ont été notés lorsqu'on fait varier la teneur en acide borique dans le milieu de culture des pollens.

La courbe montrant l'influence de la concentration en acide borique sur le pouvoir germinatif des pollens de *V. calvoana* var. *microcephala* présente une allure exponentielle. L'optimum de germination est de 14,67 % à 0,8 g/l d'acide borique. Il y a une différence

significative au seuil 5 % entre les résultats obtenus à 0,8 g/l d'acide borique et ceux de tous les autres traitements aux quels sont soumis les pollens de *V. calvoana* var. *microcephala*. Il n'y a pas de différences significatives au seuil 5 % entre les pouvoirs germinatifs lorsqu'on ensemence les pollens à 0,4 ; 0,5 ; 0,6 et 0,7 g/l d'acide borique.

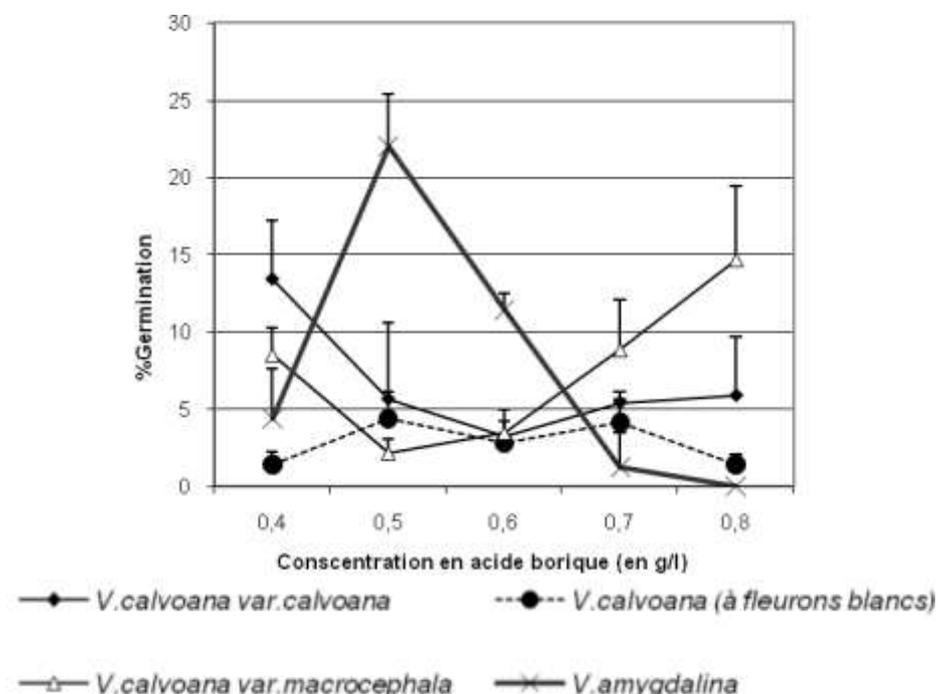


Fig. 46. Influence de la teneur en acide borique sur la germination des pollens de *Vernonia* spp.

### III.1.2.3.2.6. Evolution du pouvoir germinatif du pollen après la récolte

La viabilité du pollen frais diminue avec le temps dès la récolte du capitule jusqu'à l'ensemencement (Fig. 47). On passe de 24,01 à 0 % de germination après 6 h de temps écoulés pour les pollens de *V. calvoana* (à fleurs blanches). *V. calvoana* var. *calvoana* a très peu de pollens viables 9 h après la récolte : le taux de germination passe de 10,58 % une heure après la récolte à 2,25 % 9 h plus tard. Pour *V. calvoana* var. *microcephala*, le taux de germination des pollens décroît graduellement de 14,53 à 2,32 %. Chez *V. amygdalina*, de 15,31 % de germination une heure après la récolte le pouvoir germinatif décroît jusqu'à 1,33 % 9 h plus tard. Le pollen de *Vernonia* spp. a une durée de vie assez courte : 6 à 9 h de temps après la récolte, les pourcentages de germination des pollens sont presque nuls.

L'analyse statistique met en évidence des différences significatives au seuil 5 % entre les pouvoirs germinatifs des pollens ensemencés 1 h après la récolte et ceux récoltés 9 h après la récolte pour toutes les quatre taxons étudiés. Chez *V. calvoana* (à fleurs blanches), on note

sur la base du même test une différence entre les pouvoirs germinatifs des pollens mis en culture 1 h et 6 h après la récolte. Entre 3 et 9 h de temps écoulées après la récolte, le pouvoir germinatif baisse de façon significative pour la même variété. Entre 1 et 6 h le pouvoir germinatif décroît de façon significative au seuil 5 %. Le même phénomène est observé pour les pollens ensemencés 3 et 9 h après la récolte des pollens.

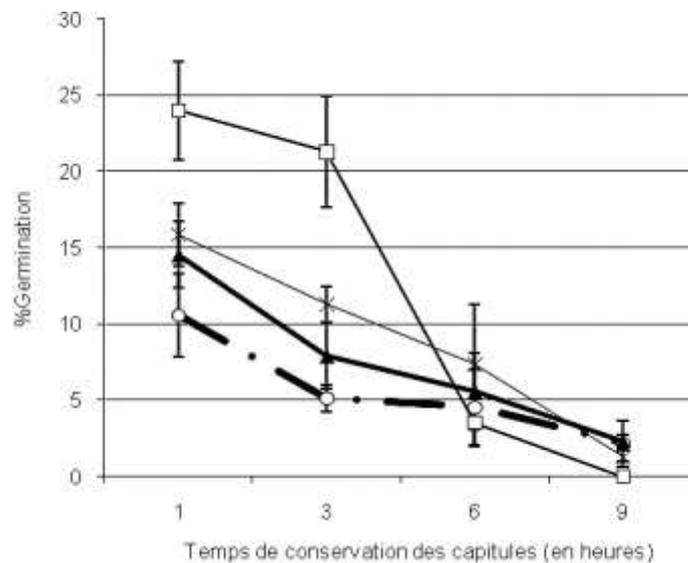


Fig. 47. Evolution de la viabilité des pollens frais de *Vernonia* spp. en fonction de la durée de conservation des capitules après la récolte.



### III.1.2.3.2.7. Conservation du pollen

La conservation du pollen frais au réfrigérateur, au congélateur, préalablement déshydraté ou non, s'est soldée par un échec car celui-ci n'a pu germer en culture *in vitro*. Seulement le pollen de *V. calvoana* var. *calvoana*, mis au congélateur, germe 3 heures de conservation plus tard et ne germe plus 6 heures après (Fig. 48). Le froid du réfrigérateur et du congélateur ne permet pas de conserver les pollens de *Vernonia* spp.. Plus de 3 heures après son extraction de l'anthere, le pollen de *Vernonia* ne germe plus.

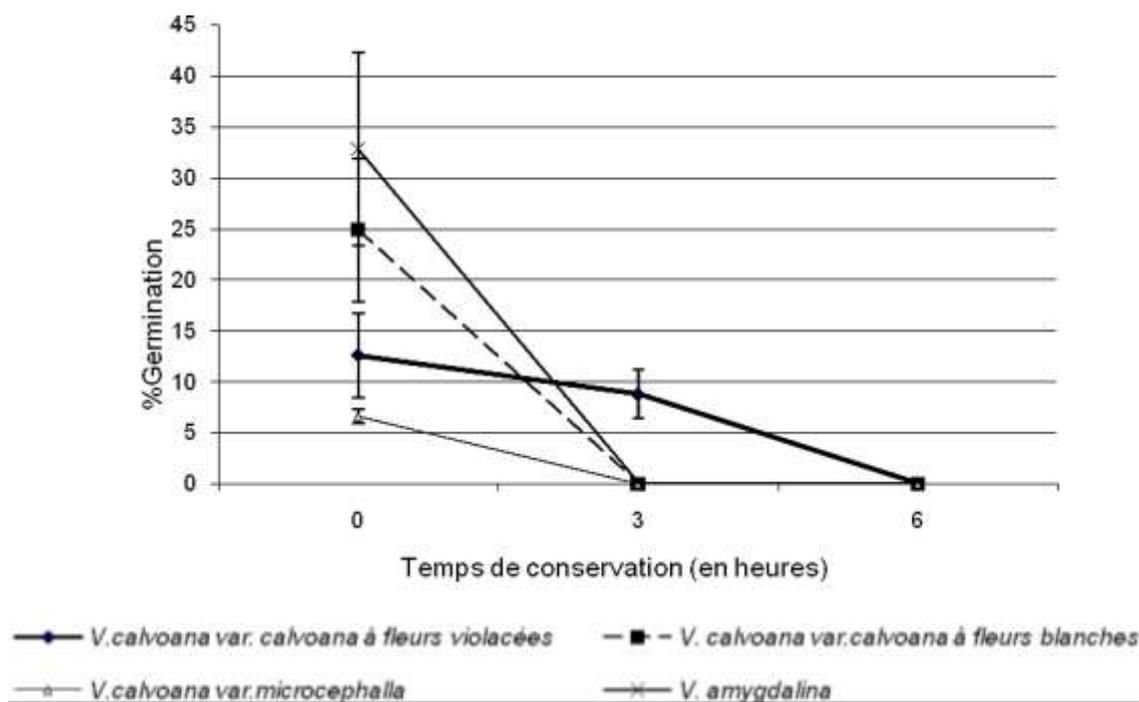


Fig. 48. Evolution du pourcentage de germination des pollens de *Vernonia* spp. en fonction de leurs durées de conservation au congélateur.

### III.1.2.3.2.8. Cinétique de la croissance du tube pollinique

La figure 49 représente la cinétique de croissance du tube pollinique de *V. calvoana* var. *calvoana*. Après 22 heures qui constituent le temps d'incubation des pollens, le tube pollinique émerge du pollen par les pores et s'allonge effectivement. Le tube pollinique mesure 40,93  $\mu\text{m}$  après 22 heures d'incubation et se développe pour atteindre 54,73  $\mu\text{m}$  après 29 heures d'incubation. La comparaison des moyennes établit une différence significative au seuil 5 % entre les longueurs moyennes des tubes polliniques enregistrées : après 25 heures et 29 heures d'incubation, après 22 heures et 29 heures d'incubation, après 24 heures et 29 heures d'incubation.

La figure 50 présente les photographies de quelques pollens germés laissant émerger un, deux, ou trois tubes polliniques. Régulièrement, c'est un tube pollinique qui est émis au cours de la germination d'un pollen.

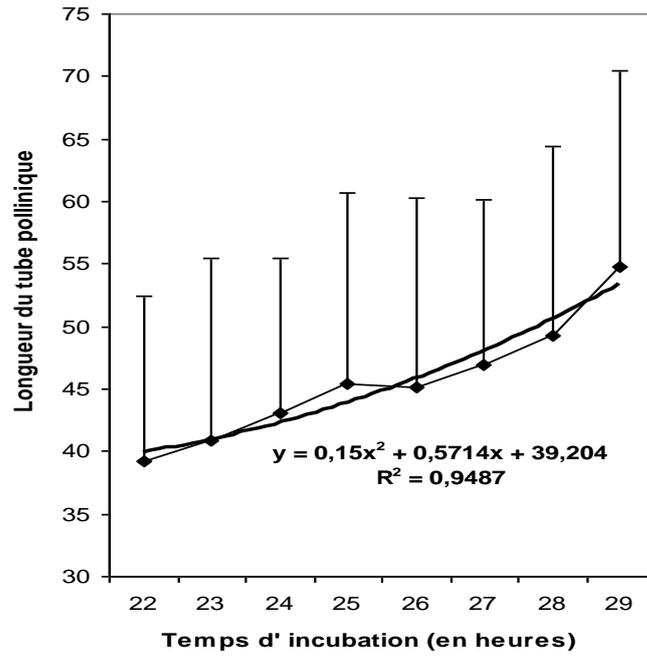


Fig. 49. Cinétique de croissance du tube pollinique de *V. calvoana* var. *calvoana*.

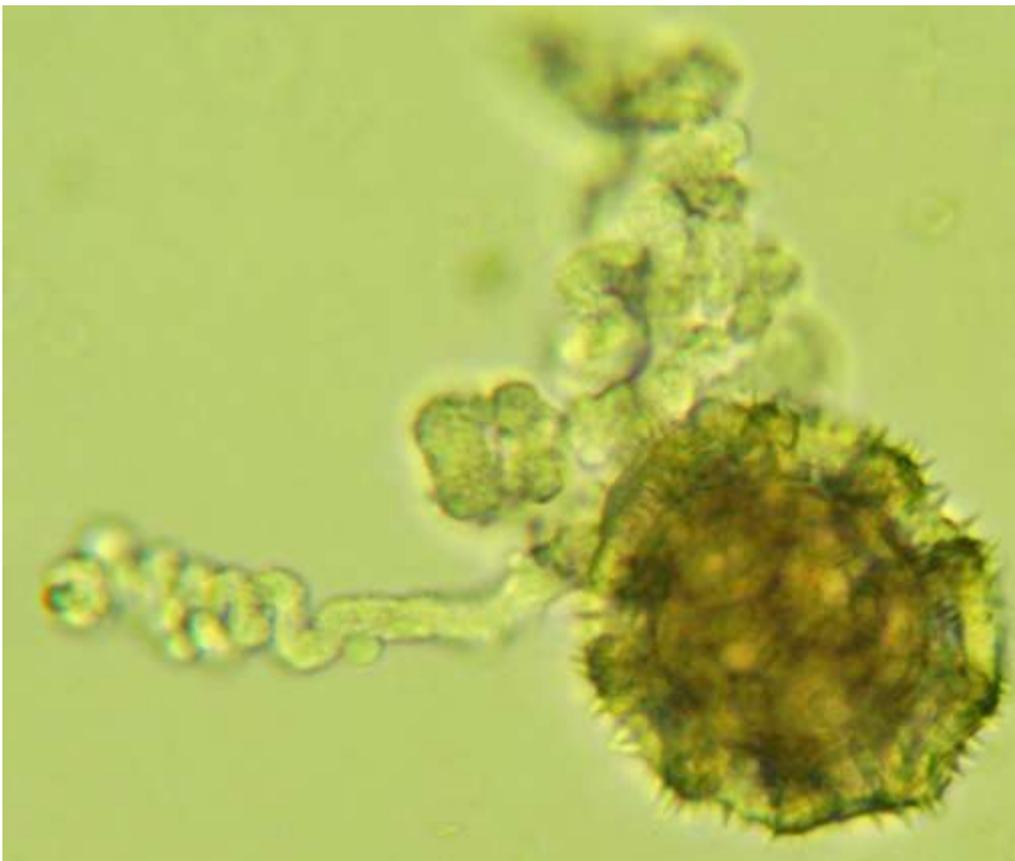


Fig. 50. Pollens germés de *Vernonia* spp.

Les conditions optimales de germination des pollens sont récapitulées dans le tableau XI.

Tableau XI. Récapitulatif des conditions optimales de germination des pollens étudiés.  
MB : Milieu de Base, HH : milieu de Heslop-Harrison, BK : milieu de Brewbaker et Kwack.

Paramètres étudiés	Espèces			
	<i>V. amygdalina</i>	<i>V. calvoana</i> var. <i>calvoana</i>	<i>V. calvoana</i> (blanc)	<i>V. calvoana</i> var. <i>microcephala</i>
MB	BK	HH	HH	HH
Sucre (%)	25	25	35	25
Germination (%)	29,00	28,76	55,98	12,62
Température (°C)	25	25	25	35
Germination (%)	26,89	20,25	25,60	12,62
Stade	I	I	I	I
Germination (%)	30,46	6,05	21,60	1,00
pH	4,60	5,60	5,00	5,00
Germination (%)	23,38	5,18	9,02	15,76
Conc. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (g/l)	0,40	0,40	0,50	0,80
Germination (%)	22,02	13,44	4,42	14,67

### III.1.2.3.3. Mode de dispersion des pollens de *Vernonia* spp.

#### III.1.2.3.3.1. Dispersion par l'eau

Le pourcentage de germination des graines de *Vernonia amygdalina* et *V. calvoana* issues des plants développés en absence de vent et d'insectes est présenté dans la figure 33. Pour ce dispositif, les résultats obtenus montrent que le pourcentage de germination des graines du témoin (vent + eau + insectes) est de 11,67 % pour *V. amygdalina* et de 25,67 % pour *V. calvoana*, contre 0 % pour le traitement eau de pluie uniquement dans les deux variétés. Aucune germination de graines n'est observée dans le traitement (Fig. 51), l'eau n'est donc pas le facteur de dispersion des pollens de *Vernonia*.

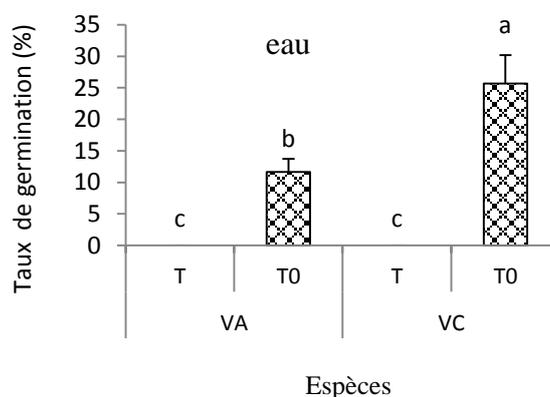


Fig. 51. Pourcentage de germination des graines de deux espèces de *Vernonia* spp. en présence d'eau, mais en absence de vent et d'insectes

T : absence de vent et d'insectes, présence d'eau ; T0 : présence de vents, d'insectes et d'eau ; VA : *V. amygdalina*, VC : *V. calvoana* ; Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5 % au test de Newman-Keuls.

### III.1.2.3.3.2. Dispersion par le vent

Le pourcentage de germination des graines de *Vernonia amygdalina* et *V. calvoana* en absence d'eau et d'insectes est présenté dans la Figure 52. Les résultats obtenus sur ce dispositif montrent que le pourcentage de germination des pollens du témoin (vent + eau + insectes) est de 14,67 % pour *V. amygdalina* et de 26,67 % pour *V. calvoana*. Le pourcentage de germination des pollens du traitement (vent uniquement) est de 0 % pour *V. amygdalina* et *V. calvoana* (Fig. 52). Aucune germination n'est observée dans le traitement (vent), ce dernier n'est donc pas le facteur de dispersion des pollens de *Vernonia* spp.

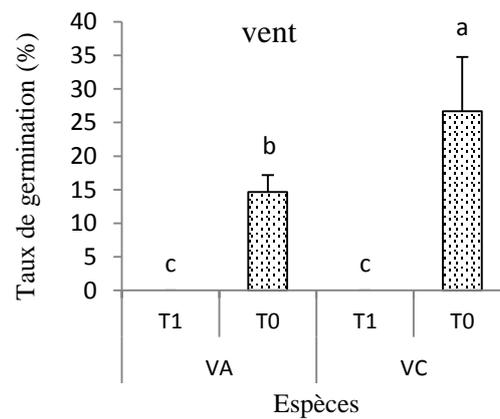


Fig. 52. Pourcentage de germination des graines de deux espèces de *Vernonia* spp. en présence de vent, mais en absence d'eau et d'insectes.

T1 : absence d'eau et d'insectes, présence de vent ; T0 : présence de vents, d'insectes et d'eau ; VA : *V. amygdalina*, VC : *V. calvoana* ; Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5% au test de Newman-Keuls.

### III.1.2.3.3.3. Dispersion par les insectes

Le pourcentage de germination des graines de *Vernonia amygdalina* et *V. calvoana* en absence d'eau et de vent, est illustré dans la Figure 53. Le pourcentage de germination des pollens du témoin (vent + eau + insectes) de *V. amygdalina* (11 %) et de *V. calvoana* (28,33 %) est statistiquement identique à celui du traitement (insectes uniquement : *V. amygdalina* (13,33 %) et de *V. calvoana* (28,22 %)). Les insectes sont donc responsables de la dispersion des pollens de *Vernonia* spp..

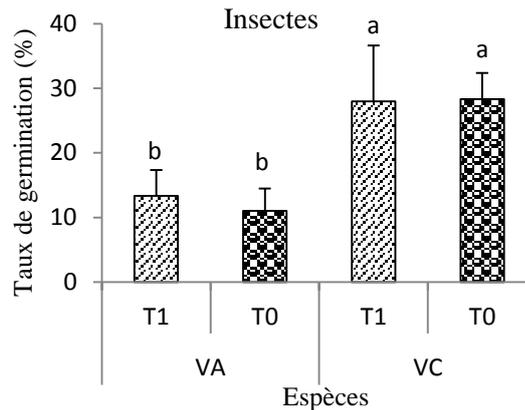


Fig. 53. Pourcentage de germination des graines de deux espèces de *Vernonia* spp. en présence d'insectes, mais en absence d'eau et de vent.

T1 : absence d'eau et de vent, présence d'insectes ; T0 : présence de vents, d'insectes et d'eau ; VA : *V. amygdalina*, VC : *V. calvoana* ; les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5 % au test de Newman-Keuls.

#### III.1.2.3.4. Caractéristiques des capitules

On identifie des fleurs à deux principaux stades de développement sur le même capitule. Les fleurs situées au centre du capitule sont plus jeunes, présentant des pétales encore fermés. Les fleurs marginales sont matures, avec des pétales ouverts et un stigmate totalement épanoui. Au cours du développement de la fleur, le style pubescent fait sailli au milieu des anthères connectées qui l'enveloppent, et libère progressivement les pollens enduits d'une substance gélatineuse. Ces pollens adhèrent aux poils du style qui les entraînent hors de l'anthère pour les mettre à la disposition des insectes pollinisateurs. *V. amygdalina* possède des fleurs toutes blanches alors que *V. calvoana* possède des fleurs blanches marginales et des fleurs violettes au centre. Un taxon de *V. calvoana* var. *calvoana* développe des fleurs toutes blanches.

On a identifié le premier stade de développement pendant lequel les fleurs, jeunes ont des pétales fermés recouvrant l'anthère comme étant le stade I. Le stade II caractérise les fleurs dont les pétales sont ouverts. La maturation des fleurs sur un capitule ne s'effectue pas au même moment. Elle s'effectue de la périphérie vers le centre du capitule.

#### III.1.2.3.5. Mode de fécondation de *Vernonia* spp.

L'analyse morphologique de la fleur de *Vernonia* spp., de la morphologie du pollen et du mode de dispersion des pollens ont permis d'établir les modes de fécondation possibles de *Vernonia amygdalina* et de *V. calvoana* (Tableau IX). En effet, les fleurs de ces deux espèces sont le siège du phénomène de protendrie. Au cours du développement de la fleur, le style fait

sailli au milieu des anthères synanthérées, raclant par les stipules qui le tapissent à la manière d'un piston les pollens qu'il met à la disposition des agents pollinisateurs. Ce n'est qu'au bout de l'allongement du style que ce dernier s'ouvre en languette pour que s'épanouisse le stygmate sur sa face supérieure. En générale, le phénomène de protendrie confère à la plante un mode de fécondation qui est l'allogamie (Fig. 54). Le mode de fécondation mis en évidence par ces observations n'exclut pas l'existence d'un mode de fécondation autogame.

L'inflorescence en capitule du *Vernonia* est constituée de fleurons d'âges distincts. Du centre vers la périphérie, les fleurons sont disposés des moins jeunes aux plus âgés. Il est donc possible que les pollens issus des fleurons les plus jeunes du même capitule soient transportés et déposés sur les stygmates des fleurons périphériques déjà épanouis. La possibilité du transport d'un pollen d'un fleuron plus jeune vers un fleuron mature (dont le stygmate est déjà épanoui) appartenant à un capitule distinct du premier fleuron est possible sur le même plant. Dans les deux cas de figures, on parlera d'autogamie car le matériel génétique des cellules reproductrices mâle et femelle proviennent du même pied. La fécondation chez *Vernonia* spp. peut donc se faire par allogamie ou par autogamie.

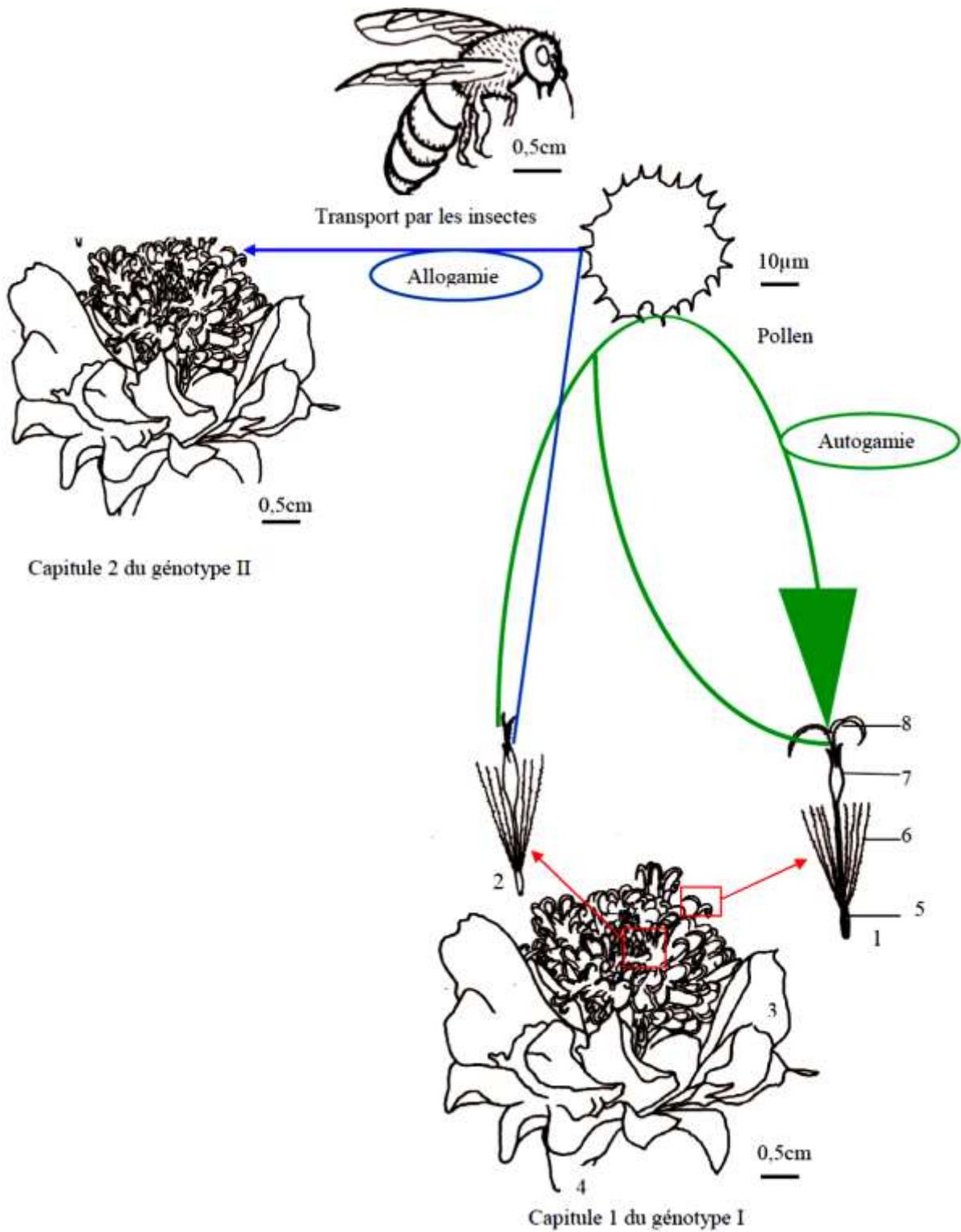


Fig. 54. Mode de dispersion du pollen chez *Vernonia* spp.

1 : fleuron stade II, 2 : fleuron stade I, 3 : bractées, 4 : pédoncule, 5 : ovaire, 6 : aigrette, 7 : pétales, 8 : stigmate.

### III.1.2.3.6. Caractérisation agro-morphologique de *Vernonia* spp.

#### III.1.2.3.6.1. Description des traits qualitatifs caractéristiques des vernonies

Les principaux traits qualitatifs distinctifs des accessions de *Vernonia* sont présentés dans le tableau XII. Les morphotypes de *V. amygdalina* possèdent uniquement les fleurs de couleurs blanches tandis-que ceux de *V. calvoana* ont des fleurs pouvant être blanches ou violettes. Une variabilité de coloration du limbe foliaire est observée chez *V. calvoana* (Tableau XII). En effet les feuilles de cette dernière peuvent être de couleur verte claire ou de couleur verte foncée. L'espèce *V. amygdalina* a des feuilles principalement vertes claires. Le goût des feuilles des morphotypes de *V. calvoana* varie de « pas amer » à « trop amer », en passant par « amère » qui est intermédiaire. Le test organoleptique montre que toutes les accessions de *V. amygdalina* sont amères (Tableau XII).

Tableau XI. Traits qualitatifs de distinction des accessions de *Vernonia*.

Espèces	Morphotypes	Couleur des fleurs	Couleur des feuilles	Goût
<i>V. amygdalina</i>	VAA	Blanche	Vert sombre	Amère
	VALF	Blanche	Vert claire	Amère
<i>V. calvoana</i>	VCAB	Blanche	Vert sombre	Amère
	VCAV	Violacée	Vert sombre	Trop amère
	VCSV	Violacée	Vert claire	Pas amère
	VCSB	Blanche	Vert claire	Pas amère

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

#### III.1.2.3.6.2. Analyse en correspondance multiples (ACM) des traits qualitatifs

L'analyse de correspondances multiples (ACM) montre que les deux premiers axes expliquent 67,90 % des variations, soit plus de la moitié de la variation totale au sein du matériel végétal (Tableau XIII). Les trois traits qualitatifs à savoir, le goût (88 %), la couleur des fleurs (64,9 %) et la couleur des feuilles (50,8 %) sont positivement et fortement corrélés à la dimension 1 (Tableau XIV, Fig. 55). Le goût (87,8 %) est fortement et positivement corrélé à la dimension 2. Des trois traits qualitatifs étudiés, le goût est donc le caractère le plus discriminant des accessions de *Vernonia* parce qu'il est fortement corrélé aux deux dimensions à plus de 85 %.

Tableau XII. Inertie associée aux valeurs propres des variables qualitatives.

Dimensions	Cronbach's Alpha	Variances		
		Total (valeurs propres)	Inertie	% de Variance
1	0,764	2,037	0,679	67,904
2	0,461	1,443	0,481	48,104
Total		3,480	1,160	
Moyenne	0,638 <sup>a</sup>	1,740	0,580	58,004

a. La valeur moyenne de l'Alpha Cronbach est basée sur la moyenne des valeurs propres.

Tableau XIII. Mesures discriminatives des caractères qualitatifs dans le 1<sup>er</sup> plan factoriel.

	Dimensions		Moyennes
	1	2	
Couleur fleurs	0,649	0,234	0,442
Couleur feuilles	0,508	0,331	0,419
Goût	0,880	0,878	0,879
Active Total	02,037	1,443	1,740
% de Variance	67,904	48,104	58,004

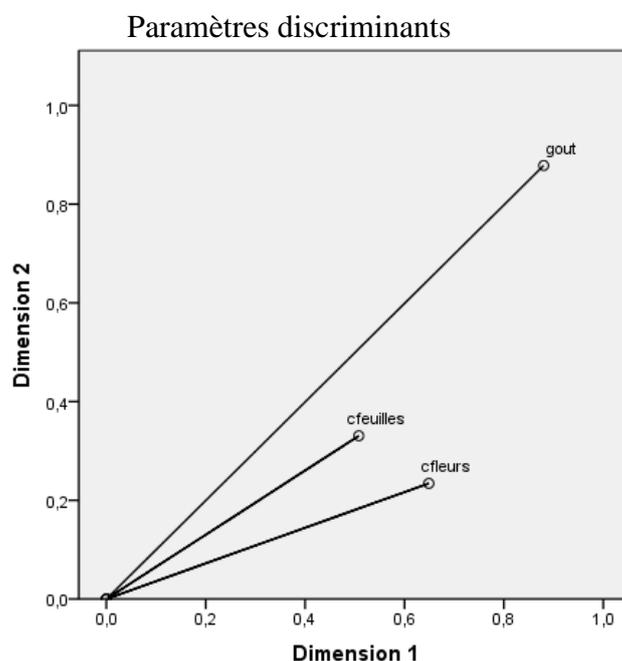


Fig. 55. Représentation des variables dans le plan factoriel 1-2.

L'ACM regroupe les morphotypes étudiés en deux grands groupes de taxons. Le dendrogramme (Fig. 56) regroupe les morphotypes VCSB et VCSV de l'espèce *V. calvoana* dans le même groupe que VAA et VALF de l'espèce *V. amygdalina*. Ce résultat permet également de confirmer le rapprochement entre les morphotypes VCAB et VCAV (pour les

traits : goût, couleurs des feuilles et des fleurs) qui appartiennent toutes deux à l'espèce *V. calvoana*.

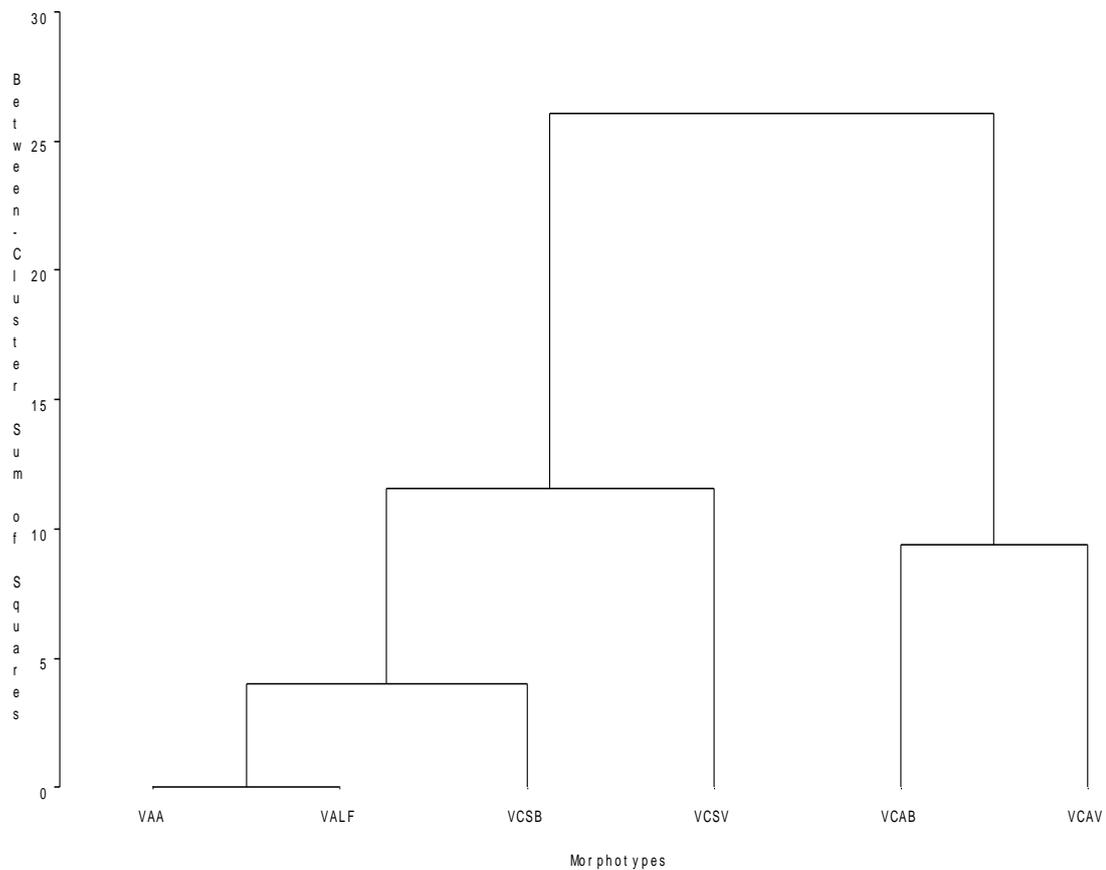


Fig. 56. Profil dendrométrique des morphotypes de *V. amygdalina* et *V. calvoana* en fonction des traits qualitatifs.

VAA : *V. amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

### III.1.2.3.6.3. Statistiques descriptives des caractères quantitatifs

L'analyse descriptive des caractères quantitatifs (Tableau XV) présente une grande variabilité en fonction des morphotypes. Les variables relevées des différents morphotypes varient de 4 - 63 % pour les taux de germination des graines, de 6 - 25 jours pour le temps de germination des graines, 3,5-40 cm pour la longueur des feuilles, 3,5 - 29,5 cm pour la largeur des feuilles, 17,73 - 786,67 cm<sup>2</sup> pour les surfaces foliaires, 7 - 210 fleurons par capitule, 40-90 % du taux de débourrement, 10 - 127 feuilles par plant, 180 - 596 jours pour la durée du cycle végétatif, 16 - 210 cm pour la hauteur du plant.

Les diamètres des pollens acétolysés varient de : 44,12-72,65 µm pour les diamètres polaires et de 41,40 - 69,40 µm pour les diamètres équatoriaux. En ce qui concerne le goût des feuilles, les proportions vont de 40 à 76,19 % de suffrages pour un avis, tandis-que pour la couleur, 38 à 74 % d'avis ont contribué à déterminer la couleur des feuilles d'un morphotype donné.

Tableau XIV. Statistiques descriptives des traits quantitatifs des accessions de *Vernonia*.

Variabiles	Moyennes	Ecart types	Minimum	Maximum	Variance	Coefficient de variation
% Germination	30,78	17,34	4,00	63,00	300,65	29,86
Temps germination	14,89	5,44	6,00	25,00	29,63	22,16
Longueur feuille	19,93	11,03	3,50	40,00	121,76	12,64
Largeur feuille	10,15	7,73	3,50	29,50	59,73	20,52
Surface feuille	181,55	220,76	17,73	786,67	48735,80	38,06
Nombre fleurs	101,11	70,57	7,00	210,00	4980,11	13,76
% Débourrement	62,78	17,76	40,00	90,00	315,36	13,54
Nombre feuilles	68,78	41,87	10,00	127,00	1753,36	15,02
Durée cycle	278,72	147,10	180,00	596,00	21637,51	4,98
Hauteur tige	80,18	72,48	16,00	210,00	5252,67	14,14
DE pollen	56,98	9,78	41,40	69,40	95,66	5,26
DP pollen	60,65	9,58	44,12	72,65	91,72	5,78

DE : Diamètre Equatorial ; DP : Diamètre Polaire.

#### III.1.2.3.6.4. Analyse de variance des traits quantitatifs

La structuration des moyennes des variables quantitatives étudiées est présentée (Tableau XVI). Les différences très significatives ( $p < 0,001$ ) sont observées entre les morphotypes pour toutes les variables, à l'exception du temps de germination. En effet, pour cette variable, les taxons diffèrent significativement les uns des autres ( $P < 0,01$ ). Globalement, les graines de *Vernonia calvoana* germent significativement mieux comparées à celles de *V. amygdalina*, le meilleur taux de germination (52 %) étant obtenu chez le morphotype VCAV. L'apparition de la radicule est significativement plus rapide chez *V. calvoana* que chez *V. amygdalina*. Ainsi la germination (temps de germination) est deux fois plus rapide chez le morphotype VCSB de *V. calvoana* que chez les morphotypes de *V. amygdalina* (Tableau XVI). Les feuilles de VALF sont très significativement plus larges que celles des autres morphotypes. La surface foliaire de ce dernier est également la plus importante. Le nombre de fleurs des morphotypes de *V. calvoana* est au moins 15 fois plus élevé que celui des morphotypes de *V. amygdalina*. Les boutures des morphotypes de *V. amygdalina* débourent 1,7 fois mieux que ceux de *V. calvoana* et ses tiges sont 7 fois plus hautes que celles de *V. calvoana*. Comparés au morphotype VALF de *V. amygdalina*, les morphotypes de *V. calvoana* ont un nombre de feuilles 7 à 10 fois plus important (Tableau XVI). Le cycle des

morphotypes de *V. amygdalina* est plus long que celui de ceux de *V. calvoana*. Les dimensions des pollens sont statistiquement identiques au sein de chaque espèce. Cependant les dimensions des pollens des morphotypes de *V. calvoana* sont significativement plus importantes que celles des morphotypes de *V. amygdalina*.

Tableau XV. Valeurs moyennes des variables en fonction de chaque morphotype.

Paramètres	Espèces de <i>Vernonia</i>						P
	<i>V. amygdalina</i>		<i>V. calvoana</i>				
	VAA	VALF	VCAB	VCAV	VCSV	VCSB	
%Germination	35,33±4,16 abc	8,67±4,16 d	15,33±13,45 dc	52,00±13,45 a	43,67±13,05 ab	29,67±10,50 bc	0,001**
Temps germination	22,00±3,00 a	18,67±2,08 ab	11,67±4,93 bc	16,67±3,70 abc	11,00±3,00 bc	9,33±2,08 c	0,003*
Longueur feuille	11,87±1,52 c	35,97±3,65 a	25,80±2,91 b	27,70±2,48 b	11,73±0,93 c	6,50±2,65 c	0,001**
Largeur feuille	4,20±0,61 c	25,38±3,94 a	10,37±1,25 b	10,97±1,34 b	4,97±1,34 c	5,03±2,22 c	0,001**
Surface feuille	32,86±2,35 c	614,88±158,39a	179,51±39,02 b	203,90±43,53 b	38,91±11,38 c	19,26±2,01 c	0,001**
Nombre fleurs	10,00±2,00 c	9,33±2,08 c	159,00±9,64 a	180,67±26,95 a	121,67±11,06 b	126,00±14,53 b	0,001**
%Débourrement	83,33±5,77 a	86,67±5,77 a	53,33±5,77 b	53,33±11,54 b	50,00±10,00 b	50,00±10,00 b	0,001**
Nombre feuilles	17,67±2,51 c	12,00±2,64 c	72,00±4,00 b	102,67±14,22 a	106,33±8,15 a	102,00±8,89 a	0,001**
Durée cycle	367,67±17,62	565,33±28,38	182,33±2,52	191,33±2,31	185,00±5,00	190,67±1,15	0,001**
Hauteur tige	168,33±12,06 a	168,67±22,55 a	24,43±9,23 b	32,33±3,06 b	33,50±4,33 b	33,83±2,02 b	0,001**
DE pollen	45,13±3,13 b	43,20±1,91 b	62,30±2,05 a	65,67±3,61 a	64,32±3,71 a	61,24±3,08 a	0,001**
DP pollen	49,54±4,46 b	47,21±4,37 b	64,54±1,73 a	68,77±4,14 a	68,73±3,09 a	65,13±2,28 a	0,001**

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 5% des tests de Student et Newman-Keuls. P : probabilité, \* : significative (p<0,05), \*\* : très significative (p<0,01), \*\*\* : très hautement significative (p<0,001).

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs ; DE : Diamètre Equatorial ; DP : Diamètre Polaire.

### III.1.2.3.6.5. Test de Corrélation

La matrice de corrélation de Pearson est utilisée afin d'établir d'éventuelles relations entre les variables quantitatives (Tableau XVII). La durée du cycle est positivement et très significativement ( $P < 0,01$ ) corrélée au temps de germination ( $r^2=0,59$ ), à la largeur des feuilles ( $r^2=0,74$ ), à la surface foliaire ( $r^2=0,76$ ) et au pourcentage de débourrement ( $r^2=0,86$ ). Cependant, la durée du cycle est négativement et très significativement corrélée au nombre de fleurons ( $r^2= -0,85$ ) et au nombre de feuilles ( $r^2= -0,86$ ).

Les dimensions des pollens sont positivement et très significativement ( $P < 0,01$ ) corrélées au nombre de feuilles et au nombre de fleurons. Le diamètre équatorial des pollens est positivement et très significativement ( $P < 0,01$ ) corrélé au nombre de feuilles ( $r^2= 0,90$ ), et au nombre de fleurons ( $r^2=0,89$ ). Le diamètre polaire des pollens est positivement et très significativement ( $P < 0,01$ ) corrélé au nombre de feuilles ( $r^2=0,90$ ), et au nombre de fleurons ( $r^2=0,86$ ). Cependant, les dimensions des pollens (diamètre équatorial et diamètre polaire) sont négativement et très significativement corrélées au pourcentage de débourrement ( $r^2= -0,92$  et  $r^2= -0,89$  respectivement), à la hauteur des tiges ( $r^2=-0,94$  et  $r^2= -0,93$  respectivement).

Tableau XVI. Test de corrélation entre les traits distinctifs des accessions de *Vernonia*. DE : diamètre équatorial, DP : diamètre polaire, . \* : significative ( $p < 0,05$ ), \*\* : très significative ( $p < 0,01$ ), \*\*\* : très hautement significative ( $p < 0,001$ ).

	%germ	tpsgerm	lfile	lfiles	Surfile	nfleurs	%deb	nfiles	dcycle	htige	Depol	Dppol
%germination	1	-0,03	-0,39	-0,57*	-0,04*	0,33	-0,48*	0,53*	-0,53*	-0,37	0,52*	0,54*
Temps de germination		1	0,30	0,24	0,28	-0,61**	0,72**	-0,70**	0,59**	0,69**	-0,57*	-0,55*
Longueur des feuilles			1	0,87**	0,88**	-0,05	0,34	-0,36	0,51*	0,30	-0,24	-0,28
Largeur des feuilles				1	0,99**	-0,32	0,50*	-0,49*	0,74**	0,50*	-0,48*	-0,50*
Surface foliaire					1	-0,35	0,53*	-0,51*	0,76**	0,53*	-0,49*	-0,52*
Nombre de fleurs						1	-0,81**	0,87**	-0,85**	-0,94**	0,89**	0,86**
% de débourrement							1	-0,86**	0,86**	0,90**	-0,92**	-0,89**
Nombre de feuilles								1	-0,86**	-0,91**	0,90**	0,90**
Durée du cycle									1	0,92**	-0,89**	-0,87**
Hauteur de la tige										1	-0,94**	-0,93**
DE pollen											1	0,98**
DP pollen												1

La hauteur des tiges est positivement et très significativement ( $P < 0,01$ ) corrélée au temps de germination ( $r^2=0,69$ ), à la durée du cycle ( $r^2=0,92$ ) et au pourcentage de débourrement ( $r^2=0,90$ ). Cependant, la durée du cycle est négativement et très significativement corrélée au nombre de fleurons ( $r^2= -0,85$ ) et au nombre de feuilles ( $r^2= 0,86$ ). Par ailleurs, la matrice de corrélation met en évidence de façon très significative ( $P < 0,01$ ) une corrélation négative entre la variable hauteur de la tige et les variables nombre de fleurons ( $r^2= -0,94$ ) et nombre de feuilles ( $r^2= -0,91$ ).

### III.1.2.3.6.6. Analyse en composantes principales des traits quantitatifs

Le critère de Kaiser stipule que les axes dont les valeurs propres sont supérieures à 1 doivent être retenus. D'après ce critère, les deux premiers axes sont conservés. Leurs valeurs propres sont respectivement 8,58 et 2,21 (Tableau XVIII). Ces deux axes représentent 89,98 % de la part d'information, soit plus de la moitié de la variation totale au sein du matériel végétal. Seuls ces deux principaux axes sont présentés. Selon le critère du coude, les deux premiers axes sont également conservés. Pour ce dernier critère, sur l'éboulis des valeurs propres, on observe un décrochement (coude) suivi d'une décroissance régulière et on sélectionne les axes avant le décrochement.

Tableau XVII. Valeurs propres obtenues des quatorze variables analysées.

Valeurs propres de la matrice de corrélation				
	Valeurs propres	Différence	Proportion	Cumulative
1	8,5843	6,3714	0,7154	0,7154
2	2,2129	1,3054	0,1844	0,8998
3	0,9075	0,6311	0,0756	0,9754
4	0,2763	0,2573	0,0230	0,9984
5	0,0190	0,0190	0,0016	1,0000
6	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
7	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
8	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
9	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
10	-0,0000	0,0000	-0,0000	1,0000
11	-0,0000	0,0000	-0,0000	1,0000
12	-0,0000	0,0000	-0,0000	1,0000

Plus la valeur est proche de 1, meilleure est la représentation. Les variables durée du cycle (97,68 %), pourcentage du débourrement (97,25 %), hauteur de la tige (96,26 %), temps de germination (76,50 %), surface foliaire (72,28 %), largeur de la feuille (69,44 %) et longueur de la feuille (51,45 %) sont positivement corrélées à l'axe 1 (Tableau XIX, Fig. 57). Le diamètre polaire des pollens (-96,67 %), le diamètre équatorial des pollens (-95,72 %), le nombre de feuilles (-88,09 %) et le pourcentage de germination (-59,69 %) sont négativement corrélés à l'axe 1. La longueur de la feuille (77,43 %), la largeur de la feuille (70,29 %) et la surface foliaire (67,29 %), sont positivement corrélées à l'axe 2 (Tableau XIX, Fig. 57). L'axe 1 renseigne sur les traits du pollen, les paramètres de germination et l'architecture de la plante

(Tableau XIX). Les dimensions des feuilles de vernonie (la longueur de la feuille, la largeur de la feuille et la surface foliaire) sont positivement corrélées aux deux principaux axes.

Cependant, les variables : durée du cycle, hauteur de la tige, pourcentage de débourrement des tiges, dimension des pollens, nombre de feuilles et de fleurs sont fortement corrélées à près de 90 % à l'axe 1. Ces variables peuvent être considérées comme les principaux critères discriminants des Vernonies.

Tableau XVIII. Coefficients des vecteurs associés aux deux premiers axes.

Traits étudiés	Facteur1	Facteur2
% Germination	-0.59687	-0.38292
Temps de germination	0.76497	-0.29864
Longueur des feuilles	0.51449	0.77434
Largeur des feuilles	0.69438	0.70289
Surface foliaire	0.72283	0.67291
Nombre de fleurs	-0.88091	0.40594
% Débourrement	0.97245	-0.21533
Nombre de feuilles	-0.95925	0.16763
Durée du cycle	0.97680	0.07306
Hauteur des tiges	0.96264	-0.25250
Diamètre équatorial des pollens	-0.95723	0.26901
Diamètre polaire des pollens	-0.96671	0.22339

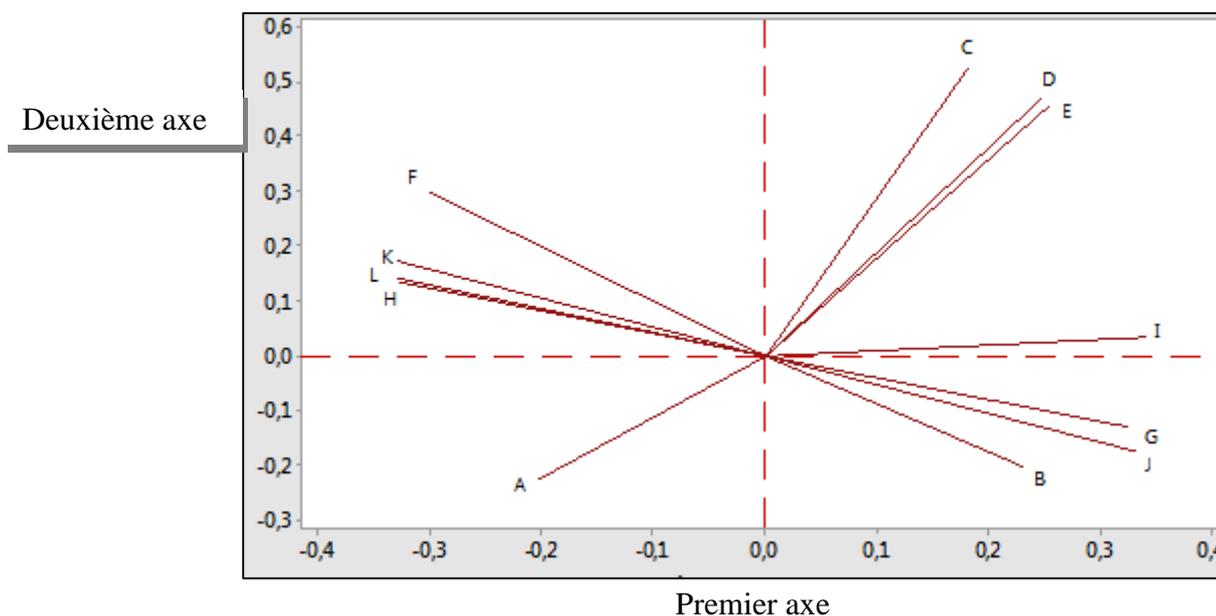


Fig. 57. Représentation des variables quantitatives dans le plan factoriel 1-2. % germination =A, temps de germination=B, Longueur feuille=C, largeur feuille=D, Surface feuille=E, Nombre fleurs=F, % débourrement=G, Nombre feuilles =H, Durée cycle=I, Hauteur tige=J, Diamètre equatorial pollen= K, Diamètre polaire pollen=L.

Pour mieux apprécier la diversité agro-morphologique des principaux morphotypes de Vernonie au Cameroun, une classification ascendante hiérarchique (CAH) a permis d'avoir un

dendrogramme qui regroupe les morphotypes en des classes statistiquement homogènes sur la base des 12 paramètres quantitatifs évalués (Fig. 58). Le dendrogramme montre deux grands groupes de Vernonies dits similaires: le groupe de *V. amygdalina* avec une faible base génétique et le groupe des *V. calvoana* avec une base génétique plus large. Le groupe des *V. calvoana* est subdivisé en deux sous-groupes :

- le sous-groupe des *V. calvoana* à feuilles amères (VCAB et VCAV) ;
- le sous-groupe des *V. calvoana* à feuilles non amères (VCSB et VCSV).

Le groupe des *V. amygdalina* compte 2 morphotypes :

- Le morphotype amer à petites feuilles (VAA) ;
- Le morphotype amer à large feuilles (VALF).

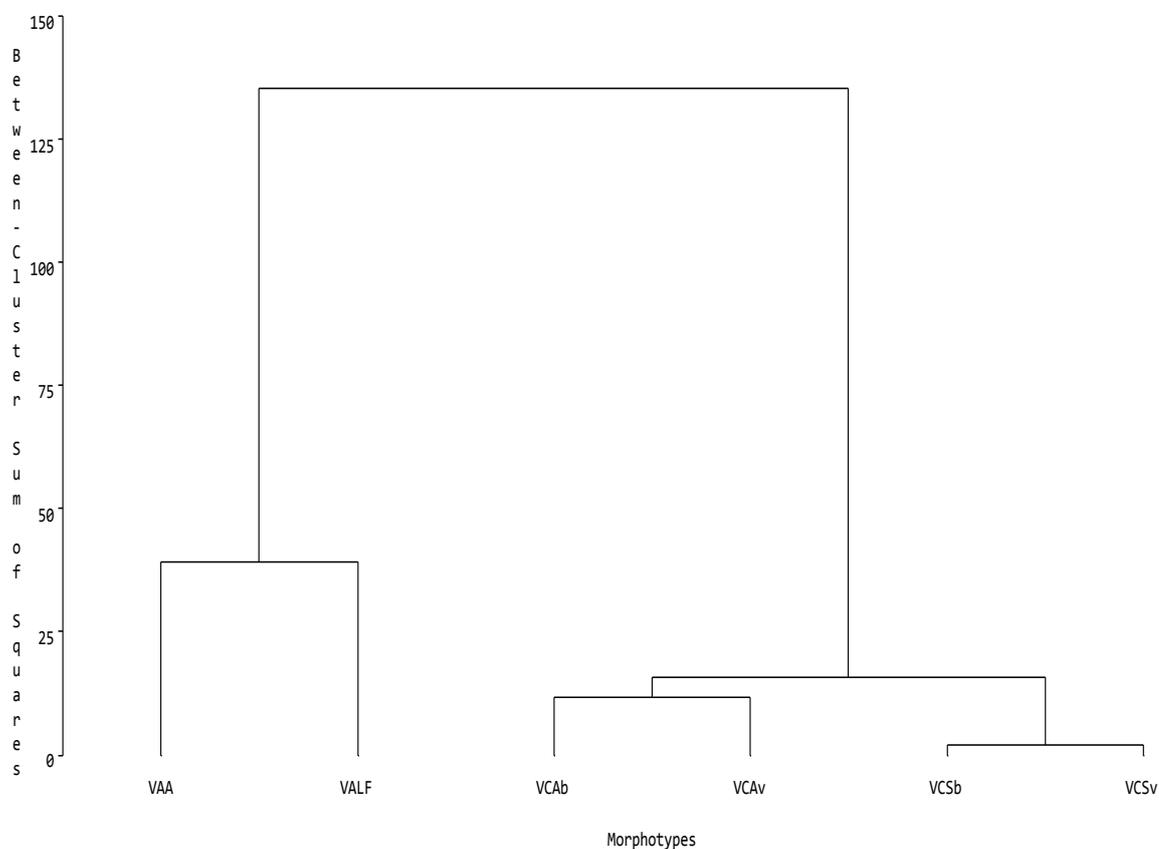


Fig. 58. Dendrogramme des morphotypes de *Vernonia* sur la base de 14 traits quantitatifs.

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

### III.1.3. Différentiation chimiotaxonomique de *Vernonia* spp.

Les résultats des tests qualitatifs mettent en évidence la présence des phénols, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits des six génotypes étudiés.

### III.1.3.1. Concentration des grands groupes métaboliques

La teneur en phénols totaux dans les extraits bruts de feuilles varie entre  $138,1 \pm 7,4^c$  et  $206,1 \pm 3,12^a$  mg/g d'extrait sec (Tableau XX). Les résultats montrent que tous les génotypes étudiés sont riches en phénols. Le génotype VAA est plus riche en phénols avec  $206,1 \pm 3,12^a$  mg/g d'extrait sec, suivi de VCAV ( $197,9 \pm 18,03^a$  mg/g) de la même espèce. L'analyse de variance montre une variation de la teneur en phénols au seuil 1 % en fonction des morphotypes. On peut classer les différents morphotypes par ordre décroissant de leurs teneurs en phénols ainsi qu'il suit : VCSB, VCAV, VAA, VALF, VCAB et VCSV (Fig. 58).

Les teneurs en flavonoïdes totaux varient en fonction du morphotype au seuil de significativité 5 %. Elles sont comprises entre  $81,6 \pm 7,21^b$  mg/g et  $132,8 \pm 31,5^a$  mg/g d'extrait sec. Les plus faibles teneurs en flavonoïdes sont celles de VCSV et VCSB. Une classification des différents morphotypes peut être établie en fonction de leurs teneurs en flavonoïdes. C'est ainsi que par ordre décroissant de leurs teneurs en flavonoïdes, on a : VCAB, VCAV, VAA, VALF, VCSB et VCSV (Fig. 59).

Les tanins sont présents dans tous les extraits analysés. La teneur en tanins varie de  $56,3 \pm 4,08$  mg/g pour VCSV à  $97,8 \pm 23,8$  mg/g d'extrait sec pour VCAB. La teneur en tanins permet de différencier les taxons ( $P < 0,05$ ). Elle permet de les classer par ordre décroissant de leurs teneurs en tanins ainsi qu'il suit : VCAB, VCAV, VAA, VALF, VCSB et VCSV (Fig. 59).

Tableau XIX. Teneur des extraits de feuilles des morphotypes en métabolites secondaires.

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

Espèces	Teneurs en métabolites (mg/g d'extrait sec)			
	Morphotypes	Phénols totaux	Flavonoïdes	Tanins totaux
<i>V. amygdalina</i>	VAA	$188,7 \pm 5,05^{ab}$	$109,2 \pm 14,4^{ab}$	$72,4 \pm 4,3^{ab}$
	VALF	$167,8 \pm 6,7^b$	$103,9 \pm 19,4^{ab}$	$71,8 \pm 5,7^{ab}$
<i>V. calvoana</i>	VCAB	$166,3 \pm 30,1^b$	$132,8 \pm 31,5^a$	$97,8 \pm 23,8^a$
	VCAV	$197,9 \pm 18,03^a$	$110,2 \pm 22,1^{ab}$	$87,4 \pm 36,07^{ab}$
	VCSB	$206,1 \pm 3,12^a$	$86,1 \pm 21,2^b$	$66,2 \pm 1,2^{ab}$
	VCSV	$138,1 \pm 7,4^c$	$81,6 \pm 7,21^b$	$56,3 \pm 4,08^b$

Le goût (Tableau XXI) est très significativement ( $P < 0,05$ ) corrélé aux teneurs en flavonoïdes ( $r^2 = -0,67$ ) et significativement corrélé aux teneurs en tanins ( $r^2 = -0,48$ ). Le goût n'est pas corrélé à la teneur en phénols ( $r^2 = 0,18$ ).

Tableau XX. Corrélations entre le goût des feuilles et les teneurs en métabolites.

	Goût	Phénols	Flavonoïdes	Tanins	Sucres	Protéines
Goût	1	-0,01	-0,67**	-0,48*	0,14	0,03
Phénols		1	0,18	0,26	0,49*	-0,50*
Flavonoïdes			1	0,89***	-0,17	0,09
Tanins				1	-0,27	0,18
Sucres					1	-0,34
Protéines						1

\*Significatif au seuil 5% ; \*\*Très significatif au seuil 5%, \*\*\* : Très hautement significatif au seuil 5%

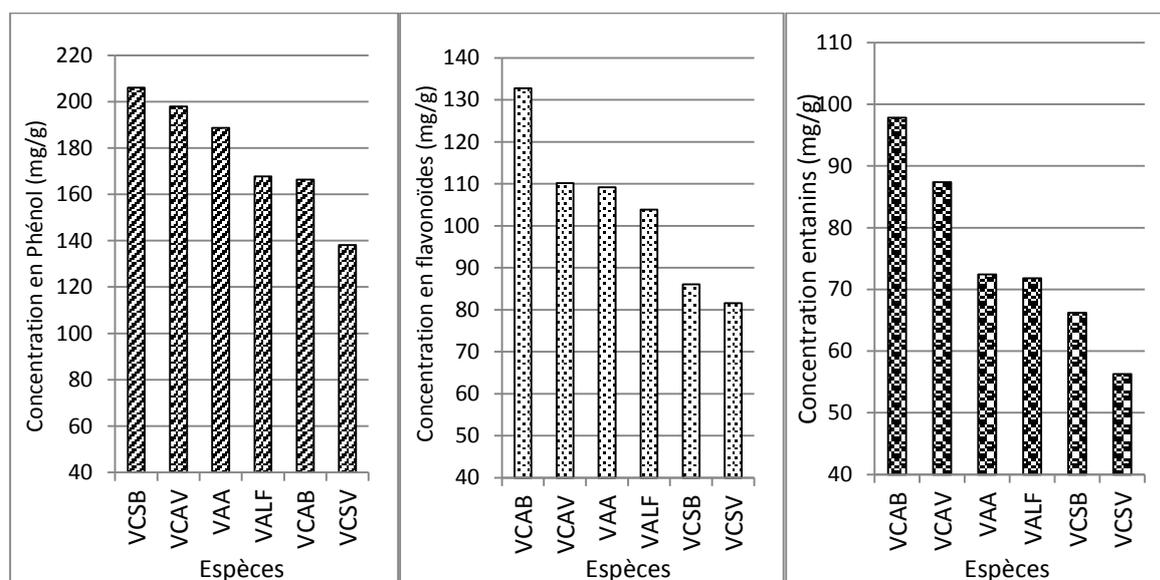


Fig. 59. Classement des accessions de *Vernonia* en fonction de leurs teneurs décroissantes en métabolites secondaires.

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

Les teneurs en métabolites primaires dans les accessions de *Vernonia* sont présentées dans le tableau XXII. Il existe une variabilité entre les teneurs en protéines totales et en sucres solubles totaux des différents morphotypes de vernonies. VCSV ( $145,98 \pm 5,16 \text{ mg/g}$ ) est le morphotype le plus riche en protéines totale tandis-que VAA ( $74,55 \pm 0,62 \text{ mg/g}$ ) a la plus faible teneur en protéines totales. VAA et VCSB contiennent les plus fortes teneurs en sucres solubles totaux,  $134,4 \pm 33,3 \text{ mg/g}$  et  $128,6 \pm 2,5 \text{ mg/g}$  respectivement. Les morphotypes VALF, VCAB, VCAV et VCSV ont relativement les mêmes teneurs en sucres solubles totaux. Les teneurs en protéines totales sont relativement les même pour VALF, VCAV et VCAB. La composition en métabolites primaires (protéines totales et sucres totaux) ne dépend pas du morphotype de vernonie choisi. Le test de corrélation de Pearson montre qu'il n'existe pas de corrélation entre le goût et les teneurs en sucres et en protéines des feuilles.

Tableau XXI. Teneurs des extraits des feuilles de vernonies en métabolites primaires.

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

Espèces	Teneur en métabolites (mg/g d'extrait sec)		
	Morphotypes	Protéines totales	Sucres totaux
<i>V. amygdalina</i>	VAA	74,55 ± 0,62 <sup>b</sup>	134,4 ± 33,3 <sup>b</sup>
	VALF	93,34 ± 0,61 <sup>c</sup>	104,8 ± 11,8 <sup>a</sup>
<i>V. calvoana</i>	VCAB	93,84 ± 4,21 <sup>c</sup>	80,8 ± 24,3 <sup>a</sup>
	VCAV	93,20 ± 2,80 <sup>c</sup>	93,6 ± 2,8 <sup>a</sup>
	VCSB	53,46 ± 2,90 <sup>a</sup>	128,6 ± 2,5 <sup>b</sup>
	VCSV	145,98 ± 5,16 <sup>d</sup>	100,2 ± 4,8 <sup>a</sup>

### III.1.3.2. Caractérisation des vernonies en fonction de leurs compositions en métabolites par la HPLC/MS

La composition chimique des feuilles de *V. amygdalina* et *V. calvoana* varie en fonction des morphotypes étudiés, 6 sur la base des 18 standards utilisés pour cette étude chimiotaxonomique (Tableau XXIII ; Fig. 60).

Tableau XXII. Contenu en polyphénols des différents morphotypes de vernonies. VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs. QND: Quantités Non Déterminées (détectées mais non quantifiable).

Composés	Contenu en polyphénols (µg/ml d'extrait sec)					
	VAA	VALF	VCAB	VCAV	VCSB	VCSV
Acide caftarique	-	-	-	-	-	-
Acide gentisique	-	QND	-	-	-	-
Acide cafeique	-	-	-	-	-	-
Acide chlorogénique	4,40	8,33	13,99	89,86	7,12	24,56
Acide p-cumarique	-	-	-	QND	-	-
Acide ferulique	-	-	-	-	-	-
Acide sinapique	-	-	-	-	-	-
Hyperozide	-	-	-	QND	-	-
Isoquercitrine	-	QND	-	-	-	1,28
Rutine	-	-	-	-	-	-
Miricetole	-	-	-	-	-	-
Fisetine	-	-	-	-	-	-
Quercitrine	QND	QND	0,37	18,88	QND	QND
Quercetol	1,44	1,61	QND	2,37		1,22
Patuletine	-	-	-	-	-	-
Luteoline	5,79	5,03	3,579	11,95	2,13	2,89
Kaempferol						
Apigénine	10,48	4,40	0,97	1,07	0,73	QND

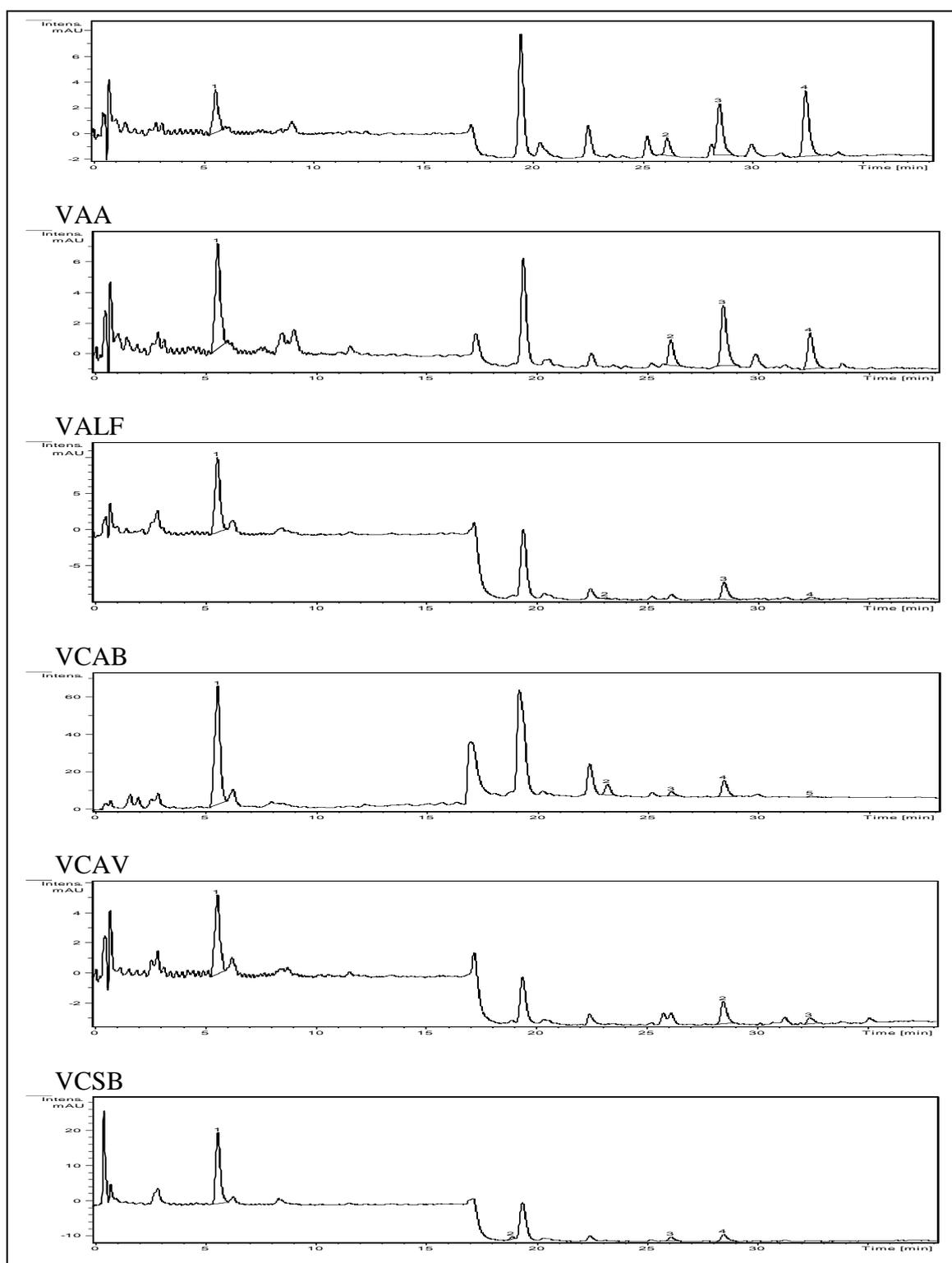


Fig. 60. Chromatogrammes des dix-huit phénols des morphotypes analysés.

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs ; (1) acide caftarique ; (2) acide gentérique ; (3) acide cafeïque ; (4) acide chlorogénique ; (5) acide p-coumarique ; (6) acide ferulique ; (7) acide cinapique ; (8) hyperoside ; (9) isoquercétrine ; (10) Rutine ; (11) miricetol ; (12) fisetine ; (13) quercétine ; (14) quercetol ; (15) patuletine ; (16) luteoline ; (17) kaemferol ; (18) apigénine.

L'acide chlorogénique et la lutéoline sont les seuls composés présents dans tous les extraits de feuilles. Ils peuvent être considérés comme des traceurs chimiotaxonomiques de ces deux espèces. Cependant, la concentration la plus élevée d'acide chlorogénique est relevée pour VCAV (89,86 µg/ml) et le plus bas chez VAA (4,40 µg/ml). Le morphotype VCAV a aussi la teneur la plus élevée en lutéoline (11,95 µg/ml) et VCSB la plus faible teneur (2,13 µg/ml).

L'isoquercétine n'est présente de façon quantifiable que chez VCSV (1,28 µg/ml). Ce morphotype ne contient de l'apigénine qu'à l'état de trace. Ces deux éléments constituent un trait caractéristique du morphotype VCSV.

La quercétine se trouve à des doses quantifiables dans les morphotypes VCAV (18,87 µg/ml) et VCAB (0,37 µg/ml). Le morphotype VCAV possède donc les teneurs les plus élevées en quercétine, acide chlorogénique et lutéoline. Elle présente ainsi la plus grande diversité en polyphénol avec 7 composés détectés dans ses extraits dont 5 quantifiables et 2 présents à l'état de trace. Le morphotype le moins riche en métabolites est VCSB contenant 4 polyphénols parmi les 18 analysés dont 1 présent à l'état de trace. Ce sont : l'acide chlorogénique (7,12 µg/ml), la lutéoline (2,13 µg/ml), l'apigénine (0,73 µg/ml) et la quercétine (en trace).

Les molécules qui n'ont été trouvées dans aucun extrait sont : l'acide caftarique, l'acide cafeïque, l'acide ferulique, l'acide sinapique, la rutine, le miricetol, la fisetine, la patuletine et le kaemferol.

#### **III.1.4. Propriétés antimicrobiennes des extraits de feuilles de *Vernonia* spp.**

Les feuilles de *Vernonia amygdalina* et *V. calvoana* ont un potentiel antibactérien (Tableau XXIV, Fig. 61). Les extraits étudiés n'auraient à priori eu aucune activité sur les trois souches de levures mais ont présentés des activités variés sur les souches de bactéries en fonction des morphotypes.

En effet, VAA a présenté les activités sur toutes les souches bactériennes avec pour diamètres d'inhibition  $7,5 \pm 0,70^a$  ;  $7 \pm 0,00^a$  ;  $8 \pm 0^a$  mm respectivement sur *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumonia* et *Streptococcus aureus*. VALF, VCAB, VCAV et VCSV ont eu des activités uniquement sur la souche *K. pneumonia* avec des diamètres d'inhibition respectifs de  $7,5 \pm 0,7^a$  ;  $8,5 \pm 0,70^a$  ;  $4 \pm 1,73^b$  et  $6,88 \pm 0,70^a$  mm. VCSB agit sur *S. enterica* avec un diamètre d'inhibition de  $7,5 \pm 0,70^a$  mm.

Tableau XXIII. Diamètres d'inhibition des extraits des vernonies sur les bactéries et les levures.

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB : *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

Codes des extraits	Diamètres d'inhibition (mm)					
	Bactéries			Levures		
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC NR4311	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC NR41916	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC NR50003	<i>Candida albicans</i> ATCC P37037	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
VAA	7,5±0,70 <sup>a</sup>	7±0 <sup>a</sup>	8±0 <sup>a</sup>	0±0	0±0	0±0
VALF	0±0 <sup>b</sup>	7,5±0,70 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0	0±0	0±0
VCAB	0±0 <sup>b</sup>	8,5±0,70 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0	0±0	0±0
VCAV	0±0 <sup>b</sup>	4±1,73 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0	0±0	0±0
VCSB	7,5±0,70 <sup>a</sup>	0±0 <sup>c</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0	0±0	0±0
VCSV	0±0 <sup>b</sup>	6,88±0,70 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0	0±0	0±0
Chlorempnénicol	26±1,41	11±1,41	22±2,82	-	-	-
Fluconazol	-	-	-	15±0	16,5±2,12	19±1,41



Fig. 61. Exemple d'illustration des diamètres d'inhibition de l'extrait de *Vernonia* obtenu par la méthode des disques.

Au milieu du disque : le témoin (Fluconazol / Chlorempnénicol), aux extrémités : les extraits de *Vernonia*.

Les souches de levures et de bactéries sont toutes sensibles aux six extraits de *Vernonia*. Les résultats obtenus (Tableau XXV) montrent que les extraits de tous les morphotypes étudiés sont sources de substances chimiques antibiotiques et fongicides inhibitrices de la croissance. Les valeurs des CMI varient de 12,5 à plus de 50 mg/ml d'extrait brut. A dose relativement faible (25 mg/ml), les extraits de VAA et VCAV inhibent la croissance de *S. enterica*, *K. pneumoniae* et *S. aureus*.

Tableau XXIV. Concentrations minimales inhibitrices des extraits de vernonies.

VAA : *Vernonia amygdalina* amer ; VALF : *V. amygdalina* large feuilles ; VCAB : *V. calvoana* amer à fleurons blancs ; VCAV : *V. calvoana* amer à fleurons violacés ; VCSV : *V. calvoana* sucré à fleurons violacés ; VCSB: *V. calvoana* sucré à fleurons blancs.

Codes des extraits	CMI (mg/ml)					
	Bactéries			Levures		
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC NR4311	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC NR41916	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC NR50003	<i>Candida albicans</i> ATCC P37037	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
VAA	25	25	25	50	50	>50
VALF	>50	>50	25	50	>50	>50
VCAB	>50	>50	>50	>50	>50	>50
VCAV	25	25	25	>50	50	>50
VCSB	50	25	12,5	25	>50	25
VCSV	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Chloremphénicol	0,0039	0,0625	0,0156			
Fluconazol				0,0625	0,625	0,0625

La plus petite CMI est obtenue avec les extraits de VCSB sur la souche de *Staphylococcus aureus*. Le même morphotype VCSB, testé à 25 mg/ml sur les souches de *Candida albicans* et de *Candida krusei* permet une inhibition de la croissance de ces dernières levures.

## III.2. DISCUSSION

### III.2.1. Distribution des espèces de *Vernonia*

Les *Vernonia* médicinaux ont une aire de distribution qui couvre l'étendue du territoire camerounais. Ce résultat est conforme à la littérature (Biholong, 1986) qui souligne que *V. amygdalina* pousse en forêt secondaire, près des villages ou dans les jachères des zones forestières et des savanes péri-forestières. Il est en effet adapté à diverses conditions climatiques. *V. amygdalina* est largement répandu au Cameroun (Farombi et Owoeye, 2011 ; Agbogidi & Akpomorine, 2013), aussi bien au Noun dans la Région de l'Ouest (Moundipa et al., 2000) que dans les Régions du Sud, Sud-Ouest, Nord-Ouest, Est, Nord, Extrême Nord, Adamaoua, Littoral et Centre. Plusieurs auteurs ont également noté la présence de *V. guineensis* au Cameroun (Tchinda et al., 2002; Noumi, 2010 ; Sobrinho et al., 2015). *Vernonia colorata*, *V. conferta* et *V. glabra* n'ont été répertoriés que dans la zone des hauts plateaux de l'Ouest, la zone de la forêt humide à pluviométrie monomodale et la zone de forêt humide à pluviométrie bimodale. En effet, *V. colorata* est un arbuste originaire de l'Afrique et spécialement rencontré au Cameroun, en Côte d'Ivoire, au Sénégal, au Togo, en Afrique du Sud et au Bénin (Sy et al., 2008 ; Chukwujekwu et al., 2009). *V. ambigua* et *V. auriculifera*

sont particulièrement retrouvés au Cameroun (Burkill, 1985 ; Builders et *al.*, 2011). Focho et *al.* (2009) ont noté la présence de *V. auriculifera* dans les hautes terres de Lebialem (Région du Sud-Ouest).

Excepté *Vernonia amygdalina* qui est distribué sur toute la superficie du Cameroun les *Vernonia* comestibles (*V. conferta* et *V. colorata*) ne sont répandues que dans la zone des hauts plateaux de l'Ouest, la zone de la forêt humide à pluviométrie monomodale et la zone de forêt humide à pluviométrie bimodale. L'utilisation des feuilles de *V. colorata* au Cameroun comme légumes dans la réalisation des mets a été signalé par Sy et *al.* (2005).

La formation d'altitude humide et ilot subalpin est la zone phytogéographique qui regorge la plus grande diversité des *Vernonia*. Le climat de type camerounien d'altitude serait favorable au développement des *Vernonia*. On trouve aussi dans cette zone une diversité des formes de relief qui influencerait sur la variabilité génétique du genre. En plus, l'eau est une des exigences essentielles pour le développement de certaines espèces tel que *V. calvoana* (Shippers, 2004). La formation d'altitude humide et ilot subalpin est très pluvieuse avec 1 500 à 2000 mm de pluie par an (Anonyme, 2008). La faible diversité des *Vernonia* dans la forêt atlantique et congolaise pourrait s'expliquer par la dominance d'une végétation arborescente dans laquelle la grande hauteur des arbres ne permettrait pas aux végétaux de hauteur relativement basse à moyenne comme les *Asteraceae* d'avoir accès à la lumière. Les zones de faible diversité des *Vernonia* tels que la forêt atlantique et congolaise, la formation soudanienne d'altitude, la steppe à épineux sahelo-soudanienne et la prairie inondable sahelo-soudanienne ont en commun un climat sec avec températures élevées (atteignant parfois 45° C) et une faible pluviométrie de 400 mm/an (Anonyme, 2008).

### **III.2.2. Caractérisation palynologique, organoleptique et agro-morphologique de *Vernonia* spp.**

Les pollens des *Vernonia* étudiés sont tous porés, fenêtrés, et échinulés. Ces caractères sont ceux retrouvés chez la plupart des *Astéraceae* les plus anciens dans l'évolution (Jones, 1981). L'ornementation échinulé de ces pollens adapterait ces espèces à un mode de reproduction entomophile. En effet, ce pollen échinulé est en plus recouvert d'une substance gélatineuse et blanchâtre qui le rendrait adhésif aux pattes des insectes pollinisateurs. On peut donc penser que les pollens sont libérés avant que le stigmate ne soit disposé à le recevoir (Perry & Hiron, 1967), les insectes pollinisateurs assurent la pollinisation croisée comme c'est le cas chez la plupart des *Asteraceae*. Le rôle primordial des insectes pollinisateurs est

ainsi mis en exergue. La reproduction et la préservation de *Vernonia* spp. est fortement tributaire de la protection des insectes pollinisateurs.

Le pollen de *V. amygdalina*, avec 44,30 µm peut être considéré comme un pollen de taille moyenne tandis que les pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* et ceux *V. calvoana* var. *microcephala* possèdent des pollens de grandes tailles suivant la classification de Ricciardelli (1998). On établit par le test de Fisher une différence significative entre les dimensions des pollens des quatre variétés étudiées. Ce résultat permet de confirmer qu'il existe une différence perceptible observée sur les pollens, au sein du genre *Vernonia* (Keeley & Jones, 1979), permettant de mettre en évidence une grande diversité biologique. La taille du grain de pollen peut donc être utilisée comme critère taxonomique au sein du genre *Vernonia*, avec de très faibles variations au sein de l'espèce.

Les pollens de *Vernonia* n'ont pas germé en milieu liquide, en présence ou en absence de saccharose. Ils germent pourtant en milieu solide et en atmosphère humidifiée. Ces résultats suggèrent la nécessité de la présence dans les milieux de culture de pollens de *Vernonia* de facteurs régulant les échanges d'eau entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire. La nature colloïdale de l'agar présent dans le milieu de culture limite l'entrée massive d'eau préjudiciable au processus physiologique de germination (Visser, 1955). Bair & Loomis (1941) remarquent que la sensibilité du pollen à l'eau est liée à sa capacité à germer en milieu dont la teneur en sucre est relativement élevée.

Le pic de germination est observé à 25 % de concentration en saccharose du milieu de culture, justifiant l'importance de la teneur en sucre dans la germination des pollens de *V. calvoana* var. *calvoana*, *V. calvoana* var. *microcephala*, et *V. amygdalina*. Le pouvoir germinatif des pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* à fleurs blanches en culture est optimal avec 35 % de sucre dans le milieu. Les pollens nécessitant un taux élevé en sucre dans leur milieu de culture sont généralement ceux dont les parois sont minces et fragiles (Visser R., 1955). En absence d'un taux élevé de sucre contribuant à réguler l'équilibre osmotique, un influx rapide de l'eau dans le cytoplasme cellulaire provoquerait la perte de substances solubles et des ions. Le phénomène est connu sous le nom de dommage d'imbibition (Crowe et al., 1989 ; cit. Donfack, 2004) et contribue à altérer le pouvoir germinatif du pollen.

*V. amygdalina* se distingue des trois formes appartenant à l'espèce *V. calvoana* par la capacité de son pollen à mieux germer sur milieu BK. Le pollen de *V. calvoana* germe mieux sur milieu solide HH. Ce résultat montre que la composition minéralogique du milieu de

culture influence la germination des pollens. On peut aussi voir la manifestation de l'existence d'un critère de distinction des deux espèces, preuve qu'au sein du genre, les critères de classification peuvent être nombreux et la diversité génétique très grande.

L'étude de l'influence de la température concourt à établir l'existence d'une grande diversité génétique chez *Vernonia* spp.. *V. calvoana* var. *microcephala* présente un optimum de germination à 35 °C, contrairement à toutes les autres variétés étudiées dont le pouvoir germinatif des pollens atteint son maximum à 25 °C. Sachant que les températures de près de 35 °C sont très rares dans les zones écologiques où l'on trouve *V. calvoana* var. *microcephala*, une des contraintes de la reproduction est ainsi mise en évidence. En effet, à des températures relativement élevées dans la nature, l'humidité de l'air indispensable à l'approvisionnement hydrique des pollens mis à germer est faible. Cette situation peut constituer une contrainte à la reproduction sexuée chez *V. calvoana* var. *microcephala* en même temps qu'elle peut constituer des conditions favorables à l'activité des insectes pollinisateurs. Robert et *al.* (1948) cit. Visser (1955) situent l'optimum de germination des pollens dans l'intervalle 20-30 °C. Ces données ne s'éloignent pas de celles obtenues par Donfack (2004) sur les pollens de *Cola* ou l'optimum de germination se situe à 30 °C.

Le pouvoir germinatif est important si le pollen est prélevé au stade I. La récolte à ce stade procure deux avantages : le pollen n'a pas encore perdu sa viabilité, et, recouvert par l'anthere, il n'est pas encore infesté de spores de champignons qui se développent toujours plus vite sur le milieu de culture rendant l'observation et le comptage des pollens difficiles. De plus, il n'est pas exclu de penser que le développement de ces mycètes se face au dépend de la germination des pollens.

La viabilité du pollen frais diminue avec le temps dès la récolte du capitule jusqu'à l'ensemencement. Il faut 6 à 9 heures de temps écoulés après la récolte du pollen pour qu'il perde sa viabilité. Ceci peut expliquer le fait qu'on ait obtenu des pourcentages de germination presque nuls au stade II pour toutes les variétés étudiées. En réalité, le temps que l'anthere met à s'ouvrir au cours du développement de la fleur suffit à faire perdre sa viabilité à un pollen dont la durée de vie est de l'ordre de 9 heures. On peut penser que dès sa sortie de l'anthere, l'exposition du pollen aux facteurs climatiques tels que des températures trop élevées ou une humidité de l'air relativement faible, constitue des facteurs clés de sa détérioration.

Une fois sortie de l'anthere, le pollen ne germe plus au-delà de 3 heures. L'anthere doit constituer une importante membrane protectrice des pollens contre les facteurs du climat défavorables à la survie du pollen. Il est aussi possible que dans l'anthere, le ravitaillement en eau par la plante maintienne les pollens dans les conditions d'humidité et de température susceptibles de les maintenir en vie. Il existe donc au sein du capitule au moins deux microclimats qui déterminent le pouvoir germinatif des pollens : le microclimat qui règne dans l'anthere et le microclimat qui règne hors de l'anthere.

La teneur en acide borique du milieu de culture des pollens de *Vernonia* a une influence sur son pouvoir germinatif. Bien que l'on puisse observer une baisse progressive du pouvoir germinatif du pollen au fil du temps dans la pépinière malgré l'amélioration des conditions de germination, on constate que l'augmentation de la teneur en acide borique de 0,4 g/l dans le milieu de base à 0,8 g/l chez *V. calvoana* var. *microcephala* permet d'atteindre 14,67 % de pollens germés. Visser (1955) pense que l'effet de l'acide borique est amélioré par l'augmentation de la température ; on constate que le pollen de cette variété est celui qui germe le mieux à 35 °C tandis que celui des autres variétés germe de façon optimale à 25 °C.

La variation du pH a une influence sur la germination des pollens de *Vernonia* spp. qui germent en milieu acide. Le pouvoir germinatif des pollens de *V. calvoana* var. *calvoana* atteint son optimum à 5,6. Les pollens de *V. calvoana* (à fleurs blanches) et ceux de *V. calvoana* var. *microcephala* germent mieux à pH 5. Le taux de germination de *V. amygdalina* est à son optimum lorsque le pH atteint 4,6. Ces résultats montrent comme l'a affirmé Youmbi (1993) que le pH est un facteur stimulant de la germination des pollens dont la valeur est fonction de l'espèce. Pour cette raison, on peut se demander si l'effet stimulateur de l'acide borique sur la germination des pollens n'est pas plus lié à son caractère acide qu'à toute autre propriété de la molécule.

Le pollen de *Vernonia* spp. possède une durée de vie assez courte de 6 à 9 heures de temps. L'hypothèse d'une paroi sporopollinique fragile pourrait expliquer cette courte durée de vie car, sorti de l'anthere, le pollen est exposé à de nouvelles conditions environnementales. En général, les pollens d'angiosperme dont la germination et la conservation sont relativement difficiles sont trinucées (Pickert, 1988). De plus, la perte progressive du pouvoir germinatif du pollen pendant la période de floraison suggère le fait que certains facteurs environnementaux qui entourent le processus de germination des pollens de *Vernonia* spp. soient encore non maîtrisés.

Siregar & Sweet (2000) démontrent sur la base des pollens de *Radiata pine*, l'importance des conditions d'extraction des pollens de l'anthere. La baisse du pouvoir germinatif malgré l'amélioration des conditions de germination pourrait être dû au fait que la température pendant l'extraction des pollens n'ait pas été contrôlée. En effet, la température varie au cours du temps et des saisons.

L'ensemble de ces caractères morphologiques et physiologiques des pollens de *Vernonia* spp. permet de caractériser une espèce hermaphrodite dont la fleur est le siège du phénomène de protandrie. Le pollen est mature à l'ouverture des pétales alors que le stigmate n'est pas encore ouvert. L'ouverture du stigmate se fait en même temps que s'effectue l'expulsion des pollens hors de l'anthere : ce qui semble constituer une opportunité pour l'autofécondation. Néanmoins, les pollens d'aspect gélififiés sur les faces externes du pistil ont perdu leurs pouvoirs germinatifs lorsque s'épanouit totalement le stigmate : ce qui rend peu probable l'opportunité d'une autofécondation. Les insectes pollinisateurs semblent être les facteurs principaux ou exclusifs du transport des pollens vers le pistil compte tenu des aspects ci-dessus mentionnés et du caractère échinulé des pollens. Il faut néanmoins noter que les fleurs du même capitule n'arrivent pas à maturité au même moment. Les fleurs situées au centre du capitule sont plus jeunes que les fleurs marginales. Une autopollinisation entre les fleurs du même capitule est donc possible s'il n'existe pas de facteurs génétiques constituant un obstacle à l'autofécondation. Sur le plan morphologique et mécanique, *Vernonia* spp. tout comme *Vernonia galamensis* (Dierig & Thompson, 1993) est une espèce allogame.

Le modèle possible de transport de pollen tenant compte des résultats et observations faites dans le cadre de cette étude est entomophile, avec l'allogamie et l'autogamie comme mode de fécondation (fig. 37). Les observations faites sont :

- l'existence du phénomène de protandrie,
- le caractère échinulé et adhésif des pollens,
- le mécanisme de libération des pollens des anthers,
- l'existence des fleurs à des stades de développement différents sur le même capitule.

On met ainsi en évidence un principal mode de transport du pollen : le transport entomophile. Il est aussi possible sauf si une incompatibilité génétique est mise en évidence au sein du même pied qu'un pollen féconde une autre fleur du même capitule, ou une fleur appartenant à un autre capitule du même pied. On parle d'autogamie.

Deux modes de dispersion sont donc possibles chez les *Vernonia* étudiés : l'allogamie et l'autogamie. Ce modèle complète les affirmations de Perry & Hirons (1967) et de Judd et al. (1999) qui affirment sans réserve que les *Asteraceae* sont des espèces allogames. Ces modes de fécondation et de dispersion de pollens sont propices à la création de la variabilité génétique au sein d'un genre. En effet, la structure génétique d'une population est déterminée en grande partie par les mouvements des pollens qui rythment le flux des gènes (Craft et Ashley, 2010).

### **III.2.3. Critère de reconnaissance des cultivars de *Vernonia* et méthodes de régénération utilisées par les paysans.**

Environ 50 % des enquêtés identifient les vernonies par le goût des feuilles. Schippers (2004) affirme que le critère de sélection variétale utilisé par les paysans au moment du repiquage des plants est le goût. Les plants au goût moins amer étant prisés pour la consommation.

Les cultivateurs utilisent comme matériel de multiplication les graines pour les cultivars de *V. calvoana* et les boutures pour *V. amygdalina*. Ce résultat confirme le constat fait par Schippers (2004). Il pourrait permettre de prévoir l'existence d'une plus grande diversité de morphotypes chez *V. calvoana* que chez *V. amygdalina*. En effet, la reproduction des morphotypes couramment recherchés serait plus facile pour la dernière espèce avec la technique du bouturage. Les morphotypes jugés moins intéressants sur le plan agronomique auraient été progressivement éliminés. La dissémination par les graines effectuée chez l'espèce *V. calvoana* aurait ainsi permis un brassage génétique et la conservation de sa diversité.

Le test organoleptique a permis de séparer les accessions en trois groupes avec une plus grande variabilité chez *V. calvoana*. Cette diversité intra-spécifique mise en évidence à travers le goût des feuilles alors qu'elle était déjà suggérée par la caractérisation du pollen par Nguimkeng et al. (2015), amènerait à prévoir une grande variabilité génétique mise en évidence par une étude chimiotaxonomique et agromorphologique.

Une variabilité a été observée au niveau de la couleur des fleurs, la couleur des feuilles et le goût des feuilles des différentes accessions de *Vernonia*. Cette variabilité des traits observée (phénotype) ne reflète pas seulement la composition génétique des morphotypes. Elle pourrait refléter aussi l'interaction entre le génotype et l'environnement (génotype × environnement) dans lequel il est exprimé (Noerwijati et al., 2013). Les traits qualitatifs sont considérés comme les traits les plus importants pour identifier une accession particulière

d'une plante. Les traits qualitatifs sont généralement génétiquement contrôlés. Ils sont cependant peu indépendants de la réponse de l'environnement (Temegne et *al.*, 2016).

La majorité des accessions des Vernonies testées sont amères. On pourrait penser que ces espèces seraient prisées pour leur amertume. Il faudrait au préalable expliquer pourquoi est-ce que les consommateurs font subir aux feuilles un procédé de macération et d'extraction artisanal à l'eau de métabolites destiné à réduire leur amertume avant leur utilisation dans divers menus. En effet, la qualité organoleptique recherchée dépend de l'usage qu'on fait de la feuille. Comme légume feuille locale, les morphotypes moins amères sont recherchés et recommandés pour la commercialisation (Mih et *al.*, 2008). Par ailleurs, l'amertume des légumes serait due à la présence dans ses tissus de plusieurs métabolites secondaires qui leur conféreraient des propriétés nutritionnelles et antimicrobiennes (Kutsukutsa et *al.*, 2014).

L'inventaire de la ressource phytogénétiques des vernonies ne devrait pas seulement tenir compte de ses qualités organoleptiques dont le goût amer des feuilles. Il devrait aussi prendre en compte les propriétés médicinales que lui confère la diversité de ses molécules. C'est pour cette raison qu'une sélection variétale ne saurait se baser uniquement sur le goût des feuilles mais aussi sur la composition de ces feuilles. Le but recherché pouvant être l'amélioration des propriétés nutritionnelles (Fube & Djonga, 1987 ; Igile et *al.*, 1995), l'exploitation de composés thérapeutiques (Sobrinco et *al.*, 2015), ou encore l'augmentation du rendement en feuille, etc...

Pour les traits quantitatifs, une grande variabilité a été également observée entre les accessions de *V. amygdalina* et de *V. calvoana*. La différence génotypique existante pourrait expliquer ce résultat. Les coefficients de variation allaient de 5,78 % (Diamètre polaire des pollens) à 29,86 % (Pourcentage de germination). Les coefficients de variation élevés (>20 %) observés pour certains traits étudiés (pourcentage de germination, temps de germination, largeur de la feuille) indiquent la présence d'une hétérogénéité élevée entre les accessions caractérisées (Temegne et *al.*, 2016). Cette hétérogénéité peut être exploitée dans l'amélioration des *Vernonia*.

Les morphotypes ont chacun un délai de maturation qui détermine la hauteur de leurs tiges. Le nombre de feuilles d'un morphotype détermine le nombre de fleurs ainsi que le pourcentage de germination des graines du même morphotype. Ces résultats pourraient signifier que les morphotypes ont chacun un délai de maturation qui détermine la hauteur de leurs tiges. Le nombre de feuilles d'un morphotype détermine le nombre de fleurs ainsi que le

pourcentage de germination des graines du même morphotype. Ce résultat pourrait traduire le fait que la distinction entre deux morphotypes doit tenir compte de plusieurs variables quantitatives. On peut alors aisément comprendre pourquoi les paysans ont focalisé leurs attentions sur les caractères qualitatifs tels que le goût des feuilles et la coloration. Cependant, les caractères quantitatifs sont un précieux outil d'évaluation du rendement.

#### **III.2.4. Caractérisation phytochimique de *Vernonia* spp. et propriétés antimicrobiennes des extraits de feuilles**

Les phénols, les flavonoïdes et les tanins sont tous présents dans les extraits des six morphotypes de *Vernonia* étudiés. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les génotypes appartiennent tous au même genre *Vernonia*. Sobrinho et al. (2015) cite les flavonoïdes et les tanins comme les constituants communs des *Vernonia*. Le premier constituant leur conférerait des propriétés antioxydantes et le second les propriétés antimicrobiennes.

La concentration en phénols, flavonoïdes et en tanins varie en fonction du morphotype. Ce constat suggère que la composition chimique des feuilles permet de discriminer les morphotypes de ces espèces. Il existe une diversité intra-spécifique au sein de chacune des espèces de *V. amygdalina* et *V. calvoana*. Cette observation est similaire à celle faite par Nguimkeng et al. (2015). Ce résultat traduit l'idée que les grands groupes métaboliques sont contenus dans les morphotypes à des doses différentes en fonction du morphotype mais, n'établit pas que ces molécules sont les mêmes ou non.

Les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins de *V. amygdalina* sont respectivement de 188,7 ; 109,2 et de 72,4 mg/g. Ce résultat est largement supérieur à celui obtenu par Atangwho et al. (2009) ayant obtenu l'équivalent de 42 mg/g de phénol ; 87 mg de flavonoïdes et 37 mg/g de tanins. Les différences de concentrations obtenues peuvent s'expliquer par les variations liées aux conditions pédoclimatiques, aux conditions d'extraction (nature du solvant) ou à la nature du matériel végétal utilisé (stade de développement, caractéristiques organoleptiques, variations intraspécifiques). Les résultats contraires ont été obtenus par Wazis et al. (2013) qui ont trouvé que les flavonoïdes sont absents chez *V. amygdalina*. La non prise en compte de ces variations pourrait expliquer les résultats de ces derniers.

La classification des morphotypes en fonction des teneurs décroissantes en flavonoïdes correspond à celle des teneurs décroissantes en tanins. Dans cet ordre, les morphotypes sont successivement classés comme suit : VCAB, VCAV, VAA, VALF, VCSB et VCSV. Ce classement correspond exactement à la classification établie par Nguimkeng et al. (2016) sur

ces mêmes morphotypes en fonction du goût des feuilles (du plus amer au moins amer). Les teneurs en tanins et en flavonoïdes constitueraient des paramètres d'évaluation du goût des feuilles des plantes. Une corrélation significative a été mise en évidence entre les teneurs en flavonoïdes et en tanins. Ce résultat corrobore ceux de Kutsukutsa et *al.* (2014) qui travaillant sur les feuilles de *Cleome gynandra* ont montré que le goût amer est positivement corrélé aux teneurs élevées en tanins et non en composés phénoliques.

Les feuilles de vernonies sont riches en protéines totales et en sucres solubles totaux. La présence des protéines totales dans les feuilles de vernonie a aussi été mise en évidence par Atangwho et *al.* (2009) qui détermine  $23,25 \pm 0,12$  % de protéines chez *Vernonia amygdalina*. Sodamade (2013) trouve  $44,28 \pm 2,43$  mg de protéines/100g de matière sèche. La vernonie est une source d'approvisionnement en sucres et en protéines susceptibles de compléter l'alimentation humaine ou animale. Bien que les morphotypes de vernonie ne possèdent pas les mêmes teneurs en ces métabolites primaires, ils ne sont pas un critère de discrimination taxonomique. On peut donc comprendre pourquoi le goût (critère de discrimination) n'est pas corrélé aux teneurs en protéines et en sucres.

Les feuilles de *V. amygdalina* et *V. calvoana* possèdent des propriétés antibactériennes. Des résultats similaires ont déjà été obtenus par Ghamba et *al.* (2014) travaillant sur l'effet des extraits de *V. amygdalina* sur les isolats cliniques d'*E.coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Candida albicans*. Ces derniers obtiennent au mieux des zones d'inhibition de 11,4 mm de diamètre chez *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* et de 11,7 mm de diamètre pour *Klebsiella*. La superposition de ces résultats avec ceux obtenus dans ces travaux doit prendre en compte les variations liées à l'environnement, les caractéristiques des isolats utilisées et le morphotype du *Vernonia* qui a produit l'extrait brute et la méthode d'extraction. Olamide & Agu (2013) ont trouvé que les extraits de *V. amygdalina* ont un effet inhibiteur sur *Salmonella* et peuvent donc être utilisés dans le traitement de la dysenterie.

Le traitement témoin a présenté dans les deux cas le plus grand diamètre d'inhibition, par conséquent la plus grande efficacité contre les bactéries et les levures utilisées. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les extraits utilisés sont des extraits bruts, par conséquent non purifiés. Dans un extrait non purifié, il est possible d'y retrouver une ou plusieurs molécules actives, mais aussi des molécules à effets antagonistes susceptibles de réduire l'action des molécules actives.

La détermination des CMI met en évidence les propriétés antimicrobiennes des *Vernonia* étudiés. Elle montre par ailleurs que ces propriétés varient d'un individu de la même espèce à l'autre selon qu'ils appartiennent au même morphotype ou non. Cette différence de propriétés antimicrobiennes est liée à la composition chimique des feuilles (Audu et al., 2012). Cependant, les différences phytochimiques jusqu'ici établies dans cette étude le sont sur la base des teneurs des extraits de feuilles en grands groupes métaboliques. Elles ne disent pas si les molécules qui constituent ces grands groupes métaboliques sont les mêmes.

Les résultats des analyses HPLC-MS montrent que la vernonie est autant diversifiée sur le plan morphologique (Nguimkeng et al., 2016) que sur le plan chimiotaxonomique. Il existe deux traceurs chimiotaxonomiques que sont l'acide chlorogénique et la lutéoline. Bohm et Stuessy (2001) ont pensé que les flavonoïdes constituent des marqueurs taxonomiques. Audu et al. (2012) avait déjà mis en évidence la présence de lutéoline dans les extraits de *Vernonia amygdalina* qui lui conférait des vertus anticancéreuses, antidiabétiques et prévenait de l'artériosclérose. Cette étude vient montrer que la présence de la lutéoline est une caractéristique de *V. amygdalina* et *V. calvoana* même si les teneurs en chacun de ces composés distinguent leurs différents morphotypes.

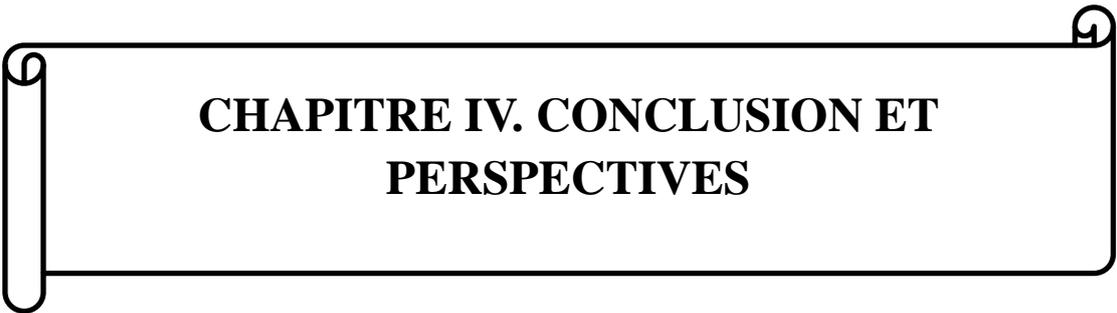
La plus grande diversité en polyphénols est obtenue sur le morphotype VCAV de l'espèce *V. calvoana*. La plupart des études jusqu'ici menées mettent en relief les propriétés pharmacologiques de *V. amygdalina* et non celle de *V. calvoana*. Cette dernière est très souvent présentée juste comme un légume feuille consommé (Mih et al., 2008). Ces analyses HPLC-MS montre ainsi le potentiel en termes de métabolites en rapport aussi avec le dosage des grands groupes métaboliques effectué. En effet, VCAV possède les deuxièmes meilleurs teneurs en phénols, flavonoïdes et tanins. Mais, le morphotype qui présente une activité sur toutes les trois bactéries testées est VAA avec  $7,5 \pm 0,7$  mm (*Salmonella enterica*) ;  $7 \pm 0$  mm (*Klebsiella pneumonia*) et  $8 \pm 0$  mm (*Streptococcus aureus*) comme diamètre de la zone d'inhibition. L'espèce *V. calvoana* pourrait être aussi diversifiée et posséder autant de vertues que *V. amygdalina* plus connue.

Cette étude montre que outre certains sesquiterpènes qui caractérisent la vernonie (Sinisi et al., 2015), les phénols et les flavonoïdes peuvent constituer des traceurs sur le plan taxonomique. Ces composés peuvent de façon isolée ou en synergie avec d'autre groupe de composés tels les sesquiterpènes expliquer la multiplicité des propriétés médicinales de la vernonie.

L'étude sur la diversité génétique des vernonies est un préalable à l'élaboration des programmes de sélection et d'amélioration variétale en vue d'une exploitation industrielle susceptible de satisfaire les exigences d'un marché grandissant de produits exotiques. Ce programme prendrait en compte les exigences en termes de qualité et de quantité de ses feuilles selon que l'on exploite l'aspect nutritionnel ou médicinal de la plante. En effet, les caractéristiques organoleptiques sont très variables traduisant l'existence d'une grande diversité génétique au sein des vernonies. La caractérisation des différents morphotypes offre à tout exploitant (petits cultivateurs ou industriel), un éventail de génotypes susceptibles de combler ses attentes en vue d'optimiser ses rendements. L'exploitant peut s'intéresser aux qualités organoleptiques des feuilles, à la durée du cycle de vie, au nombre de feuilles (comme critère de rendement), à la présence d'un composé, aux propriétés antimicrobiennes. Il est possible de fusionner plusieurs caractères recherchés à travers un programme d'hybridation. L'atout pour cette plante est qu'elle admet deux modes de multiplication : la multiplication végétative et la reproduction sexuée. Les hybrides obtenus peuvent facilement être multipliés.

*Vernonia amygdalina* est un arbuste pouvant atteindre 7 m de hauteur. C'est un des rares arbustes dont les feuilles sont utilisées comme légumes. La plante constitue ainsi une grande source d'aliments car les feuilles d'un arbuste sont très nombreuses contrairement à la plupart des légumes feuilles issus des herbacées. De plus, c'est une plante pérenne, ubiquiste qui s'adapte à diverses conditions pédoclimatiques. Le développement de sa culture constituerait un moyen de lutte contre la faim dans le monde.

*Vernonia calvoana* est moins distribuée et peu exploitée pour ses vertus curatives. Cette situation peut s'expliquer par le fait que l'espèce est peu distribuée et présente un cycle court avec une période de récolte des feuilles circonscrite à la saison pluvieuse. Les feuilles ne sont donc pas disponibles toute l'année pour servir de médicament aux populations locales contrairement à *V. amygdalina* dont les feuilles sont disponibles toute l'année. De plus, l'environnement procure souvent aux populations d'autres ressources alternatives pour soigner les mêmes maladies dans le même milieu.



**CHAPITRE IV. CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES**

## IV.1. CONCLUSION

La vernonie douce (*V. calvoana*) et de la vernonie commune (*V. amygdalina*) sont deux légumes feuilles locaux aux usages multiples et constituant une source de revenus pour les populations. La présente étude a mis en évidence la diversité génétique de la vernonie en vue de mettre sur pied quelques éléments à prendre en compte lors de l'élaboration des programmes d'amélioration génétique.

Les espèces de *Vernonia* sont plus répandues dans les zones agro-écologiques de la partie sud du Cameroun (Formations d'altitude humides et îlots subalpin, Forêt semi-decidue à sterculiacée, Forêt ombrophile), la zone de la forêt humide à pluviométrie monomodale et la zone de forêt humide à pluviométrie bimodale. La dispersion des espèces de *Vernonia* est intermédiaire dans la zone des hautes savanes guinéennes. Elle est très sporadique dans la zone soudano-sahélienne. Il ressort de l'analyse de la distribution de *Vernonia* au Cameroun que ce légume préfère des précipitations allant de 1200 à 3000 mm/an.

Ce travail pose les bases d'un inventaire de la ressource phytogénétique des vernonies comestibles. Ces légumes feuilles locaux aux multiples usages sont de plus en plus cultivés et constituent une source de revenus. La caractérisation agromorphologique réalisée au cours de ce travail a mis en exergue six morphotypes distincts de Vernonies. Le goût des feuilles, la durée du cycle, la hauteur de la tige, le pourcentage de débourrement des tiges, la dimension des pollens, le nombre de feuilles et de fleurs sont les meilleurs critères discriminants des différents morphotypes. Les autres variables témoignent surtout de la riche diversité génétique intra spécifique et interspécifique.

Les pollens sont tous échinulés, de forme sphérique et d'aspect gélatineux, susceptibles d'adhérer sur les insectes entomophiles ouvrant la voie à un mode de pollinisation croisé. Cette analyse des caractères morphologiques du pollen de *Vernonia* spp. met en exergue le rôle clé des insectes pollinisateurs dans la reproduction et la préservation de l'espèce. Le plus gros pollen est celui de *V. calvoana* var. *microcephala* avec 69,42 µm de diamètre polaire et 66,30 µm de diamètre équatorial. *V. amygdalina* a le pollen de plus petite taille dont le diamètre polaire vaut 49,30 µm et le diamètre équatorial 44,30 µm. *V. calvoana* (à fleurs blanches) et *V. calvoana* var. *calvona* ont respectivement 62,40 µm et 65,42 µm de diamètres équatorial, 64,53 µm et 69,24 µm de diamètres polaires.

Sur le plan physiologique, Les pollens de *Vernonia* spp. germent tous sur milieu solide. Le meilleur milieu de base de germination des pollens de *V. amygdalina* est celui de

Brewbaker. Les pollens de *V. calvoana* germent mieux sur milieu solide de Heslop-Harrison. L'optimum du pouvoir germinatif s'obtient avec 25 % de sucre dans le milieu de base pour toutes les variétés étudiées sauf pour *V. calvoana* (à fleurs blanches) où l'optimum s'obtient avec 35 % de sucre dans le milieu de base. Incubés à 35 °C, les pollens de *V. calvoana* var. *microcephala* ont un pouvoir germinatif optimal tandis que les trois autres variétés étudiées atteignent leur pouvoir germinatif maximal à 25 °C. Les pH optimums des milieux de germination des pollens sont de 4,6 ; 5,6 ; 5,0 et 5,0 respectivement pour lesquels il est important d'ajuster la teneur en acide borique à 0,4; 0,4; 0,5 et 0,8 g/l respectivement pour *V. amygdalina* ; *V. calvoana* var. *calvoana* ; *V. calvoana* à fleurs blanches ; et *V. calvoana* var. *microcephala*.

Les pollens de *vernonia* spp. ont une durée de vie très courte : 6 à 9 heures de temps après la récolte. On obtient le taux de germination maximal pendant que le pollen se trouve encore dans l'anthere et que le stigmate n'est pas épanoui (Stade I). Ces résultats sont une raison de plus permettant d'affirmer que *Vernonia* spp. est le siège du phénomène de protandrie. On montre que du point de vue mécanique, les chances de réalisation d'une autofécondation naturelle sont réduites et par conséquent, il devrait prévaloir très probablement l'allogamie. L'hypothèse d'une autogamie est tout aussi probable car plusieurs fleurs n'arrivant pas à maturité au même moment occupent le même capitule. Le mode de dispersion est entomophile chez *V. amygdalina* et *V. calvoana*.

Dans le cadre de cette étude, *Vernonia amygdalina* et *V. calvoana* ont fait l'objet d'analyses chimiotaxonomiques visant à mettre en exergue leurs diversités génétiques. Les analyses qualitatives ont révélé la présence de composés phénoliques, de flavonoïdes et de tanins. La variabilité génétique a été établie par l'analyse quantitative. Le morphotype VCAB s'est révélé plus riche en flavonoïdes et en tanins alors que VCSB a eu la plus grande concentration en composé phénoliques. La classification des morphotypes en fonction des teneurs décroissantes en flavonoïdes correspond à celle des teneurs décroissantes en tanins. Dans cet ordre, les morphotypes sont successivement classés comme suit : VCAB, VCAV, VAA, VALF, VCSB et VCSV. Ce classement correspond exactement à la classification de ces mêmes morphotypes en fonction du goût des feuilles (du plus amer au moins amer). Les teneurs en tanins et en flavonoïdes constitueraient des paramètres d'évaluation du goût des feuilles des plantes.

A l'exception de VAA, tous les morphotypes ont une activité sur une seule souche de bactéries. Les extraits de VALF, VCAB, VCAV et VCSV ont une activité inhibitrice sur

*Klebsiella pneumonia* et VCSB sur *Salmonella enterica*. Les extraits de VAA présentent une activité inhibitrice sur toutes les trois bactéries testées (*S. enterica*, *K. pneumonia* et *S. aureus*). Les molécules pouvant être utilisées comme traceurs chimiotaxonomiques sont : l'acide chlorogénique et la luteoline. L'isoquercétine est caractéristique de VCSV. Les analyses phytochimiques réalisées sur les différents morphotypes de *V. amygdalina* et *V. calvoana* ont permis de les caractériser et de mettre en évidence l'influence de leurs différences sur les propriétés antimicrobiennes des extraits de feuilles. Ces résultats constituent des données de base dans la valorisation des ressources génétiques et la mise sur pied des programmes d'amélioration de la vernonie douce (*V. calvoana*) et de la vernonie commune (*V. amygdalina*).

## **IV.2. PERSPECTIVES**

Dans le cadre de ce travail de recherche, la caractérisation des morphotypes sur la base des critères agromorphologiques, organoleptiques et phytochimiques a été étudiée. Il serait souhaitable dans les travaux ultérieurs que :

- des analyses moléculaires des morphotypes de vernonies soient réalisées afin d'établir un répertoire complet des variétés ;
- le nombre de standards utilisés pour les analyses HPLC soient augmenté pour la découverte de nouveaux traceurs chimiotaxonomiques ;
- les sesquiterpènes soient explorés dans la recherche des traceurs chimiotaxonomiques ;
- l'influence des conditions environnementales sur la constitution phytochimiques des vernonies soit étudié ;
- des travaux d'hybridation soient effectués en vue de créer des variétés moins amères, productives et possédantes des propriétés médicinales en vue d'une production industrielle de la vernonie.

## BIBLIOGRAPHIE

- Agbogidi O.M. & Akpomorine J.O., 2013. Health and nutritional benefits of bitterleaf (*Vernonia amygdalina* Del). *Int. J. appl. pharm. sci. biomed. sci.*, 2(3): 164-170.
- Agwaramgbo L., Charne T., Grays C., Small J. & Young T., 2012. An evaluation of edible plant extracts for the phytoremediation of lead contaminated water. *Journal of Environmental Protection*, 3: 722-730.
- Ambougou A.V. 1991. *Apis mellifica-adansoni* Lat et les plantes mellifères gabonaises. (Département de l'Ivondo). *Recherche palynologique*. Thèse de Doctorat, Université de Paris 6, 386 p.
- Anoka A.N., Bulus A., Amo G.A., Dominic B., Sylvia D. & David R.B., 2008. The analgesic and antiplasmodial activities and toxicology of *V. amygdalina*. *Journal of Medicinal Food*, 11(3): 574-581.
- Anonyme, 2009. Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Support de cours sur le métabolisme secondaire d'Antoine Gravot (Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV). Université de Rennes 1 – L2 UE PHR.
- Anonyme, 2012. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of aerobic bacteria, 3rd ed. Approved standard (M11-A3).
- Anonyme, 2008. Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. IRAD/FAO, Yaoundé/Rome: 83 p.
- Aoudele A., Adedapo A. & Soetan K.O., 2007. Assessment of the anthelmintic efficacy of an aqueous crude extract of *Vernonia amygdalina*. *Pharmaceutical Biology*, 45(7): 564-568.
- Atangwho I.J., Ebong P.E., Eyong E.U., Williams I.O., Eteng M.U. & Egbung G.E., 2009. Comparative chemical composition of leaves of some antidiabetic medicinal plants: *Azadirachta indica*, *Vernonia amygdalina* and *Gongronema latifolium*. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(18): 4685-4689.
- Audu S.A., Taiwo A.E. & Ojuolape A.R., 2012. A study review of documented phytochemistry of *Vernonia amygdalina* (family *Asteraceae*) as the basis for pharmacologic activity of plant extract. *Journal of Natural Sciences Research*, 2(7): 1-9.
- Bair R.A. & Loomis W.E., 1941. The germination of maize pollen. *Science*, 94: 168-169.
- Bargali K., Vibhutsi, Shahi C., 2015. Contribution of rural women in vegetable cultivation in homegardens of Nainital District, Kumaum Himalaya, India. *Curr. Agri. Res.*, 3(2): 91-100.
- Bidima I. & Voufo M.P., 2007. Le Ndolé : une richesse camerounaise à valoriser. La voix Du Paysan, n° 197. <http://www.lavoixdupaysan.org/197.php>

- Biholong M., 1986. *Contribution à l'étude de la flore du Cameroun. Les Asteraceae*. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux III, Bordeaux. 363 p.
- Bohm A.B. & Stressy T.F., 2001. *Flavonoids of Sunflower Family (Asteraceae)*. Springer-Verlag Wein, Newyork.
- Brewbaker J.L. & Kwack B.H., 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen growth. *Am.J. Bot.*, 50 (859) : 1069-1083.
- Brink R.A., 1924. The physiology of pollen. I. The requirements for growth. *Amer. J. Bot.*, 11: 218-228.
- Brunet S., 2008. *Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants*. Thèse, Université de Toulouse, 246 p.
- Bruneton J., 1999. Tanins. In : 3rd ed. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Tec et Doc, Paris (France) : 69-404.
- Builders M.I.N.N., Ajoku G.A., Builders P.F., Orisadipe A. & Aguiyi J.C., 2011. Evaluation of the antimalarial potential of *Vernonia ambigua* Kotschy and Peyr (Asteraceae). *Int. J. Pharm.*, 7:238-247.
- Burkill H.M., 1985. *The useful plants of west tropical Africa*. 2nd ed. v, 1–3. Royal Botanic Gardens Kew, UK.
- Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G. & Vague R., 1987. *Bactériologie médicale*. Edition SIMED SA, Techniques usuell, pp. 9-232.
- Cerceau-Larrival M.T. & Hideux M., 1983. *Pollens de quelques plantes médicinales du Rwanda*. Ed. ACCT, 61 p.
- Cerceau-Larrival M.T., 1973. Le pollen et la microscopie électronique à balayage. *Science et Nature*, 117: 2-13.
- Charrier A., Berthaud J., Ghesquier A., Hamon S.. 1994. La diversité génétique chez les plantes cultivées des régions tropicales. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 80(8): 25-35.
- Chukwujekwu J.C., Lategan C.A., Smith P.J., Heerden F.R. & Staden J., 2009. Antiplasmodial and cytotoxic activity of isolated sesquiterpene lactones from the acetone leaf extract of *Vernonia colorata*. *S. Afr. J. Bot.*, 75: 176-179.
- Chung K.-T., Wong T.-Y., Huang Y.-W. & Lin Y., 1998. Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38, 421–464.
- Craft K.J. & Ashkey M.V., 2010. Pollen-mediated gene flow in isolated and continuous stands of bur oak, *Quercus macrocarpa* (Fabaceae). *American Journal of Botany*. 97(12):1999- 2006.
- Crozier A., Jaganath B.I. & Clifford N.M., 2006. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. phenols, polyphenols and tanins: an overview*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 24.

- Defrance J., 1997. Cuisine ethnique : un petit marché prometteur que les britanniques convoitent. *Produits frais*.
- Dematteis M. & Salgado C.R., 2001. Pollen morphology and chromosome number of *Vernonia rojasii* (Vernonieae, Asteraceae). *Comp. Newsl.*, 36: 69-73.
- Dierig D.A. & Thompson A.E., 1993. *Vernonia* and *Lesquerella* potential for commercialization. In: Janick, J. & Simon J.E. (eds). *New crops*. Wiley, Newyork : 362.
- Djoumessi M., 2002. *Etude et conservation du pollen de trois variétés de Gossypium hirsutum*. Mémoire de DEA, Université de Yaoundé I, 59 p.
- Donfack M.J.B., Youmbi E., Nkonmeneck B.A. 2007. Morphological and *in vitro* germination studies of pollen grains in kola tree (*Cola sp.*). *Akdeniz Universitesi Ziraat Fakutesi Dergisi*. 20(2): 311-318.
- Dongock N.D., 2003. *Inventaire et caractéristiques polléniques des plantes mellifères du Département de la Menoua (Ouest Cameroun)*. Mémoire de D.E.A., Université de Yaoundé I.
- Duffield J.W. & Snows A.G.J., 1941. Pollen longevity of *Pinus strobus* and *Pinus resinosa* as controlled by humidity and temperature. *Am. J. Bot.*, 28(2):175-177.
- Dupriez H. & De Leener Ph., 1987. *Jardins et vergers d'Afrique*. CTA- LHarmattan-Apica-Enda.Terre et Vie, Paris: 354 p.
- Ehab A.R.K., 2001. Chromosome counts and karyological studies on six taxa of the Egyptian *Asteraceae*. *Comp. Newsl.*, 36 : 81-92.
- Ekpendu E.A., 2014. A Checklist of Botanical Pesticides Available in Nigeria. *Open Journal of Ecology*, 4: 346-353. <http://dx.doi.org/104236/oje.2014.47032>.
- Erdtman G., 1952. *Pollen morphology and plant taxonomy*. Angiosperms. Almavist and Wiskell, Stockolm, 190 p.
- Faegri K. & Iversen J., 1950. *Textbook of modern pollen analysis*. Copenhagen, Denmark: Einar Munksgaard, pp. 168.
- Farombi E.O. & Owoeye O., 2011. Antioxidative and Chemopreventive Properties of *Vernonia amygdalina* and *Garcinia biflavonoid*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 8: 2533-2555.
- Focho D.A., Ndam W.T., Fonge B.A., 2009. Medicinal plants of Aguambu-Bamumbu in the Lebialem highlands, southwest province of Cameroon. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 3:1-13.
- Fube H.N. & Djonga B., 1987. Tropical vegetables in human nutrition: a case of ndolé (bitterleaf) *Vernonia calvoana* Hook. *Acta Horticulturae*, 198: 199–206.
- Ghamba P.E., Balla H., Goje L.J., Halilu A. & Dauda M.D., 2014. *In vitro* antimicrobial activities of *Vernonia amygdalina* on selected clinical isolates. *Int. J. Curr. Microbio. App. Sci.*, 3(4): 1103-1113. <Http/www.Ijemas.com>

- Gifford E.M. & Foster A.S., 1988. *Comparative morphology of vascular plants*. 3rd ed. New York, W.H. Freeman (Chapter 18).
- Gillet C., 1997. Le marché des produits ethniques. Communication à l'ouverture du 1<sup>er</sup> Salon Ethnic Food Show. *Ethnic Food News*, 1-5.
- Grubben G. J. H. & Denton O.A. (Editeur), 2004. *Ressources végétale de l'Afrique tropicale 2. Légumes*. [Traduction de Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables. 2004]. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas/ Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas/ CTA, Wageningen, Pays-Bas, 737 p.
- Hagerman A.E., 1992. Tanin protein interaction. In: H.O. Lee & Huang (eds). *Phenolic compounds in food and their effects on health: Analysis, occurrence and chemistry*. American Chemical society, Washington: 236-247..
- Halilu M.E., Abubakar A., Garba M.K. & Isah A.A., 2012. Antimicrobial and preliminary phytochemical studies of methanol extract of root bark of *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae). *J. App. Pharm Sci.*, 2(12): 66-70.
- Haslam E., 1998. *Practical polyphenols- From structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Heslop-Harrison J., 1977. Aspect of the structure cytochemistry and germination of the pollen of rye (*Secale cereal L.*). *Ann.*, 44: 2-65.
- Igile G.O., Oleszk W., Burda S. & Juryzsta M., 1995. Nutritional Assesment of *V. amygdalina* Leaves in Growing Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 93: 2162-2166.
- Jaafar H.Z.E., Ibrahim, M.H. & Por L.S., 2010. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on accumulation of total phenols, flavonoid and chlorophyll content in two varieties of *Labisia pumila* Benth. exposed to different shade levels. In: Proceedings of International Conference on Balanced Nutrient Management for Tropical Agriculture, Kuantan, Pahang (Malaysia), 15-22 February 2010; UPM: Kuala Lumpur (Malaysia), pp. 112-114.
- Jones S.B., 1981. Synoptic classification and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae; *Vernoniae*) in old world. *Rhodora*, 83: 59-75.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. & Steven P.F., 1999. *Plant systematic a phylogenetic approach*. Andrew D. Sinauer, 464 p.
- Jung Y.D. & Ellis L.M., 2001. Inhibition of tumor invasion and angiogenesis by epigallocatechingallate (EGCG), a major component of green tea . *Int. J. Exp. Path.*, 82: 309-316.
- Kahane R., Temple L., Brat P., Bon D.H., 2005. Les légumes Feuilles des pays tropicaux : diversité, richesse économique et valeur sante dans un contexte très fragile. In : Colloque Angers : 1-8.
- Kalanda K. & Lisowski S., 1995. The genus *Vernonia* (Asteraceae) in the flora of central Africa (Zaire, Rwanda, Burundi). *Fragmenta Floristica et geobotanica*, 40(2): 547-717.

- Keeley S.C. & Jones S.B., 1979. Distribution of pollen types in *Vernonia* (*Vernonieae*; *Compositae*). *Syst. Bot.*, 4(3): 195-202.
- Khalafalla M.M., Abdellatef E., Daffalla H.M., Nassrallah A.A., Aboul-Enein K.M., Lightfoot D.A., Cocchetto A., El-Shemy H.A., 2009. Antileukemia activity from root cultures of *Vernonia amygdalina*. *J. Med. Plants Res.*, 3: 556-562.
- Kiplimo J.J., 2012. *The phytochemistry and biological activity of secondary metabolites from Kenyan Vernonia and Vepris species*. University of Kwazulu-Natal, 158 p.
- Krief S., 2003. *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda*. Museum d'Histoire Naturelle, Paris, 346 p.
- Kupchan S.M., Hemingway R.J., Werner D. & Karim A., 1969. Tumor inhibitors. XLVI. Vernolepin, a sesquiterpene dilactone inhibitor from *Vernonia hymenolepis* A. Rich. *J. Org. Chem.*, 34: 3903-3908.
- Kutsukutsa R.T., Gasura E., Mabasa S. & Ngadze E., 2014. Variability in condensed tanins and bitterness in spider plant genotypes. *African Crop Science Journal*, 22(4): 275-280.
- Le Roux S., 1996. « Plats ethniques » : les Anglais donnent l'exemple. *L.S.A.*, N° 1492.
- Lebreton P., Méneret G., 1964. Elément de chimiotaxonomie botanique. Généralité ; notion d'espèce biochimique ; cas des flavonoïde chez *Humulus lupulus* L., *Bulletin de la Société Botanique de France*, 111 : 1-2, 69-80.
- Makkar H.P.S., 2000. Quantification of tannins in tree foliage - A laboratory manual. FAO/IAEA Working Document, Vienna, (Austria).
- Makkar H.P.S., Blummel M. & Becker K., 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *Br. J. Nutr.*, 73: 897-913.
- Mbinglo S., 1998. *Survey on the production of bitterleaf, Vernonia spp. In Bamenda, north-western Cameroon*. Rapport, Université de Dschang/ NRI.
- Mbogne T.J., Youmbi E., Balogoun I. & Ntsomboh-Ntsefong G., 2015. Agomorphological, chemical, and biochemical characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata*, *Cucurbitaceae*) Morphotypes Cultivated in Cameroon. *Research in Plant Sciences*, 3(1): 12-17.
- Mih A.M., Tonfack K.R. & Ndam L.M., 2008. Morphological characterization of four selections of *Vernonia hymenolepis* A. Rich (*Asteraceae*). *World J. Agric. Sci.*, 4(2): 220- 223.
- Misari S.M., 1992. Further observations on the insects attacking bitterleaf in Samaru, northern Nigeria. *Savana*, 13(1): 1-13.
- Mohd A.K.R., Norhaslinda R., Minie N.J., Norhayati A.H., Napisah H., Mohd N.Z., Syed A.T.T.J., Mahadeva R.US, Ahmad Z.A.L. 2016. Screening of Bismillah leaf

(*Vernonia amygdalina*) Extraction For Antiproliferative Activities In Human Glioblastom Brain Cancer Cell Lines. RJPBCS. 7(2): 1084-1089.

- Moundipa P.F., Flore K.G.M., Bilong C.F.B. & Bruchhaus I., 2000. In Vitro amoebic activity of some medicinal plants of the Bamun region (Cameroon). *Afr. J. Tad CAM.*, 2(2): 113-121.
- Muller-Harvey I., 2001. Analysis of Hydrolysables tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91: 3-20.
- Mwanauta R.W., Mtei K.A. & Ndakidemi P.A., 2014. Prospective bioactive compounds from *Vernonia amygdalina*, *Lippia javanica*, *Dysphania ambrosioides* and *Tithonia diversifolia* in controlling legume insect pests. *Agricultural Sciences*, 5: 1129-1139.
- Nguimkeng G.E.D., Zapfack L., Tonfack L.B., Godswill N.N. & Youmbi E., 2015. Morphological and physiological characterization of some *Vernonia* spp. Pollen genotypes in Cameroon. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.*, 2(9):7-15.
- Nguimkeng G.E.D., Zapfack L., Mbogne T.J., Temegne N.C., Godswill N.N., Tonfack L.B., Youmbi E.. Agromorphological and organoleptic characterization of *Vernonia calvoana* and *V. amygdalina*. *J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec. B*, 6 (4).
- Njonga B., 1985. *La culture du Ndolé*. Association pour la Promotion des Initiatives Communautaires Africaines (APICA), Douala.
- Noerwijati K., Nasrullah T. & Djoko P., 2013. Breeding value estimation of fifteen related cassava genotypes using blup. *J. Agricult. Biol. Sci.*, 8(4): 317-321.
- Noumi E., 2010. Ethno medicines used for treatment of prostatic disease in Fouban, Cameroon. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 4:793-805.
- Olamide S.O. & Agu C.G.DR. 2013. The assessment of the antimicrobial activities of *Ocimum gratissimum* (Wild Basil) and *Vernonia amygdalina* (Bitter Leaf) on some enteric pathogen causing dysentery of diarrhea in patients. *I.J.E.S.*, 2: 83-96.
- Opabode J.T. & Adebooye O.C., 2005. Application of biotechnology for the improvement of Nigerian indigenous leaf vegetables. *Afr. J. Biotchnol.*, 4(3): 138- 142.
- Perry G.A. & Hirons M.J., 1967. *Progressive biology1*. Blandford Press, London, pp. 123-125.
- Pickert M., 1988. *In vitro germination and storage of trinucleate Arabidopsis thaliana (L.) pollen grains*. Botanisches institute. J.W. Goethe-Universitat, 1-6.
- Ricciardelli d'Albore G., 1998. *Mediterranean mellissopalynology*. Instituto di Entomologia Agraria. Borgo XX. Giugno, 74 universita degli studi di Perugia, 498 p.
- Richelle M., Tavazzi I. & Offort E., 2001. Comparison of antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverage (coffee, cocoa, tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 3438–3442.
- Schippers R.R., 2004. *Légumes africains indigènes. Présentation des espèces cultivées*. Margraf Publishers GmbH, Scientific book, pp. 57-72.

- Schofield P., Mbugua D.M. & Pell A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91: 21-40.
- Sinisi A., Millan E., Abay S.M., Habluetzel A., Appendino G., Munoz E. & Tagliantela-Scafati, 2015. Poly-Electrophilic sesquiterpene lactone from *Vernonia amygdalina*: new member and differences in their mechanism of thiol trapping and bioactivity. *J. Nat. Prod.*, 78(7): 1618-1623.
- Siregar I.Z. & Sweet G.B., 2000. The impact of extraction and storage conditions on the viability of radita pine pollen. *Silva Genetica*, 49.
- Sobrinho N.C.A., Souza B.E. & Fontenelle S.D.O.R., 2015. A review on antimicrobial potential of species of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Academic Journals*. 9(31): 838-850.
- Sodamade A., 2013. Proximate analysis, mineral content, amino acid composition and functional properties of *Vernonia amygdalina* vegetable leaf protein concentrates. *Greener J. Agric. Sci.*, 3(3): 204-210. [www.gjournals.org](http://www.gjournals.org).
- Sy G., Barbosa F.S., Wele a., Gueye P.M., Gueye C.D., Cisse A., Dieye A., Bassene E. & Faye B., 2008. Activité anti-hyperglycémiant de la fraction F2 de l'extrait total acétonique de feuilles de *Vernonia colorata* (composeae). *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*, 15: 6-10.
- Sy G., Cisse A., Nongonierma R.B., Sarr M., Mbodj N.A. & Faye B., 2005. Hypoglycaemic and antidiabetic activity of acetic extract of *Vernonia colorata* leaves in normoglycaemic and alloxan-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 98: 171-175.
- Tabuna H., 2000. *Evaluation des échanges des produits forestiers non ligneux entre l'Afrique subsaharienne et l'Europe*. [Internet] FAO, Rome, Italy.
- Tchinda A.T., Tsopmo A., Tane P., Ayafor J.F., Connolly J.D. & Sterner O., 2002. Vernoguinosterol and vernoguinolide, trypanocidal stigmastane derivatives from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 59:371-374.
- Temegne N.C., Mouafor B.I. & Ngome A.F., 2016. Agro-morphological characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) collected in the humid forest and guinea savannah agro-ecological zones of Cameroon. *Greener J. Agric. Sci.*, 6(7): 209-225.
- Visser R., 1955. Germination and storage of pollen. *Medelingen van de Landbouwschool Wageningen*, 55: 1-68.
- Vodouhe S.E., Tossou R.C. & Soumanou M.M., 2012. Perception des consommateurs sur la qualité nutritionnelle et sanitaire de quelques légumes feuilles locaux produits dans la zone côtière du Sud-Benin. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Benin*, 13-23. <http://www.slire.net>.
- Volatier J.L., 1997. La consommation ethnique : une autre façon de découvrir les nourritures terrestres. *Ethnic Food News*, 1: 3-4.

- Wazis C.H., Timothy S.Y., Zakama S.G., Balla H.J. & Maspalma I.D., 2013. Phytochemical screening and purgative activity of Ethanolic extracts of *Vernonia amygdalina* Del. Leaf. *Int. J. Res. Ayur. Pharm.*, 4(1): 46-49.
- Wink M., 1998. Ashort History of Alkaloids. *In*: M.F. Roberts & M. Wink (eds). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Plenum Press, New York: 11-44.
- Yeap K.S., Ho Y.W., Beh K.B., Liang S.W., Ky H., Yousr N.H.A., Aleetheen B.N., 2010. *Vernonia amygdalina*, an ethnoveterinary and ethnomedical used green vegetable with multiple bioactivities. *J.M.P.R.*, 4(25): 2787-2812.
- Yemm E.M. & Willis A.J., 1954. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthron. *Biochem. J.*, 57: 508-514.
- Yeo P.F., 1993. Secondary pollen presentation. *Plant Syst. Evol. Suppl.*, 6: 1-268.
- Youmbi E., 1993. *Recherches sur la germination in vitro des pollens de quelques espèces tropicales provenant des collections végétales vivantes du Muséum. Contrôle de la viabilité de certains pollens conservés et stockés dans la banque de pollens du laboratoire de palynologie*. Mémoire de recherche, Post-Doctoral. Université, 62 p.
- Zimmer M. & Cordesse R., 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. INRA. *Productions Animales*, 9 : 167-179.



**ANNEXES**

**Annexe 1. Fiche d'enquête socio-économique et ethnopharmacologique**

**FICHE D'ENQUETE**

N°.....

Date d'interview (jour/mois/année)...../...../.....

Pays : CAMEROUN .Région : Département.....

District.....Village.....Quartier.....

**I. SOURCE DES DONNEES ETHNOBOTANIQUES**

Sexe :  Masculin  Féminin Age.....

Profession :  Herboriste  Tradipraticien  Populations indigènes  Autre  
 Guérisseur  Restaurateur  Cultivateur  Revendeur

Lieu de residence.....

**II. DONNEES BOTANIQUES**

Nom scientifique.....

**III. DONNEES ETHNOPHARMACOLOGIQUE**

1. Nom (s) de la (des) maladie (s) pour la/lesquelles la plante est utilisée :

.....  
.....

2. Mode d'utilisation de la plante  Seule  En combinaison avec d'autres plantes

3. Partie de plante utilisée  Feuilles  Ecorces  Racines  Tiges  Tronc

Fruit  Graine  Herbe  Ecorce de racine  Ecorce de tronc  Plante entière

4. Manière d'utiliser les organes de la plante  Frais  Sec

**IV. DONNEES SOCIO-ECONOMIQUES**

1. Utilisation  sauce  ragout  Autre

2. Combien de cultivars connaissez-vous ?

.....

3. A quoi les reconnaissez-vous ?

.....

4. Source d'approvisionnement  Je cultive  Je récolte en brousse  J'achète

5. Quantités .....

6. Comment multiplier  Bouturage  Graines  Autre

7. Fréquence des ventes .....

8. Gain mensuel .....

## Annexe 2. Quelques sorties des tableaux d'analyse de variance

### Milieux de base

Source of Variation	Sum Squares	DF	Mean Square
Between Groups	31279,6518	87	359,536227
Within Groups	2683,81927	176	15,248973
Corrected Total	33963,471	263	

F (variance ratio) = 23,577734 P < 0,0001

### Stades de developpement

Source of Variation	Sum Squares	DF	Mean Square
Between Groups	2618,8258	7	374,117971
Within Groups	625,951533	16	39,121971
Corrected Total	3244,77733	23	

F (variance ratio) = 9,562861 P < 0,0001

### Conservation au congelateur

Source of Variation	Sum Squares	DF	Mean Square
Between Groups	4081,35036	11	371,031851
Within Groups	324,5204	24	13,521683
Corrected Total	4405,87076	35	

F (variance ratio) = 27,439768 P < 0,0001

### Vabilite des pollens frais

Source of Variation	Sum Squares	DF	Mean Square
Between Groups	2307,81419	15	153,854279
Within Groups	290,965	32	9,092656
Corrected Total	2598,77919	47	

F (variance ratio) = 16,920719 P < 0,0001

### Teneurs en acide borique

Source of Variation	Sum Squares	DF	Mean Square
Between Groups	1735,05874	19	91,318881
Within Groups	541,3212	40	13,53303
Corrected Total	2276,37994	59	

F (variance ratio) = 6,747852 P < 0,0001

### Variation du pH

Source of Variation	Sum Squares	DF	Mean Square
Between Groups	2892,95556	27	107,146502
Within Groups	288,569267	56	5,153023
Corrected Total	3181,52483	83	

F (variance ratio) = 20,792942 P < 0,0001

### Variation de la temperature

Source of Variation	Sum Squares	DF	Mean Square
Between Groups	4630,91652	23	201,344197
Within Groups	1119,05747	48	23,313697
Corrected Total	5749,97399	71	

F (variance ratio) = 8,636305 P < 0,0001

### Dimension des pollens

Source of Variation	Sum Squares (SCE)	DF (ddl)	Mean Square (CM)
Between blocks (rows)	204,5	50	4,09
Between treatments (columns)	4660,3701	7	665,76716
Residual (error)	948,754902	350	2,710728
Corrected total	5813,625	407	

F (VR between blocks) = 1,50882 P = 0,019 F (VR between treatments) = 245,604533 P < 0,0001

## Goût de la feuille : fiche du dégustateur

Le dégustateur marquera devant la lettre correspondant à l'échantillon de feuille, l'un des symboles ci-dessous en fonction du goût qu'il aura déterminé.

Trop amer : +++

Amer : ++

Moins amer : +

Sucré : -

Autre : **Δ**

A

B

C

D

E

F

**Annexe 3.** Dispositif de dispersion des pollens de *Vernonia* spp.



Dispositif d'étude du facteur insecte dans la dispersion des pollens



Dispositif d'étude du facteur pluie dans la dispersion des pollens



Dispositif d'étude du facteur vent dans la dispersion des pollens



**ARTICLES**



# International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology

ISSN: 2349-8080 Volume 2 Number 9 (September-2015) pp. 7-15

[www.ijcrbp.com](http://www.ijcrbp.com)



## Original Research Article

### Morphological and Physiological Characterization of Some *Vernonia* spp. Pollen Genotypes in Cameroon

Eric D.G. Nguimkeng<sup>1</sup>, Louis Zapfack<sup>2</sup>, Libert B. Tonfack<sup>3</sup>, Godswill N. Ntsomboh<sup>4,5</sup> and Emmanuel Youmbi<sup>4\*</sup>

<sup>1,3,4</sup>Department of Plant Biology, University of Yaounde I, Faculty of Science, Laboratory of Biotechnology and Environment, P.O. Box 812 Yaounde, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Plant Biology, University of Yaounde I, Faculty of Science, Laboratory of Botany and Ecology, P.O. Box 812 Yaounde, Cameroon

<sup>5</sup>Institute of Agricultural Research for Development (IRAD), Specialized Centre for Oil Palm Research (CEREPAH) La Dibamba, BP 243 Douala, Cameroon

\*Corresponding author.

Abstract	Keywords
<p>Given the importance of non timber forest products like some species of <i>Vernonia</i> used for food and medicinal purposes, it is necessary to determine the morphological and physiological characteristics of their pollen grains needed for enhanced reproduction. Morphological studies have proven that pollen grains of <i>Vernonia</i> spp. are fenestrate, echinate, porate as well as spherical. The aim of this research was to address the diversity observed within the genus <i>Vernonia</i> based on additional proves. Conditions of pollen grain germination and its viability and conservation were thus analysed. Results show that the largest pollen grains were obtained from <i>V. calvoana</i> var. <i>microcephala</i> (69.42 <math>\mu\text{m}</math> long and 66.30 <math>\mu\text{m}</math> wide). <i>V. amygdalina</i> has the smallest size (49.30 <math>\mu\text{m}</math> in length and 44.30 <math>\mu\text{m}</math> in diameter). The study on pollen germination conditions show that <i>Vernonia</i> spp. grows exclusively on solid medium. Improved Brewbaker and Kwack medium was the main germination medium for <i>V. amygdalina</i> pollen. On the contrary, an improved Heslop-Harrison medium was appropriate for the germination of <i>V. calvoana</i> pollen. It was observed that pollen of the genus <i>Vernonia</i> mature before the opening of the stigma and survives for only three hours.</p>	<p>Conservation Culture medium Morphology Pollen germination <i>Vernonia</i> spp.</p>

### Introduction

*Asteraceae* is one of the four largest and diversified families of plants with 1535 genera and 23000 species (Ehab, 2001). In Cameroon, the genus *Vernonia* is one

of the representative genera of the *Asteraceae* family with 19% of the species (Biholong, 1986). Some species like *V. amygdalina* Del. and *V. calvoana* Hook classified as non timber forest products are used for food and medicinal purposes. Extracts of *V. colorata* have shown

hypoglycaemic and antidiabetic properties (Sy et al., 2008). Leaf extracts of *V. amygdalina* have been used in various traditional medicines against helminthic, protozoal as well as bacterial infections with scientific evidence of these claims (Farombi and Owoeye, 2011). Phytochemicals such as saponins and alkaloids, terpenes, steroids, coumarins, flavonoids, phenol acids, lignans, xanthenes, anthraquinones, edotides and sesquiterpenes have been isolated from *V. amygdalina* (Farombi and Owoeye, 2011). These compounds elicit various biological effects including cancer chemoprevention effect. The increase in population continues to raise the number of consumers leading to an over exploitation of *Vernonia spp.* There is therefore great need to carry out conservation studies in order to protect these important genetic resources from extinction.

From a taxonomic point of view, the *vernonieae* are considered as one of the most complex groups within the *Asteraceae*. The species of this group vary greatly in habit and morphology thus different criteria for taxonomic delimitation at the generic and infra-generic levels have been adopted (Angulo and Dematteis, 2009). In addition, a few biochemical, palynological, and genetic studies have been carried out on these plants (Donfack et al., 2007), some revealing many perceptible variations in pollen morphology within the genus (Dematteis and Salgado, 2001).

Studies on nutritional qualities of *V. amygdalina* have been carried out but very little work is known on its agronomic practices or genetic enhancement (Apabode and Adebooye, 2005). In order to improve knowledge on their identification and reproduction, it is important to develop and promote the physiological and morphological investigations of these plants. Moreover knowledge on their reproduction ability can be used to establish a plan for the selection and genetic improvement of *Vernonia*. In this light, studies on pollen germination are very useful especially to control reproduction of members of the genus *Vernonia*. *Vernonia amygdalina* is one of the species chosen in this study due to its ubiquitous characteristics that make it adapt to diverse climatic conditions. Its leaves are always much more bitter than those of *V. calvoana* for example. Three taxa of *V. calvoana* were retained for the study. One has only white florets, another purple and the third small purple florets. They grow in mountain areas in humid equatorial conditions. This study aims to establish preliminary data with new insights on pollination occurrence in *Vernonia* species in order to provide

evidence on diversification within the genus. Conditions of pollen grains germination and viability are also investigated.

## Materials and methods

### Materials

Pollen grains of two species of *Vernonia* were examined namely: *V. amygdalina* and *V. calvoana*. Among *V. calvoana* species three taxa were of interest: *Vernonia calvoana* (Hook. f.) Hook. f. var. *calvoana* presenting a big capitulum with purple florets and *V. calvoana* (Hook. f.) Hook. f. var. *calvoana* presenting big capitulum with white florets. The third taxon is *V. calvoana* var. *microcephala* C.D. Adams with a small capitulum presenting purple florets.

### Methods

#### Morphological traits of pollen

This study was carried out from October, 2009 to January, 2010. Flowers were produced during this period. Three months from October, seeds of *V. calvoana* were sown and cultivated in an experimental farm in Yaounde.

Pollen was isolated from anthers derived from various florets of different fresh capitula of the same plant taxon. Pollen grains from each of the different taxa were acetolysed using Erdtman (1952) method. After acetolysis, pollen was observed under an optical microscopy to describe it and to measure equatorial and polar diameters (Fig. 1).

#### Harvesting and *in vitro* culture of pollen

##### Pollen harvest

Capitula were cut from the farm at 6:00 AM. The species were isolated from each other and taken to the laboratory. The florets were then removed from the capitulum and the anthers extracted. As precaution, pollen used was left on the anthers to prevent infection and to ensure taxon identity. The anther with the pollen was immediately put in a culture medium deposited on a glass slide. The latter was placed in a Petri dish under limited humidity, and incubated at 20°C. Three replicates were used for each treatment and each replicate contained at least 500 but not more than 800 pollen grains per slide.

## Pollen germination media

Two types of germination media were tested: liquid medium and solid medium by adding 1% agar. Both were prepared with a Brewbaker Kwack (BK) (1963) solution for the first experiment and with Heslop-Harrison (HH) (1977) solution in the second. In a preliminary investigation, media having BK salts at different concentrations [from 0 to 50% of sucrose in first liquid medium and 0, 5, 10,..., 50% in the second solid medium] were screened. The experiment was repeated with HH solution. All the four *Vernonia* genotypes studied were involved in this preliminary step which helped to select a basal germination medium for each of the varieties. The incubation took 24 h at 20°C. The basal medium selected for one variety was one with the best percentage of pollen germination. A pollen grain was considered germinated if its pollen tube was longer than wide (Jayaprakash and Sarla, 2001). After incubation, cultures were fixed and colored, for better observations under an optical microscope by Alexander (1969) solution. This basal medium was then used in the subsequent tests but further improved by altering the temperature, pH, boric acid concentration, and developmental stage of the floret.

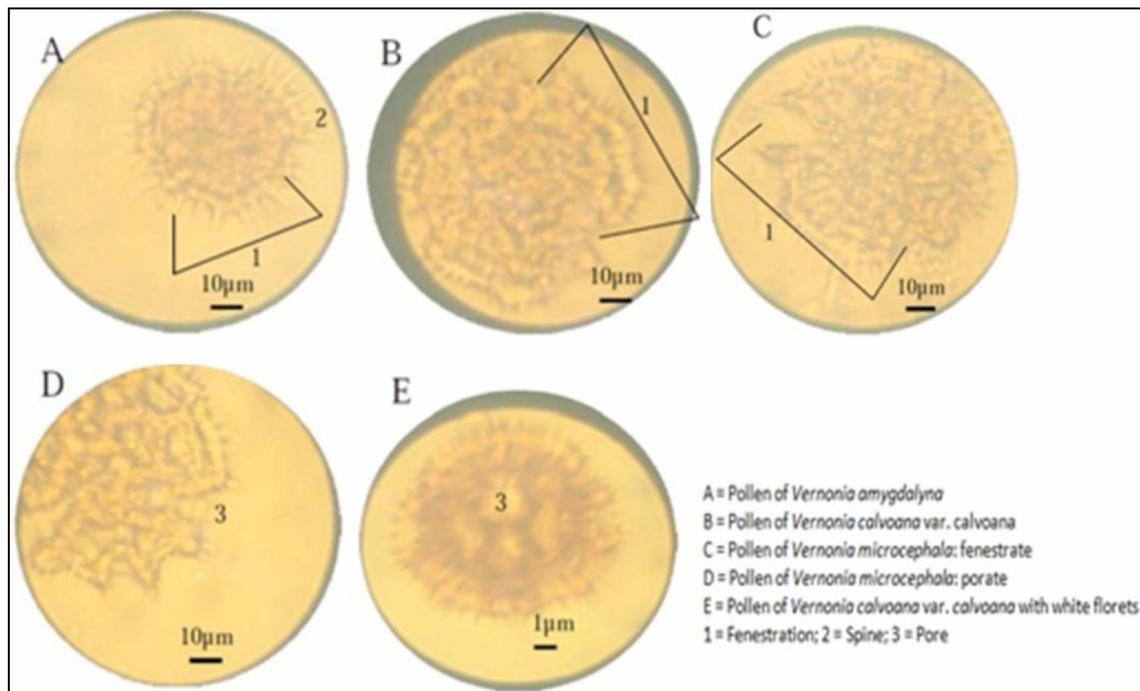
To investigate the viability of pollen, the pollen life span in different storage conditions of 25°C, 10°C (inside

refrigerator) and 0°C was observed and, two principal developmental stages of the floret corresponding to two different developmental periods of pollen grains were distinguished. In stage I, the capitulum was matured but with closed petals and anthers. In stage II, capitulum was matured; petals were also opened with an anther by a plunger pollination mechanism. Experimental pollen varieties were collected in those two conditions and cultivated on improved germination medium. In this study the evolution of pollen tube growth was also analyzed. Using an ocular micrometer, the lengths of 30 pollen tubes were measured to calculate mean pollen tube length after every additional hour of incubation beginning from the 22<sup>nd</sup> to the 29<sup>th</sup> hour of incubation.

## Results

### Pollen morphology

Microscopic observation shows that *Vernonia* pollen grains studied are spherical, porate, fenestrate and echinate (Fig. 1). The biggest pollen is that of *V. microcephala* while *V. amygdalina* has the smallest pollen grains (Table 1). Statistical analyses using Fisher test helped to establish significant differences between the sizes of pollen grains studied. It is also noticed that pollen of all those genotypes when shed out of anthers can be recovered by an adhesive and gelly white substance.



**Fig. 1: Pollen of *Vernonia* spp. observed with an optical microscope.**

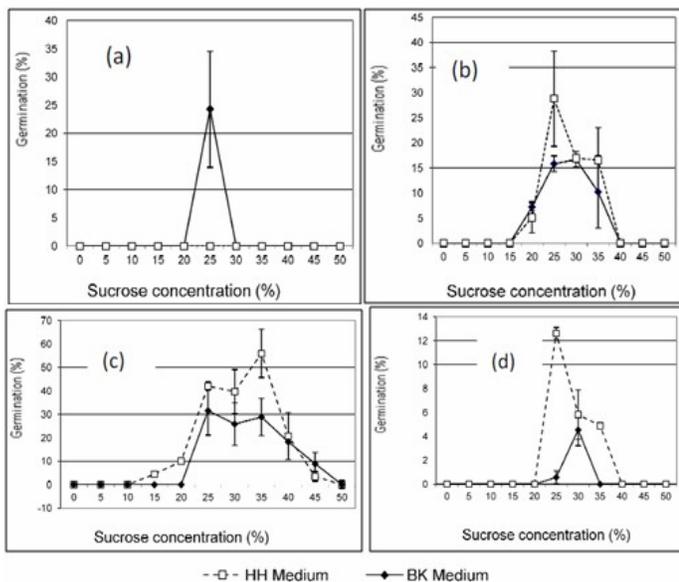
**Table 1. Summary of morphological characteristics of *Vernonia* pollen.**

Species	E (µm)	P (µm)	P/E
<i>V. amygdalina</i>	44.30 ± 4.86	49.30 ± 5.12	1.11
<i>V. calvoana</i> with white florets	62.40 ± 2.73	64.53 ± 2.82	1.03
<i>V. calvoana</i> var. <i>calvoana</i>	65.42 ± 4.68	69.24 ± 5.36	1.05
<i>V. microcephala</i>	66.30 ± 4.42	69.42 ± 4.65	1.05

Equatorial length (E); Polar length (P); All pollen grains were spherical with porate apertures. The tectum structure was echinulate and fenestrate

**Determination of best growth medium and influence of sucrose concentration on pollen germination**

Pollen grains of various genotypes studied here did not germinate in liquid medium in the presence or absence of sucrose. Germination test was successful only in solid medium and *Vernonia* pollen germinated in high concentration of sucrose. The optimum germination percentage was obtained with 25% sucrose for *V. calvoana* var. *calvoana*, *V. calvoana* var. *microcephala*, *V. amygdalina* (Fig. 2). The pollen of *V. calvoana* var. *calvoana* with white florets shows the best germination percentage at 35% sucrose concentration (Fig. 2c).

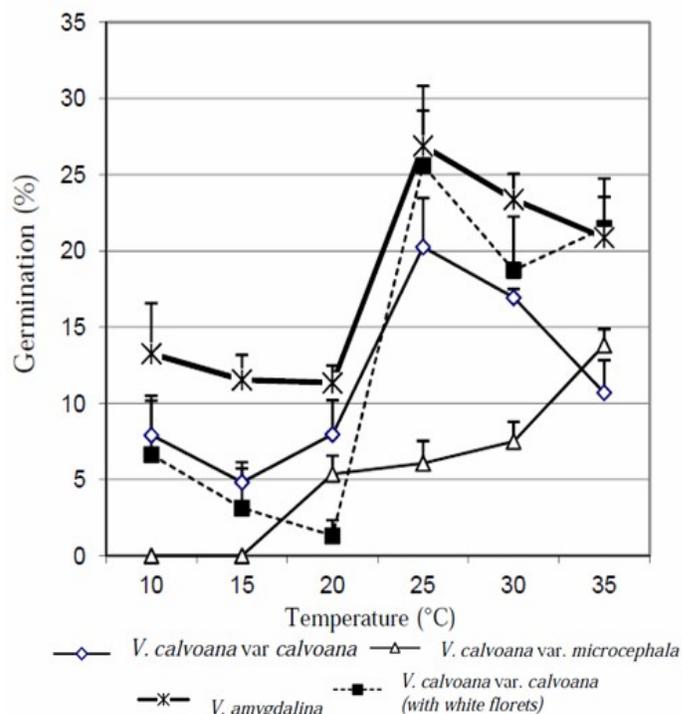


**Fig. 2: Effect of sucrose concentration (W/V) on *in vitro* pollen germination of *Vernonia* spp. tested in two different basic media (HH and BK). (a) *V. amygdalina*; (b) *V. calvoana* var. *calvoana*; (c) *V. calvoana* var. *calvoana* with white florets; (d) *V. microcephala***

The male gametophyte of *V. amygdalina* is the only one that can germinate in BK medium due to its specificity. Moreover in the four genotypes studied, it is the only species with a difference.

**The influence of temperature on pollen germination**

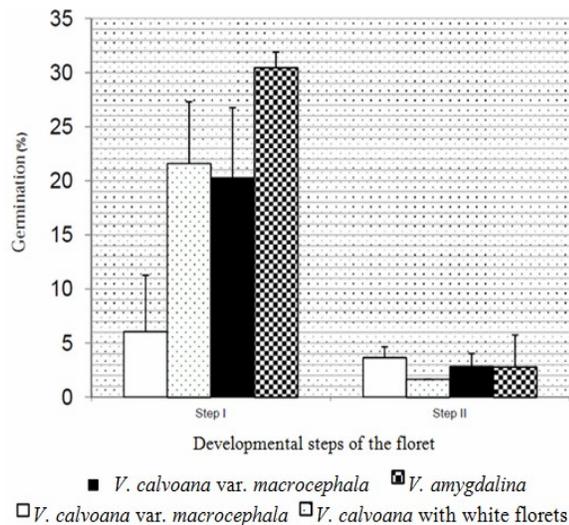
*V. calvoana* var. *microcephala* produces pollen that is capable of germinating at 35°C. The three other genotypes retain their maximum germination capacity at 25°C (Fig. 3). In the ecological area where *Vernonia* spp. grows, temperatures of up to 25°C are not very common at night.



**Fig. 3: The influence of temperature on pollen germination of *Vernonia* spp.**

**Determination of the appropriate developmental stage for collecting pollen from flowers**

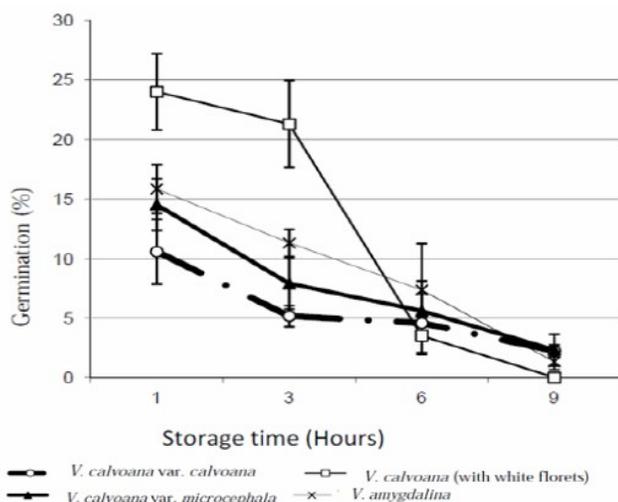
In the present study, stage I is the best stage to collect viable pollen from anthers (Fig. 4). At this stage, the pollen is still protected by the anther wall and petals from external stress. Thereafter, petals open and the pollen are pushed out of the anther by a plunger mechanism.



**Fig. 4: Percentage germination of pollen grains of four *Vernonia* spp. genotypes collected at two developmental steps of the floret and cultivated on the best culture medium.**

**Influence of storage duration of pollen on germination**

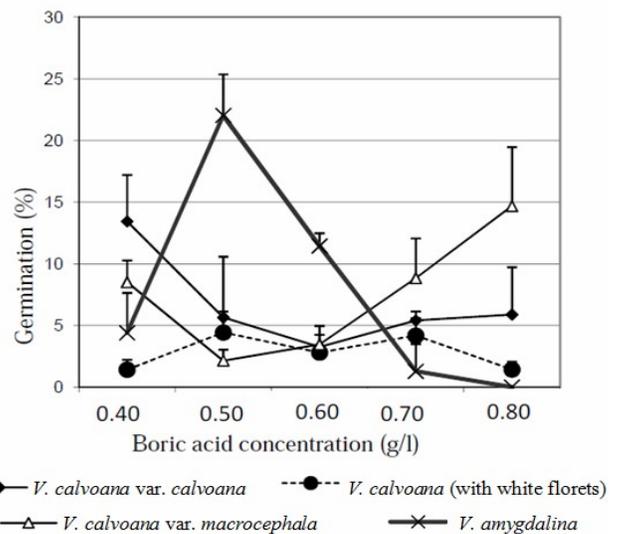
The percentage germination of pollen decreases with the duration of storage at room conditions (Fig. 5). Nine hours after collecting pollen, germination in artificial media is unsuccessful. *Vernonia* pollen has a very short life span. To control cross-pollination, this pollen is better used within less than an hour after its isolation from the plant to ensure an optimum viability of the male gametophyte. *Vernonia* pollen lives for 6 to 9 h when it is conserved with its capitulum under room conditions. When pollen is isolated from the anther, it loses its germination capacity three hours later.



**Fig. 5: Evolution of *Vernonia* pollen germination capacity with time spent at room temperature after harvest.**

**Effect of boric acid concentration on germination**

Various concentrations of Boric acid included in the germination medium of *Vernonia* influence pollen germination capacity (Fig. 6). An addition of 0.8g/L of boric acid to the medium of *V. calvoana* var. *microcephala* produced the best germination percentage (14%). The pollen of *V. amygdalina* germinated in an in vitro medium containing 0.3-0.7g/l of boric acid. It can be seen that boric acid concentration induces the highest germination rate for *V. amygdalina* pollen tested as is represented by an optimum curve. The best germination medium contains 0.4g/l of boric acid with 22.02% of pollen germinated. Statistical analysis reveals that there is a significant difference ( $p < 0.05$ ) between treatments with 0.4g/l boric acid concentration and other treatments except that with 0.5g/l. Statistical test also shows specifically that the difference in boric acid treatments in the germination of *V. calvoana* var. *calvoana* pollens ( $p < 0.05$ ) can be observed at 0.4g/l boric acid with the best percentage germination of 13.44%. No significant difference ( $p < 0.05$ ) between treatments is noticed on germination rates of *V. calvoana* var. *calvoana* with white florets. The best germination medium for *V. calvoana* var. *microcephala* is the one with 0.8g/l of boric acid that permitted 14.67% of pollen to germinate. It is the only treatment that differs statistically from the others.



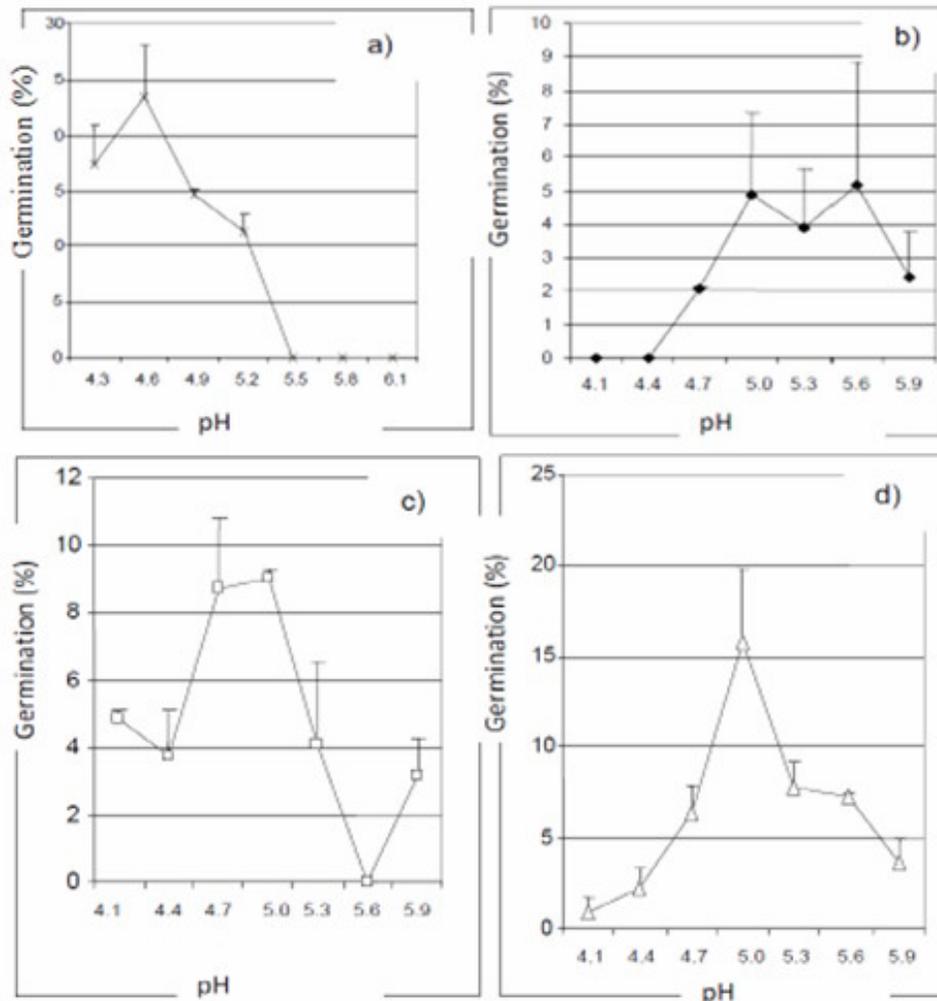
**Fig. 6: Influence of boric acid concentration on germination capacity of four *Vernonia* pollen genotypes.**

**Influence of pH on pollen germination capacity**

Pollen grains are sensitive to pH variations on the four genotypes studied (Fig. 7). The germination capacity of *V. calvoana* var. *calvoana* is optimal when the pH of the

culture medium is 5.6. Pollen of *V. calvoana* var. *calvoana* with white florets and *V. calvoana* var.

*microcephala* has the optimum germination percentage at pH 5. The best germination rate is obtained at pH 4.6.



**Fig. 7: Influence of pH on pollen germination capacity of Vernonia spp. a) *V. amygdalina*; b) *V. calvoana* var. *calvoana* with violet flowers; c) *V. calvoana* var. *calvoana* with white flowers; d) *V. calvoana* var. *microcephala*.**

## Discussion

### Pollen morphology

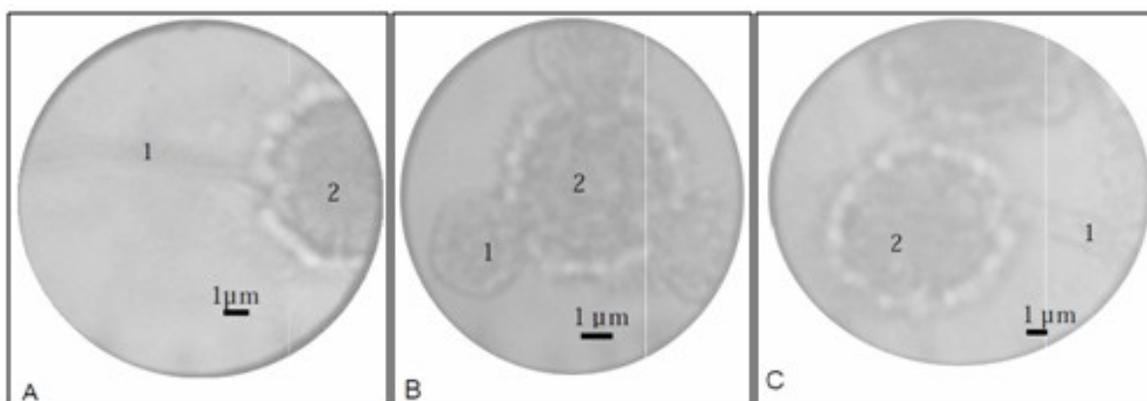
Microscopic observations led to the conclusion that *Vernonia* pollen grains are spherical, porate, fenestrate and echinate with differences in sizes. This is proof of great variability in pollen morphology of *Vernonia* spp., which is in line with observations of Keeley and Jones (1979) presenting taxonomic importance. The pollen morphology thus provides evidence of the significant diversity observed in that genus indicating very large genetic resources for various species. It is also noticed that pollen of all those genotypes when shed out of anthers are coated

with an adhesive and sticky white substance. This could be an adaptation to pollinators. In addition to an echinate character of pollen grains, this adhesive property facilitates the transport of the male gametophyte to the stigma by insects. It consolidates the fact that most angiosperms depend on animal pollinators for their sexual reproduction (Rossum et al., 2012). In fact, pollination depends on the matching between particular characteristics of flower (e.g. morphology, anthesis duration, scent and reward production) and pollinator morphology, as well as behavior (Amorin et al., 2012). Adhesive and echinate traits of pollen could be considered as an evolution trait which adapt the plant to pollinators, and favor cross pollination and gene mixture.

### Effect of solution and sucrose concentration on pollen germination

The pollen grains of *Vernonia* spp. studied did not germinate in liquid medium with or without sucrose. Germination test succeeded only in solid medium (Fig. 8). It is suggested by Donfack et al. (2007) that the colloidal structure of agar which constitutes this medium helps the pollen with thin wall to regulate water exchange through the membrane. The agar limited the full entrance of water into the cell and preserved the pollen from physiological damages. *Vernonia* pollen germinates in high concentration of sucrose. It has also been shown that an improvement of pollen germination

capacity is related to high sugar concentration especially in the presence of water, since the pollen is very water sensitive (Bair and Loomis, 1941). This relative sensitivity to water damage suggests that the species under study has a thin exine wall (Visser, 1955). In a small percentage of sucrose in the germination medium, high quantity of water enter through the membrane layer and causes loss of vital ions and other important soluble substances from the cell (Donfack et al., 2007). In this case, germination capacity is compromised. It was also observed that only the male gametophytes of *V. amygdalina* were able to germinate in BK medium and this could be due to its specificity. In the four taxa studied *V. amygdalina* is the only species with a difference.



**Fig. 8: Germinated pollen of *Vernonia* spp. A = Pollen of *V. calvoana* var. *calvoana* with pollen tube; B = *V. amygdalina* pollen at early stage of germination; C = Germinated pollen of *V. calvoana* var. *calvoana* with three pollen tubes; 1 = Pollen tube; 2 = Pollen.**

### Influence of temperature on pollen germination

*Vernonia* spp. produced pollen that is capable of germinating at up to 25°C and 35°C (Fig. 3). This could be considered as an important factor of adaptation of the plant to various climatic conditions and suggests that the appropriate time for pollination is during the day and not at night when temperatures are low. Flowers are built to fit their pollinators physically and to provide an appropriate reward (Judd et al., 1999). Pollination in that case should probably be done by specific pollinators which visit flowers by day. As discussed elsewhere (Bedford et al., 2012), the effect of recent climate change makes some areas even more climatically extreme, and this may impact the phenological overlap between plants and their pollinators (Vamosi et al., 2012).

### Appropriate developmental stage for collecting pollen from *Vernonia* flowers

In the present study, step I is the best stage at which viable pollen could be collected from the anthers. At this

stage, pollen is still protected by the anther and petals from external stress. The petals open and the pollen is pushed out of the anther by a plunger mechanism (Judd et al., 1999) as in step II. Moreover, it is better to use pollen collected within the anther to prevent infection, especially through spores, which grow faster than pollen tube and do not permit the observation of pollen grains in artificial media after 24 h.

### Influence of storage duration on germination

The percentage of pollen germination decreases with the duration of storage at room conditions (Fig. 5). It was noted that, nine hours after collecting pollen, germination in the artificial media was unsuccessful. Thus *Vernonia* pollen grains have a very short life span. These pollen lives for six to nine hours when conserved within its capitulum at room conditions. A fragile exine wall could be the cause of the short life span of the male gametophyte. *Vernonia* pollen to be used in controlled pollination should be isolated in less than an hour from the plant for an optimum of viability of the male

gametophyte. In general, angiosperm pollen which loses viability very rapidly and can hardly germinate on artificial media is trinucleate (Pickert, 1988). When pollen is isolated from the anther, it loses its germination capacity three hours later. Three hypotheses can be developed to justify the short life span of pollen. The first is that climatic conditions change when the pollen is outside the anther. The second is that there could be microorganisms that infect and inhibit some functions or cause damage on the pollen structure and thirdly, the genetic facts could be involved. In addition, as demonstrated elsewhere (Siregar and Sweet, 2000), the importance of pollen isolation conditions from the anther is also proved.

### Influence of boric acid concentration on *Vernonia* pollen germination

Boric acid concentration in the germination medium of *Vernonia* has an influence on pollen germination capacity (Fig. 6). The addition of 0.8g/L of boric acid in the germination medium of *V. calvoana* var. *microcephala* resulted in 14% germination and this was the best percentage. The effect of boric acid is increased by the elevation of temperature (Visser, 1955). The pollen of this genotype germinates best at 35°C.

### Influence of pH on germination capacity

Pollen grains were sensitive to pH variations in the four genotypes studied (Fig. 7). The germination capacity of *V. calvoana* var. *calvoana* is optimal when the culture medium is at pH 5.6. Pollen of *V. calvoana* var. *calvoana* with white florets and *V. calvoana* var. *microcephala* has their optimum germination percentage at pH 5. The best germination rate for *V. amygdalina* is obtained in a medium at pH 4.6. These results confirm that pH is an important factor which influences pollen germination depending on the species (Youmbi, 1993).

### Pollination system

Investigations of the pollen morphology and physiology of the four *Vernonia* genotypes show that the pollen is matured at the opening of the petals (step I) when the stigma is not yet receptive. These mature pollen grains are then shed and pushed continually out by various developed hairs around the style through a plunger pollination mechanism as described in *Asteraceae* (Judd et al., 1999). It is also known that pollen has a life span of about six to nine hours. *Vernonia* spp. are thus

protandrous. Cross pollination is therefore suitable in order to understand reproduction in these four genotypes but this does not mean that these plants are allogamous (Dierig and Thompson, 1993). It was also observed that the same capitulum contains many florets at different stages of development. It is possible for a stigma of one floret to be fertilized by pollen coming from another floret of the same inflorescence. The possibility for the first floret to be fertilized by pollen from another capitulum of the same plant is not to be rejected in advance. If research study has not proven the possibility of self incompatibility, however, two types of pollination, allogamy and autogamy are achievable.

### References

- Alexander, M.P., 1969. Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain. Technol.* 44(3), 117-122.
- Amorin, W.F., Galetto, L., Sazima, M., 2012. Beyond the pollination syndrome : Nectar ecology and the nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biol. A. Daphni.* 11p.
- Angulo, M.B., Dematteis, M., 2009. Caryological analysis of South American species of *Vernonia* (Vernoniae, Asteraceae). *Plant Biosyst.* 143, 20-24.
- Apabode J.T., Adebooye O.C., 2005. Application of biotechnology for the improvement of Nigerian indigenous leaf vegetables. *Afr. J. Biotechnol.* 4(3), 138-142.
- Bair, R.A., Loomis, W.E., 1941. The germination of maize pollen. *Sci.* 94, 168-169.
- Bedford, F.E., Whittaker, R.J., Kerr, J.T., 2012. Systemic range shift lags among a pollinator species assemblage following rapid climate change. *Bot.* 90(7), 587-597.
- Biholong, 1986. Contribution à l'étude de la flore du Cameroun : Les Asteraceae. These de Doctorat d'universite, Universite de BordeauxIII. 363 p.
- Brewbaker, J.L., Kwack, B.H., 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen growth. *Am. J. Bot.* 50(859), 1069-1083.
- Dematteis, M., Salgado, C.R., 2001. Pollen morphology and chromosome number of *Vernonia rojasii* (Vernoniaeae, Asteraceae) *Comp. Newsl.* 36, 69-73.
- Dierig, D.A., Thompson, A.E., 1993. *Vernonia* and *Lesquerella* potential for commercialization. In: *New Crops* (Eds.: Janick, J. and Simon, J.E.). Wiley, New York. 362p.
- Donfack, M.J.B., Youmbi, E., Nkonmeneck, B.A., 2007. Morphological and *in vitro* germination studies of

- pollen grains in kola tree (*Cola* sp.). Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 20(2), 311-318.
- Ehab, A.R.K. 2001. Chromosome counts and karyological studies on six taxa of the Egyptian Asteraceae. Comp. Newsl. 36, 81-92.
- Erdtman, G., 1952. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. Almavist and Wiskell, Stockolm. 190 p.
- Farombi, O.E., Owoye, O., 2011. Antioxydative and chemopreventive properties of *Vernonia amygdalina* and *Garcinia* biflavonoid. Int. J. Environ. Res. Public Health. 8, 2533- 2555.
- Heslop-Harrison, J., 1977. Aspect of the structure cytochemistry and germination of the pollen of rye (*Secale cereale* L.). Ann. 44, 2-65.
- Jayaprakash, P., Sarla, N., 2001. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Pollen *in vitro*. J. Exp. Bot. 52(357), 851-855.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Steven, P.F., 1999. Plant Systematic A Phylogenetic Approach. Andrew D. Sinauer. 464 p.
- Keeley, S.C., Jones, S.B., 1979. Distribution of pollen types in *Vernonia* (Vernonieae; Compositae). Syst. Bot. 4(3), 195-202.
- Pickert, M., 1988. *In vitro* germination and storage of trinucleate *Arabidopsis thaliana* (L) pollen grains. Botanisches institute. J.W. Goethe-Universitat. 6 p.
- Rossum, V.F., Vereecken, N.J., Bredat, E., Michez, D., 2012. Pollen dispersal and fruit production in *Vaccinium oxycoccus* and comparison with its sympatric congener *V. uliginosum*. Plant Biol. 15, 344–335.
- Siregar, I.Z., Sweet, G.B., 2000. The impact of Extraction and Storage Conditions on the Viability of Radita Pine Pollen. Silva Genetica. 49 p.
- Sy, G.Y., Barbosa, F.S., Wele, A., Gueye, P.M., Gueye, C.D., Cisse, A., Dieye, A., Bassene, E., Faye, B., 2008. Activite anti-hyperglycemiant de la fraction F2 de l'extrait total acetonique de feuilles de *Vernonia colorata* (Compositae). Pharmacop. Med. Tradit. Afric. 15, 6-10.
- Vamosi, J.C., Sargent, R.D., Elle, E., 2012. Pollination effectiveness at a macro-scale. Bot. 90(7), 5p
- Visser, R., 1955. Germination and storage of pollen. Medelingen van de Landbouwschool Wageningen. 55, 1-68.
- Youmbi, E., 1993. Recherches sur la germination *in vitro* des pollens de quelques especes tropicales provenant des collections vegetales vivantes du Museum. Contrôle de la viabilite de certains pollens conserves et stockes dans la banque de pollens du laboratoire de palynologie. Memoire de recherche Post-Doctoral. Universite. 62p.

# Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences



An International Peer Review E-3 Journal of Sciences

Available online at [www.jcbpsc.org](http://www.jcbpsc.org)

**Section B: Biological Sciences**

CODEN (USA): JCBPAT

Research Article

## Agromorphological and Organoleptic Characterization of *Vernonia Calvoana* and *V. Amygdalina*

Nguimkeng Gaintse Eric Dumas <sup>1</sup>, Zapfack Louis <sup>1</sup>, Mbogne Taboula Judith <sup>1</sup>, Temegne Nono Carine <sup>1</sup>, Ntsomboh-Ntsefong Godswill <sup>1,2</sup>, Tonfack Libert Brice <sup>1</sup>, Youmbi Emmanuel <sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> University of Yaounde I, Faculty of Science, Department of Plant Biology, B.P. 812 Yaounde, Cameroon.

<sup>2</sup> Institute of Agricultural Research for Development (IRAD), CEREPAH La Dibamba, BP 243 Douala, Cameroon.

<sup>3</sup> Tissue Culture Laboratory, African Centre for Research on Banana and Plantain (CARBAP), Njombe, Cameroon.

**Received:** 11 October 2016; **Revised:** 23 October 2016; **Accepted:** 27 October 2016

**Abstract:** The objective of this study was to assess agromorphological and organoleptic characters of *Vernonia* accessions. After prospection, survey and sample collection in the Western Region of Cameroon, cuttings of six accessions of *Vernonia amygdalina* and *V. calvoana* were sown in the nursery. Quantitative parameters (12 variables) and flower color (qualitative) were recorded directly in the nursery. Organoleptic characterization allowed to describe the other 2 variables (taste and color of the leaves). The survey revealed that farmers (48 %) of youth ages (45 %) are the most numerous producers of *Vernonia*. The sensory test helped to separate the accessions into three groups (bitter, slightly bitter, not bitter) recognizable by their tastes. Multiple correspondence analysis established 'leaf taste' as main discriminant qualitative criterion. Differences ( $p < 0.01$ ) reflecting phenotypic variability were observed for all quantitative traits. The

coefficients of variation ranged from 4.98% (life span) to 38.06% (leaf surface). PCA confirmed this significant variability (89.98% of the total variation for the first factorial design). Life span, stem height, percentage of stem budding, pollen size, number of leaves and flowers were discriminating quantitative traits of *Vernonia*. These characters were used to organize morphotypes in a dendrogram in two large groups (*V. calvoana* and *V. amygdalina*). *V. calvoana* group was divided into two subgroups (bitter leaves and non-bitter leaves). *V. amygdalina* group contained small and broadleaf bitter morphotypes. This study lays the foundation for an inventory of plant genetic resources of edible *Vernonia* in view of establishing a breeding program.

**Keywords:** Agromorphological characters, organoleptic test, *Vernonia* spp., morphotype, genetic variability.

## INTRODUCTION

The demand for non-timber forest products including *Vernonia amygdalina* is growing because of their many uses. This species, locally consumed as leaf vegetable in Cameroon is one of the ingredients of a famous Cameroonian national dish<sup>1</sup> known as "ndolé". It ranks sixth among leaf vegetables in the food expenditures of Cameroon's urban populations<sup>1</sup>. In southern Benin, it is the second most consumed indigenous leaf vegetable<sup>2</sup> because of its nutritional value and availability. Also called common bitter leaf in agronomists' notebooks, *V. amygdalina* also has several medicinal properties. It is a powerful antibacterial, antidiabetic, antihelminthic, antioxidant, analgesic and anti-malarial remedy<sup>3,4</sup>. However, its food use is limited by the bitter taste of the leaves. Indeed, prior to use, they must first pass through a tedious artisanal transformation process to reduce their bitter taste. The leaves are boiled, crushed and rinsed several times with water.

This process is likely to alter the nutritional and medicinal properties of the plant. However, there are other species which are a bit bitter or not bitter at all, used in the preparation of the same traditional menus. *V. calvoana*, which is less distributed, prefers mountain ecosystem of Western Cameroon. It is part of the indigenous leaf vegetables (ILV) of Cameroon<sup>1</sup>. Less ubiquitous than *V. amygdalina*, its favorite ecosystem is in the mountains<sup>5</sup>. Its leaves are very popular and have for several cultivars the benefit of non-bitter taste of the leaves<sup>6</sup>. In the preparation of ndolé dishes, *V. amygdalina* may be replaced by *V. calvoana*<sup>7</sup>. The latter *Vernonia* is recommended for marketing as non-bitter cultivars, even though there is no established positive correlation between taste and leaf yield<sup>8</sup>. Both *vernonia* which are the subject of this study are domestic and subsontaneous plants<sup>9</sup>.

A considerable number of research studies exist on the nutritional status of edible *Vernonia* while there is little advancement from agronomical and genetic perspectives<sup>10</sup>. Mbinglo<sup>11</sup> noted that there is need for varietal selection. Schippers<sup>12</sup> poses as a hindrance to the development of the culture of this ILV among others, the absence of improved cultivars and adequate production technologies. The existence of wide genetic variability in the genus *Vernonia* was established by Nguimkeng *et al*<sup>13</sup> through the study of pollen of these species. The development of an archaic peasant and urban agriculture on small areas is not sufficient to meet demand for this vegetable.

Large-scale production is imperative. Moreover, standardization is an essential requirement of industrial agriculture. Hence the need to obtain this cultivar with desired characteristics. An inventory of the available genetic resource through collection of accessions is a prerequisite for this approach. If need be, this should precede the development of a breeding program. The objective of this study was to perform agromorphological and organoleptic characterization of two edible *vernonia* species (*V. amygdalina* and *V. calvoana*) from Cameroon.

## MATERIALS AND METHODS

**Prospection and collection of morphotypes:** Collection sites were determined by exploitation of herbarium specimens of the National Herbarium of Cameroon. In fact, the collection sites were only limited around areas with the greatest number of edible *Vernonia* species among herbarium samples. The method for obtaining data and collecting morphotypes consisted of direct talks with farmers and traders randomly selected in three districts in the western region of Cameroon: Alou, Fongo Tongo and Dschang. The survey sample size was 146 respondents. During the study, the proportion of farmers (men and women) practicing cultivation was estimated. The regeneration method, criteria for selection of morphotypes consumed, the ethnopharmacological and socioeconomic data were collected from the surveyed producers.

**Determination of agro morphological characters:** The nursery was established at the experimental farm of the University of Yaounde I following a total randomization design. Cuttings of accessions collected in the field were used as seeds for regeneration of new nursery plants. Agromorphological parameters were recorded directly in the nursery.

The agro-morphological characterization focused on the size and color of the leaves, the color and the number of flowers, number of leaves, stem height, the percentage of germination, percentage of budded stalks, seed germination time (time between the sowing of seeds and the emergence of the radicle), pollen size, the life span (time between the sowing of seeds and the first flowering), and organoleptic features of different morphotypes. Three plants randomly selected from the ten repetitions per morphotype were used to obtain agromorphological parameters. Codes were given to different morphotypes based on the survey results.

**Organoleptic characteristics:** Data on the organoleptic characteristics of the fresh leaves were collected before the onset of flower buds. A sample of 30 tasters aged 25 to 30 years served in the laboratory to determine the organoleptic characteristics of raw leaves of *Vernonia* sp. Each taster was isolated from others to prevent any form of communication (opinion on the taste, attitude of the other after tasting) that could influence the test result. Codes were assigned to the samples to taste and the taster had to enter only the taste and color on a form provided for this purpose.

He was expected to precise on the form whether the leaf was very bitter, bitter, not bitter, sweet or other. The colors that were proposed to the respondents were: dark green, light green and "other". There were several rinses of the mouth with potable water between tastings, were made with five minutes separating two tastings.

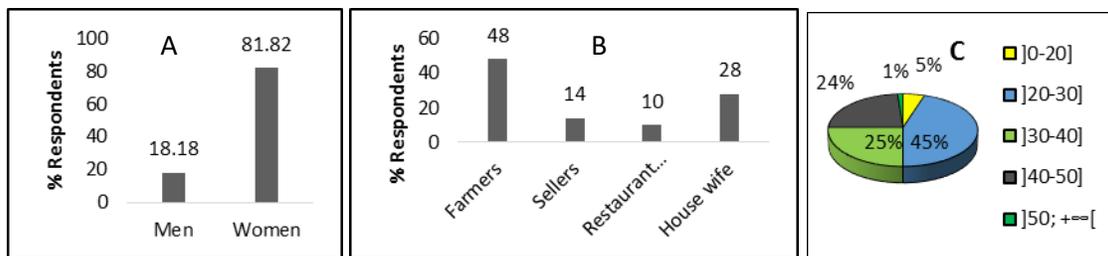
**Data analysis:** The qualitative and quantitative traits were analyzed separately. Descriptive statistics (mean, standard deviation, minimum, maximum, variance and coefficient of variation) was made on quantitative characters. Data on quantitative traits were processed by analysis of

variance (ANOVA) using SAS (Statistical Analysis Software) Version 9.2. Averages were classified using the SNK test (Student and Newman-Keuls) at 5 % threshold in order to group the accessions. Principal component analysis and multiple correspondence analysis were done using the SAS software, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) and Minitab. Pearson correlation test was performed to explore the relationships between quantitative and qualitative traits. Hierarchical cluster tree allowed to group accessions.

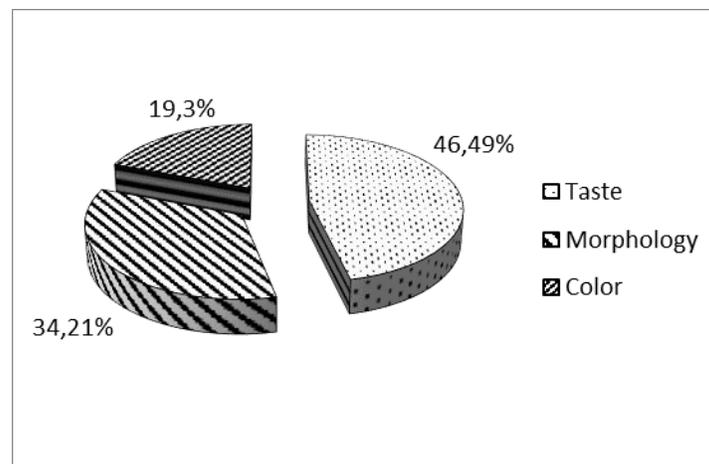
## RESULTS AND DISCUSSION

### RESULTS

**Socio-economic survey:** The respondents were predominantly made up of women. They constituted 81% of the sample, reflecting the same degree of involvement in that foodstuff production activity (**Figure 1.A**). Farmers were the most numerous in the *Vernonia* production chain constituting 48% of respondents against 10% of restaurant promoters and 14% of sellers. The surveyed population was predominantly young (**Figure 1.C**). Young people aged between 20 and 30 years were the most numerous, while individuals over 50 years constituted 1% of the surveyed local population.



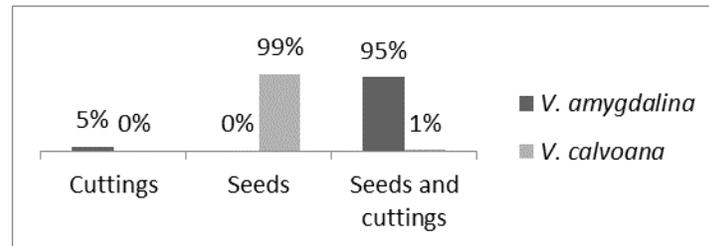
**Figure 1.** Knowledge of respondents. A = Gender; B = Professions; C = Age group.



**Figure 2:** Criteria for recognition of different cultivars of *Vernonia* by local people.

The local population mainly uses three edible *Vernonia* recognition criteria (**Figure 2**). Taste is the most widely used criterion for 46.49% of respondents. It is followed by the leaf morphology with 34.21%.

The leaf color is a recognition criterion for 19.3% of respondents. No respondent acknowledged knowing another criterion for recognition of the different edible taxa. This study also revealed that farmers (99%) use seed as propagation material for *V. calvoana* cultivars (**Figure 3**). Only 1% of farmers said they use cuttings or seeds to multiply the species. Moreover, the technique of cuttings was used by 95% of *V. amygdalina* farmers against 5% who used seed.



**Figure 3:** Regeneration methods used by farmers.

**Sensory Test:** A sensory test was used to group the accessions into three major groups recognized by their tastes (**Table-1**). Morphotypes VAA and VALF of *V. amygdalina* species had a bitter character in common, attributed by 49.91% of tasters. The greatest diversity of tastes was detected in the *V. calvoana* species with two non-bitter morphotypes VCSV and VCSB, a very bitter morphotype VCAV, and a bitter morphotype VCAB. The respective percentages of tasters for these opinions are: 52.38, 69.57, 76.19 and 59.09.

**Table-1:** Frequencies of tasters who assigned some taste to each morphotype

Species	Taste Morphotypes	Very bitter (%)	Bitter (%)	Less bitter (%)	Not bitter (%)	Sweet (%)	Other (%)
		<i>V. amygdalina</i>	VAA	22.73	40.91	27.27	4.54
	VALF	31.82	40.91	22.73	4.55	0	0
<i>V. calvoana</i>	VCAB	18.18	59.09	22.73	0	0	0
	VCAV	76.19	23.81	0	0	0	0
	VCSV	0	0	23.81	52.38	23.81	0
	VCSB	0	8.66	21.74	69.57	0	0

## AGRO-MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION

### Qualitative Characteristics

**Description of qualitative traits which are characteristic to *Vernonia*:** The main distinctive qualitative features of *Vernonia* accessions are presented in **Table-2**. *V. amygdalina* morphotypes have only white colored flowers while those of *V. calvoana* have flowers that can be white or purple. A variability of the leaf blade color is observed in *V. calvoana* (**Table-2**). In fact, the leaves of the latter may be light green or dark green.

The *V. amygdalina* species had mainly light green leaves. The taste of the leaves of *V. calvoana* morphotypes ranges from "not bitter" through "bitter" that is intermediate to "very bitter". The organoleptic test showed that all accessions of *V. amygdalina* are bitter (**Table-2**).

**Table-2:** Qualitative traits that distinguish accessions of *Vernonia*.

Species	Morphotypes	Flower colour	Colour of leaves	Taste
<i>V. amygdalina</i>	VAA	White	Dark green	Bitter
	VALF	White	Light green	Bitter
<i>V. calvoana</i>	VCAB	White	Dark green	Bitter
	VCAV	Purple	Dark green	Very Bitter
	VCSV	Purple	Light green	Not Bitter
	VCSB	White	Light green	Not Bitter

VAA: *Vernonia amygdalina* - bitter; VALF: *V. amygdalina* - broad leaves; VCAB: *V. calvoana* - bitter white florets; VCAV: *V. calvoana* - bitter with violet florets; VCSV: *V. calvoana* - sweet with violet florets; VCSB: *V. calvoana* - sweet with white florets.

**Multiple correspondence analysis:** The multiple correspondence analysis (MCA) shows that the first two axes explain 67.90% of variations, i.e. more than half of the total variation in the germplasm (**Table-3**).

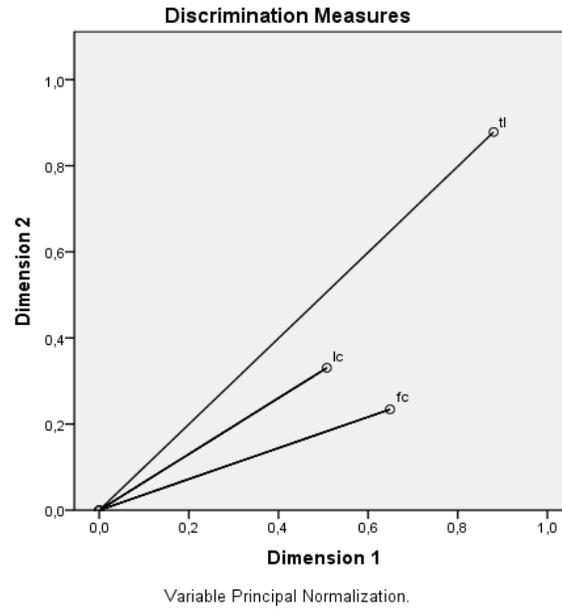
**Table-3:** Inertia associated with the values of qualitative variables.

Model Summary				
Dimensions	Cronbach's Alpha	Variance Accounted For		
		Total (Eigenvalue)	Inertia	% of Variance
1	0.764	2.037	0.679	67.904
2	0.461	1.443	0.481	48.104
Total		3.480	1.160	
Mean	0.638 <sup>a</sup>	1.740	0.580	58.004

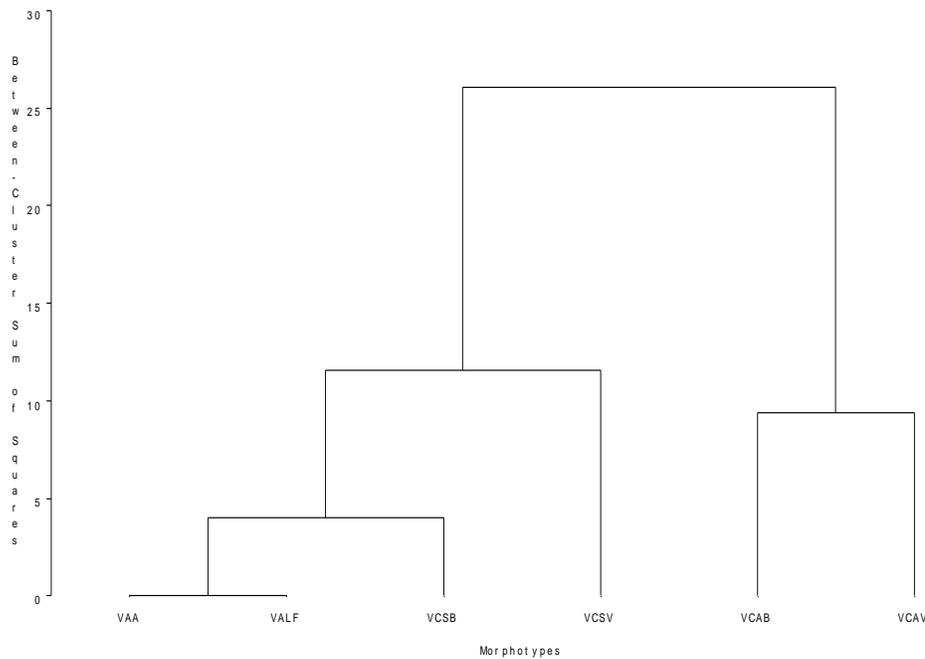
**a. Mean Cronbach's Alpha is based on the mean Eigen value.**

**Table-4:** Discrimination qualitative characters in the first factorial plane.

Discrimination Measures			
	Dimensions		Means
	1	2	
Flower colour	0.649	0.234	0.442
Leaf colour	0.508	0.331	0.419
Taste	0.880	0.878	0.879
Active Total	02.037	1.443	1.740
% of Variance	67.904	48.104	58.004



**Figure 4:** Representation of the variables in the 1-2 factorial design.  
ts: taste of leaves, lc: leaf color, fc: flower color.



**Figure 5:** Dendrometric profile of *V. amygdalina* and *V. calvoana* morphotypes based on qualitative traits.

**VAA:** *Vernonia amygdalina* - bitter; **VALF:** *V. amygdalina* - broad leaves; **VCAB:** *V. calvoana* - bitter with white florets; **VCAV:** *V. calvoana* - bitter with violet florets; **VCSV:** *V. calvoana* - sweet with violet florets; **VCSB:** *V. calvoana* - sweet with white florets.

The three qualitative traits namely, taste (88%), flower color (64.9%) and leaf color (50.8%) are positively and strongly correlated to dimension 1 (**Table-4, Figure 4**). The taste (87.8%) is strongly and positively correlated with dimension 2 of the three qualitative traits studied, taste is thus the most discriminating character of *Vernonia* accessions because it is highly correlated to the two-dimensions by close to 90%. The MCA helped to separate studied morphotypes in two large groups of taxa. One would have expected that each group corresponds to all morphotypes of the same species. But the dendrogram (**Figure 5**) presented the morphotypes VCSB and VCSV of *V. calvoana* species in the same group as AAV and VALF of *V. amygdalina* species. This finding could lead to understand how genetically close the two species are (for features like taste, color of leaves and flowers) even though they are separate. This result also confirms the connection between the VCAB and VCAV morphotypes both belonging to the *V. calvoana* species.

## QUANTITATIVE CHARACTERISTICS

**Descriptive Statistics:** The descriptive analysis of quantitative traits (**Table-5**) show a great variability based on morphotypes. The values of the identified variables from different morphotypes vary from 4-63% for seed germination rates, 6-25 days for seeds germination time, from 3.5 to 40 cm leaf length, 3.5 - 29.5 cm leaf width, 17.73 to 786.67 cm<sup>2</sup> for leaf surfaces, 7-210 florets per head, 40- 90% of budding rate, 10-127 leaves per plant, 180-596 days for the duration of the vegetative cycle, and 16-210 cm for plant height. The diameters of the acetolysed pollen ranged from 44.12 to 72.65 µm for polar diameters and from 41.40 to 69.40 µm for the equatorial diameters. Regarding the taste of the leaves, the proportions ranged from 40 to 76.19% of the respondents with a positive opinion, and, as for the color, 38 to 74% opinions helped determine the color of the leaves of a given morphotype.

**Table-5:** Descriptive statistics of quantitative traits of *Vernonia* accessions.

Variables	Means	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Variance	Coefficient of variation
% Germination	30.78	17.34	4.00	63.00	300.65	29.86
Germination time	14.89	5.44	6.00	25.00	29.63	22.16
Leaf length	19.93	11.03	3.50	40.00	121.76	12.64
Leaf width	10.15	7.73	3.50	29.50	59.73	20.52
Leaf Surface	181.55	220.76	17.73	786.67	48735.80	38.06
Number of flowers	101.11	70.57	7.00	210.00	4980.11	13.76
% Budding	62.78	17.76	40.00	90.00	315.36	13.54
Number of leaves	68.78	41.87	10.00	127.00	1753.36	15.02
Life cycle	278.72	147.10	180.00	596.00	21637.51	4.98
Stem height	80.18	72.48	16.00	210.00	5252.67	14.14
DE pollen	56.98	9.78	41.40	69.40	95.66	5.26
DP pollen	60.65	9.58	44.12	72.65	91.72	5.78

DE: Equatorial diameter; DP: Polar diameter.

**Analysis of variance of quantitative traits:** Table-4 shows the averages of quantitative variables. Very highly significant differences ( $p < 0.001$ ) were observed between the morphotypes for all variables, except time and germination percentage. In fact, for these two variables, taxa differed very significantly from each other ( $P < 0.01$ ).

Overall, seeds of *Vernonia calvoana* germinated significantly better compared to those of *V. amygdalina* with the best germination rate (52%) obtained from the VCAC morphotype.

The appearance of the radicle is significantly faster in *V. calvoana* than in *V. amygdalina*. And sprouting (germination time) is two folds fastest in the VCSB morphotype of *V. calvoana* than among morphotypes of *V. amygdalina* (Table-6).

The leaves of VALF were significantly broader than those of other morphotypes. Leaf surface area of the latter was also the most important. The number of flowers of *V. calvoana* morphotypes was at least 15 times higher than that of *V. amygdalina* morphotypes. Cuttings of *V. amygdalina* morphotypes budded 1.7 times better than those of *V. calvoana* and their stems were 7 times higher than those of *V. calvoana*. Compared to VALF morphotype of *V. amygdalina*, the number of leaves of morphotypes of *V. calvoana* are 7 to 10 times greater (Table-6).

The life cycle of *V. amygdalina* morphotypes is longer than that of *V. calvoana*. Pollens dimensions are statistically identical within each species. However the dimensions of pollen of *V. calvoana* morphotypes are significantly larger than those of *V. amygdalina* morphotypes.

**Correlation test:** The Pearson correlation matrix was used to establish any relationship between quantitative variables (Table-7).

The life cycle was very positively and significantly ( $P < 0.01$ ) correlated with the germination time ( $r^2 = 0.59$ ). It was very significantly ( $P < 0.001$ ) and positively correlated with leaf width ( $r^2 = 0.74$ ), the leaf surface area ( $r^2 = 0.76$ ) and the percentage of budding ( $r^2 = 0.86$ ). However, the life cycle was negatively and very significantly ( $P < 0.001$ ) correlated with the number of florets ( $r^2 = -0.85$ ) and the number of leaves ( $r^2 = -0.86$ ).

Pollen dimensions were positively and very significantly ( $P < 0.001$ ) correlated with the number of leaves and number of florets.

The equatorial diameter and the polar diameter of pollens were respectively positively and very significantly ( $P < 0.001$ ) correlated to the number of leaves ( $r^2 = 0.90$  and  $r^2 = 0.90$ ) and the number of florets ( $r^2 = 0.89$  and  $r^2 = 0.86$ ).

However, pollen dimensions (equatorial and polar diameters) were negatively and highly significantly ( $P < 0.001$ ) correlated to the percentage of budding ( $r^2 = -0.92$  and  $r^2 = -0.89$ , respectively) and the height of the stems ( $r^2 = -0.94$  and  $r^2 = -0.93$  respectively).

Stem height is positively and significantly ( $P < 0.01$ ) correlated with the germination time ( $r^2 = 0.69$ ), but very significantly ( $P < 0.001$ ) correlated to the life cycle ( $r^2 = 0.92$ ) and the percentage of budding ( $r^2 = 0.90$ ). Moreover, the correlation matrix shows very significantly ( $P < 0.001$ ) negative correlation between height of the stem and number of florets ( $r^2 = -0.94$ ) and number of leaves ( $r^2 = -0.91$ ).

**Table-6:** Average values of the variables studied for each morphotype.

Parameters	<i>Vernonia species</i>						P
	<i>V. amygdalina</i>		<i>V. calvoana</i>				
	VAA	VALF	VCAB	VCAV	VCSV	VCSB	
% Germination	35.33±4.16 abc	8.67±4.16 d	15.33±13.45 dc	52.00±13.45 a	43.67±13.05 ab	29.67±10.50 bc	0.001**
Germination time	22.00±3.00 a	18.67±2.08 ab	11.67±4.93 bc	16.67±3.70 abc	11.00±3.00 bc	9.33±2.08 c	0.003**
Leaf length	11.87±1.52 c	35.97±3.65 a	25.80±2.91 b	27.70±2.48 b	11.73±0.93 c	6.50±2.65 c	0.000***
Leaf width	4.20±0.61 c	25.38±3.94 a	10.37±1.25 b	10.97±1.34 b	4.97±1.34 c	5.03±2.22 c	0.000***
Leaf surface area	32.86±2.35 c	614.88±158.39a	179.51±39.02 bc	203.90±43.53 b	38.91±11.38 c	19.26±2.01 c	0.000***
Number of flowers	10.00±2.00 c	9.33±2.08 c	159.00±9.64 a	180.67±26.95 a	121.67±11.06 b	126.00±14.53 b	0.000***
% Budding	83.33±5.77 a	86.67±5.77 a	53.33±5.77 b	53.33±11.54 b	50.00±10.00 b	50.00±10.00 b	0.000***
Number of leaves	17.67±2.51 c	12.00±2.64 c	72.00±4.00 b	102.67±14.22 a	106.33±8.15 a	102.00±8.89 a	0.000***
Life cycle	367.67±17.62 b	565.33±28.38 a	182.33±2.52 c	191.33±2.31 c	185.00±5.00 c	190.67±1.15 c	0.000***
Stem height	168.33±12.06 a	168.67±22.55 a	24.43±9.23 b	32.33±3.06 b	33.50±4.33 b	33.83±2.02 b	0.000***
DE pollen	45.13±3.13 b	43.20±1.91 b	62.30±2.05 a	65.67±3.61 a	64.32±3.71 a	61.24±3.08 a	0.000***
DP pollen	49.54±4.46 b	47.21±4.37 b	64.54±1.73 a	68.77±4.14 a	68.73±3.09 a	65.13±2.28 a	0.000***

Values followed by the same letter are not significantly different at the threshold of 5% according to Student and Newman-Keuls tests. P: probability, \*: significant (p <0.05) \*\* highly significant (p <0.01) \*\*\* very highly significant (p <0.001). VAA: *Vernonia amygdalina* - bitter; VALF: *V. amygdalina* - broad leaves; VCAB: *V. calvoana* - bitter with white florets; VCAV: *V. calvoana* - bitter with violet florets; VCSV: *V. calvoana* - sweet with violet florets; VCSB: *V. calvoana* - sweet with white florets; DE: Equatorial diameter; DP: Polar diameter.

**Table-7:** Correlation test between different distinctive quantitative traits of *Vernonia* accessions.

	a	b	c	D	e	f	g	h	I	j	k	l
% Germination (a)	1	-0.03	-0.39	-0.57*	-0.04*	0.33	-0.48*	0.53*	-0.53*	-0.37	0.52*	0.54*
Germination time (b)		1	0.30	0.24	0.28	-0.61**	0.72**	-0.70**	0.59**	0.69**	-0.57*	-0.55*
Leaf length (c)			1	0.87***	0.88***	-0.05	0.34	-0.36	0.51*	0.30	-0.24	-0.28
Leaf width (d)				1	0.99***	-0.32	0.50*	-0.49*	0.74***	0.50*	-0.48*	-0.50*
Leaf surface area (e)					1	-0.35	0.53*	-0.51*	0.76***	0.53*	-0.49*	-0.52*
Number of flowers (f)						1	-0.81***	0.87***	-0.85***	-0.94***	0.89***	0.86***
% Budding (g)							1	-0.86***	0.86***	0.90***	-0.92***	-0.89***
Number of leaves (h)								1	-0.86***	-0.91***	0.90***	0.90***
Life cycle (i)									1	0.92***	-0.89***	-0.87***
Stem height (j)										1	-0.94***	-0.93***
DE pollen (k)											1	0.98***
DP pollen (l)												1

DE: equatorial diameter, DP: polar diameter. \*: Significant (p <0.05) \*\* highly significant (p <0.01) \*\*\* very highly significant (p <0.001).

**Table-8:** Eigenvalues obtained for the fourteen variables analyzed.

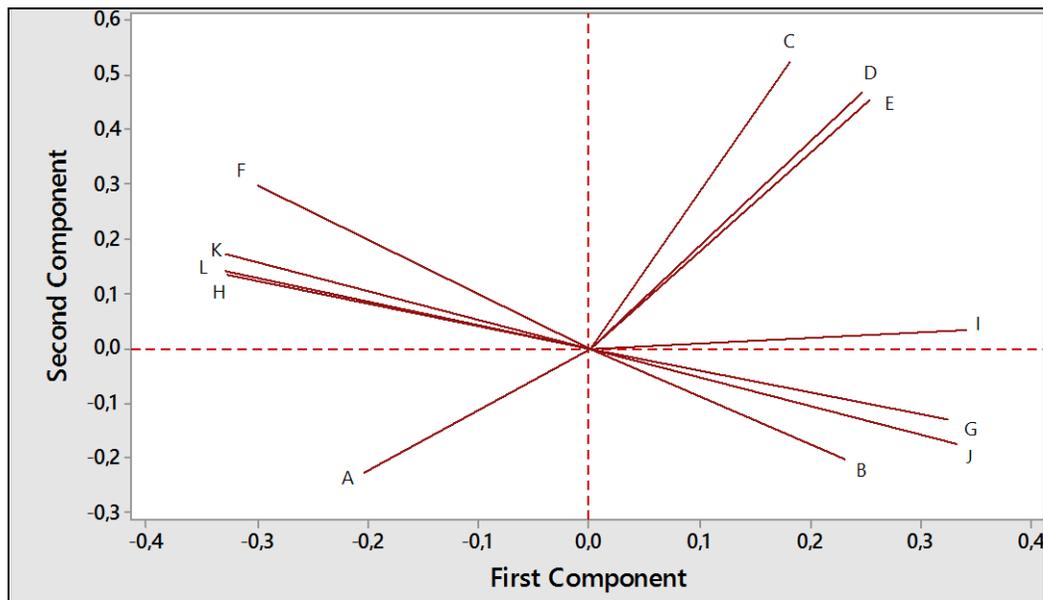
<b>Eigenvalues of the Correlation Matrix</b>				
	<b>Eigenvalue</b>	<b>Difference</b>	<b>Proportion</b>	<b>Cumulative</b>
1	8.5843	6.3714	0.7154	0.7154
2	2.2129	1.3054	0.1844	0.8998
3	0.9075	0.6311	0.0756	0.9754
4	0.2763	0.2573	0.0230	0.9984
5	0.0190	0.0190	0.0016	1.0000
6	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
7	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
8	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
9	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
10	-0.0000	0.0000	-0.0000	1.0000
11	-0.0000	0.0000	-0.0000	1.0000
12	-0.0000	0.0000	-0.0000	1.0000

**Principal Component Analysis:** The Kaiser criterion stipulates that the axes whose values are greater than 1 should be retained. By this criterion, the first two axes were preserved. Their values are 8.58 and 2.21 respectively (**Table-8**). These two axes represent 89.98% of the share information which is more than half of the total variation in the plant material; only these two main axes are shown. According to the “elbow criterion”, the first two axes are also preserved. For this criterion, on the screen of values, there is a step (elbow) followed by a steady decline; only axes before the “elbow” are selected.

**Table-9:** Coefficients of the vectors associated with the first two axes.

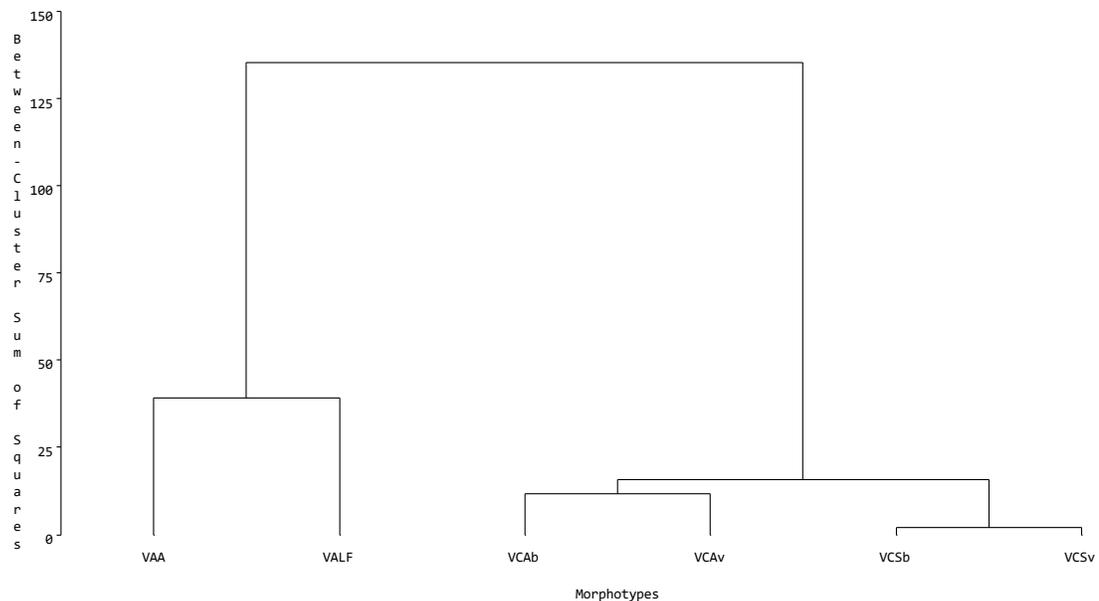
Traits étudiés	Factor1	Factor2
% Germination	<b>-0.59687</b>	-0.38292
Germination time	<b>0.76497</b>	-0.29864
Leaf length	<b>0.51449</b>	<b>0.77434</b>
Leaf width	<b>0.69438</b>	<b>0.70289</b>
Leaf surface area	<b>0.72283</b>	<b>0.67291</b>
Number of flowers	<b>-0.88091</b>	0.40594
% Budding	<b>0.97245</b>	-0.21533
Number of leaves	<b>-0.95925</b>	0.16763
Life cycle	<b>0.97680</b>	0.07306
Height of stem	<b>0.96264</b>	-0.25250
Equatorial Diameter of pollen	<b>-0.95723</b>	0.26901
Polar Diameter of pollen	<b>-0.96671</b>	0.22339

**Relationship between agro-morphological attributes:** The closer the value is to 1, the better the representation. Life cycle (97.68%), percentage of budding (97.25%), stem height (96.26%), germination time (76.50%), leaf surface area (72.28%), width of leaf (69.44%) and length of the leaf (51.45%) are positively correlated with axis 1 (**Table-9, Figure 6**). The polar diameter of pollen (-96.67%), the equatorial diameter of pollen (-95.72%), the number of leaves (-88.09%) and germination rate (-59.69%) are negatively correlated to the axis 1. The leaf length (77.43%), leaf width (70.29%) and leaf surface area (67.29%), are positively correlated with axis 2 (**Table-9, Figure 6**). Axis 1 gives information on the characteristics of pollen, germination parameters, and plant architecture (**Table-9**). The dimensions of *Vernonia* leaves (the length of the leaf, the width of the leaf and leaf area) are positively correlated to the two main axes. However, the variables: life cycle, stem height, percentage of budded stems, pollen size, number of leaves and flowers are highly correlated to axis 1 for approximately 90%. These variables can be considered as the main discriminating criteria of *Vernonia*. To better appreciate the agro-morphological diversity of main *Vernonia* morphotypes in Cameroon, an ascending hierarchical clustering (AHC) helped to obtain a dendrogram which separated morphotypes into statistically homogeneous classes based on 12 quantitative parameters assessed (**Figure 7**). The dendrogram shows two large groups of ‘similar’ *Vernonia*: the group of *V. amygdalina* with low genetic basis and the group of *V. calvoana* with a broader genetic base.



**Figure 6:** Representation of quantitative variables in the factorial design 1-2.

% Germination = A, germination time = B, Length of leaf = C, width of leaf = D, Surface area of leaf = E, Number of flowers = F, % budding = G, Number of leaves = H, life cycle = I, stem height = J, pollen equatorial diameter = K, pollen polar diameter = L.



**Figure 7:** Dendrogram of *Vernonia* morphotypes based on 14 quantitative traits.

**VAA:** *Vernonia amygdalina* - bitter; **VALF:** *V. amygdalina* - broad leaves; **VCAB:** *V. calvoana* - bitter with white florets; **VCAv:** *V. calvoana* - bitter with violet florets; **VCSv:** *V. calvoana* - sweet with violet florets; **VCSb:** *V. calvoana* - sweet with white florets

The group of *V. calvoana* is divided into two subgroups:

- The subgroup of *V. calvoana* with bitter leaves (VCAB and VCAv);
- The subgroup of *V. calvoana* with non-bitter leaves.

The groups of *V. amygdalina* has 2 morphotypes:

- Bitter Morphotype with small leaves (VAA)
- Bitter morphotype with broad leaves (VALF).

## DISCUSSION

The survey results revealed that bitterleaf is mainly cultivated by women (81.82%). Similar observations have been reported for various local vegetables in various parts of Africa, including Cameroon<sup>14</sup>, Benin<sup>2</sup> and India<sup>15</sup>. Farmers are the most numerous in the production chain of bitterleaf (48%). This result can be explained by the fact that most sellers are simultaneously producers. It also reflects the idea that people are not yet seeing this as a source of income. The surveyed population is mostly youth, probably reflecting the composition of the population and this confirms the fact that Cameroon's population is predominantly young. About 50% of respondents identify *Vernonia* by the taste of the leaves. Schippers<sup>12</sup> asserts that the varietal selection criteria used by farmers at transplanting is the taste. The plants with least bitter taste are sought for consumption. Farmers use cuttings as propagation material for *V. calvoana* and *V. amygdalina* cultivars. This result confirms the observation made by Schippers<sup>12</sup>.

It could help to predict the existence of a greater diversity of morphotypes in *V. calvoana* than in *V. amygdalina*. Indeed, the reproduction of commonly sought morphotypes would be easier for the latter species with the cuttings technique. Morphotypes deemed less desirable from an agronomic perspective might have been phased out progressively. Dissemination by seeds carried out in the *V. calvoana* species must have allowed genetic mixing and preservation of its diversity. The organoleptic test allowed to separate accessions into three groups with greater variability in *V. calvoana*. This intra-specific diversity highlighted through the taste of the leaves and which was already suggested through the characterization of pollen by Nguimkeng *et al*<sup>13</sup> could lead to predict high genetic variability revealed by a phytotaxonomic and agromorphological study.

Variability was observed for flower color, leaf color and taste of the leaves of different accessions of *Vernonia*. This variability in observed traits (phenotype) not only reflects the genetic composition of morphotypes. It may also reflect the interaction between genotype and environment (genotype x environment) in which it is expressed<sup>16</sup>.

Qualitative traits which are usually genetically controlled are considered the most important traits to identify a particular accession of a plants. However, they are somewhat independent of the environmental response<sup>17</sup>. The majority of the tested *Vernonia* accessions are bitter. One might think that these species are appreciated for their bitterness. However, it is not clear why consumers submit leaves to maceration process and artisanal extraction of metabolites with water to reduce bitterness before their use in various menus. Indeed, the desired sensory quality depends on the use of the leaves. As a local leafy vegetable, the less bitter morphotypes are sought for and recommended for marketing<sup>8</sup>.

Furthermore, the bitterness of vegetables may be due to the presence in their tissues of several secondary metabolites which should provide the nutritional and antimicrobial properties<sup>18</sup>. The inventory of plant genetic resource of *vernonia* should not only consider its organoleptic qualities such as the bitter taste of the leaves. It should also consider the medicinal properties conferred by the diversity of its molecules. It is for this reason that varietal selection should not be based solely on the taste of the leaves but also on the composition of these leaves. The aim could be to improve the nutritional properties<sup>19,20</sup>, the exploitation of therapeutic compounds<sup>21</sup>, or increasing yield of leaves, etc. With regards to quantitative traits, a large variability was also observed between the *V. amygdalina* and *V. calvoana* accessions. The existing genotypic difference could explain this result. The coefficients of variation were from 5.78% (polar diameter of pollen) to 29.86% (% germination). The high coefficients of variation (> 20%) observed for some traits studied (germination percentage, germination time, leaf width, leaf area) indicate the presence of a high heterogeneity among characterized accessions<sup>17</sup>.

This heterogeneity can be exploited in improving *Vernonia*. The number of leaves of a morphological type determines the number of flowers and the percentage of germination of this morphotype. These results could mean that morphotypes each have a period of maturation that determines the height of their stems. The distinction between two morphotypes should therefore consider several quantitative variables. This highlights the fact that most farmers focused their attention on the qualitative characteristics such as taste of the leaves and leaf color. However, quantitative traits are valuable yield evaluation tool that should also be considered in breeding.

## CONCLUSION

This work lays the foundation for an inventory of plant genetic resources of edible *Vernonia*. These local multipurpose leafy vegetables are increasingly cultivated and are a source of income. Agromorphological characterization performed in this work highlighted six distinct *vernonia* morphotypes. The taste of leaves, the life cycle, the height of the stem, the percentage of stem budding, the size of pollen, the number of leaves and flowers are the best discriminating criteria of the different morphotypes. Other variables reflect mainly the rich intraspecific and interspecific genetic diversity. Further studies in chemotaxonomy and molecular systematics would highlight this genetic diversity.

## REFERENCES

1. R. Kahane, L. Temple, P. Brat, D.H. Bon. Les légumes Feuilles des pays tropicaux: diversité, richesse économique et valeur sante dans un contexte très fragile. Colloque Angers. 2005, 8.
2. S.E. Vodouhe, R.C. Tossou, M.M. Soumanou. Perception des consommateurs sur la qualité nutritionnelle et sanitaire de quelques légumes feuilles locaux produits dans la zone côtière du Sud-Benin. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Benin*. 2012, 13-23. <http://www.slire.net>.
3. A.N. Anoka, A. Bulus, G.A. Amo, B. Dominic, D. Sylvia, R.B. David. The analgesic and antiplasmodial activities and toxicology of *V. amygdalina*. *Journal of Medicinal Food*. 2008. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2007.0511> PMID: 18800909.
4. C.H. Wazis, S.Y. Timothy, S.G. Zakama, H.J. Balla, I.D. Maspalma. Phytochemical screening and purgative activity of Ethanolic extracts of *Vernonia amygdalina* Del. Leaf. *Int. J. Res. Ayur. Pharm.* 2013, 4 (1): 46-49.
5. M. Biholong. Contribution à l'étude de la flore du Cameroun. Les Asteraceae. Thèse de Doctorat d'Université de Bordeaux III, Bordeaux, France. 1986, 354.
6. H. Dupriez & De Leener Ph. Jardins et vergers d'Afrique. Paris: CTA-LHarmattan-APICA- ENDA.TERRE ET VIE. 1987, 354.
7. G.J.H. Grubben & O.A. Denton (Editeur). Ressources végétale de l'Afrique tropicale 2. Légumes. [Traduction de Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables. 2004]. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas/ Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas/ CTA, Wageningen, Pays-Bas. 2004, 737.
8. A.M. Mih, K.R. Tonfack, L.M. Ndam. Morphological Characterization of Four Selections of *Vernonia hymenolepis* A. Rich (Asteraceae). *World J. Agric. Sci.* 2008, 4 (2): 220- 223.
9. H. Tabuna. Evaluation des échanges des produits forestiers non ligneux entre l'Afrique subsaharienne et l'Europe. [Internet] FAO, Rome, Italy. 2000. <http://www.fao.org/DOCREP/003/X6612F/x6612f00.htm>. 2 March 2004.

10. J.T. Opabode, O.C. Adebooye. Application of biotechnology for the improvement of Nigerian indigenous leaf vegetables. *Afr. J. Biotchnol.* 2005, **4** (3), 138-142.
11. S. Mbinglo. Survey on the production of bitterleaf, *Vernonia* spp. In Bamenda, north-western Cameroon. Rapport de l'Université de Dschang/ NRI. 1998.
12. R.R. Schippers. Legumes africains indigenes. Presentation des especes cultivees. Margraf Publishers GmbH. Scientific book. 2004, 57-72.
13. G.E.D. Nguimkeng, L. Zapfack, L.B. Tonfack, G. Ntsomboh-Ntsefong, E. Youmbi. Morphological and physiological characterization of some *Vernonia* spp. pollen genotypes in Cameroon. *I. J. C. R. B. Plant Biol.* 2015, **2** (9): 7-15.
14. T.J. Mbogne, E. Youmbi, I. Balogoun, G. Ntsomboh-Ntsefong. Agomorphological, Chemical, and Biochemical Characterization of Pumpkin (*Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata*, *Cucurbitaceae*) Morphotypes Cultivated in Cameroon. *Research in Plant Sciences.* 2015, **3** (1): 12-17.
15. K. Bargali, Vibhutsi, C. Shahi. Contribution of Rural Women in Vegetable Cultivation in Homegardens of Nainital District, Kumaum Himalaya, India. *Curr. Agri. Res.* 2015, **3** (2), 91-100.
16. K. Noerwijati, T. Nasrullah & P. Djoko. Breeding value estimation of fifteen related cassava genotypes using blup. *J. Agrit. Biol. Sci.* 2013, **8** (4): 317-321.
17. N.C. Temegne, B.I. Mouafor & A.F. Ngome. Agro-morphological Characterization of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Collected in the Humid Forest and Guinea Savannah Agro-ecological Zones of Cameroon. *Greener J. Agric. Sci.* 2016, **6** (7): 209-225. DOI: <http://doi.org/10.15580/GJAS.2016.8.062716107>.
18. R.T. Kutsukutsa, E. Gasura, S. Mabasa, E. NgadzeX. Variability in condensed tannins and bitterness in spider plant genotypes. *African Crop Science Journal.* 2005, **22** (4): 275-280.
19. H.N. Fube & B. Djonga. Tropical vegetables in human nutrition: a case of ndolé (bitterleaf) *Vernonia calvoana* Hook. *Acta Horti.* 1987, **198**: 199–206.
20. G.O. Igile, W. Oleszk, S. Burda & M. Juryzsta. Nutritional Assesment of *V. amygdalina* Leaves in Growing Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1995, **93**: 2162-2166.
21. N.C.A. Sobrinko, B.E. Souza, S.D.O.R. Fontenelle. A review on antimicrobial potential of species of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Academic Journals.* 2015, **9** (31): 838-850.

**\*Corresponding author: Youmbi Emmanuel;** University of Yaounde I, Faculty of Science, Department of Plant Biology, B.P. 812 Yaounde, Cameroon.