

# UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



ECOLE DOCTORALE PHYSIQUE CHIMIE SCIENCES  
DE LA TERRE DE L'UNIVERS ET DE L'INGENIEUR

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2016      N° d'ordre : 28

## THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie Moléculaire Option Organique

Présentée par :

**M. Ndiak NDIAYE**

*Maître ès Sciences Physiques*

***Titre:** Mise au point de protocoles d'extraction de l'azadirachtine à l'échelle du laboratoire et semi-industrielle (pilote). Purification, dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) de la teneur en Azadirachtine-A (Aza-A) dans les fruits de neem de différentes régions du Sénégal. Impact des facteurs pédoclimatiques sur la production en Aza-A dans les fruits.*

Soutenue le 28 Octobre 2016 devant le jury composé de :

**Président :** M. Mohamed Lamine GAYE Professeur Titulaire des Universités **FST- UCAD**

**Rapporteurs :** M. Abdoulaye SAMB      Professeur Titulaire des Universités **FST – UCAD**

M. Jean- Marc PONS      Professeur Titulaire des Universités **AMU – France**

M. Abdoulaye DIOP      Professeur Titulaire des Universités **FST-UCAD**

**Examineurs :**

Mme Moussoukhoye S. DIOP Professeur Titulaire des Universités **FST UCAD**

M. Kandoura NOBA      Professeur Titulaire des Universités **FST – UCAD**

**Directeur de thèse :** M. Bocar Sally GALLEDU    Maître de Conférences **FST – UCAD**

**Co – Directeur de thèse :** M. Jean-Luc PARRAIN    Directeur de Recherche **CNRS - France**

Cette thèse en co-direction a été effectuée entre le Laboratoire de Chimie Organique et Informatique (LCOI) de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar Dirigé par le Professeur Bocar Sally GALLEDU et le Laboratoire StÉRÉO de l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (ISM2) de l'Université Aix-Marseille France, sous la direction du Prof Bocar S. GALLEDU et Dr Jean-Luc PARRAIN.

# Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier le **Professeur Bocar Sally GALLEDU** Directeur du **Laboratoire de Chimie Organique et Informatique (LCOI)** pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour ses conseils précieux, ses prières, ses soutiens et sa très aimable disponibilité. Il est, et restera un père pour moi. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je m'en voudrais de ne pas citer aussitôt le laboratoire **StÉRÉO**, notamment le **Docteur Jean-Luc PARRAIN** co-directeur de cette thèse pour son accueil, sa collaboration et ses précieux conseils très déterminants dans la conduite et l'aboutissement de mes travaux de recherches et le **Docteur Virginie HERAN** qui a assuré de très près le suivi des travaux. Elle m'a donné la formation à l'utilisation des appareils d'analyses (RMN, HPLC, Masse, Biotage) : merci du fond du cœur à vous tous.

Merci infiniment au **Professeur Mohamed Lamine GAYE** pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, également pour son soutien scientifique.

Un merci particulier au **Professeur Jean-Marc PONS** qui dès mon premier séjour à Marseille m'avait autorisé à suivre les cours de Master 2 *Chimie Organique, Chimie Verte, Chimie du Vivant*, pour une mise à niveau de mes connaissances en chimie. Merci également pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse ma respectueuse reconnaissance à Messieurs les Professeurs **Abdoulaye SAMB, Abdoulaye DIOP, Kandioura NOBA** et **Moussoukhoye S. DIOP** pour avoir accepté de juger ce travail ; merci infiniment chers professeurs vous qui m'avez enseigné et servi de références depuis mes premiers pas à l'université.

Je remercie tous les permanents de l'équipe **StÉRÉO** et les Doctorants avec qui j'ai séjourné au laboratoire.

Merci à **Mme Silvie BERNARD** pour l'assistance qu'elle m'a toujours apportée dans les préparatifs de mes voyages.

J'adresse ma respectueuse reconnaissance aux responsables de l'Ecole Centrale de Marseille qui nous ont permis de faire les expériences semi industrielles avec le pilote de l'Ecole. Merci aux deux techniciens du pilote **Mireille ARGEME** et **Karim**.

Je dis merci à **Reine Marie Haby DIA** qui est une sœur et une coéquipière au Laboratoire de **Chimie Organique et Informatique (LCOI)**.

Merci à tous mes professeurs du Département de Chimie et aux personnels administratifs et techniques de la Faculté des Sciences et Techniques de Dakar - Sénégal.

Merci au **Professeur Ibrahima NDIAYE** Chef du Département de Chimie pour ses conseils et encouragements.

Je dis merci à tous mes frères et sœurs particulièrement à **Mamour NDIAYE** : l'aîné de la famille qui nous a toujours servi de référence.

Je remercie ma famille d'accueil à Dakar pour son soutien.

Merci à ma belle famille DIOP ; particulièrement à mon regretté beau père **M. El Hadji Bira Fall DIOP** qui, à chaque fois, me prodiguait des conseils. Qu'Allah l'accueille dans son paradis !

Merci à tous mes amis d'enfance (**Mbagnick TOP, Ousmane CAMARA, Moussa SOUMARE, Abdoulaye SOUMBOUNDOU**) et de l'Université (**Mouhamadou A. DIALLO, Modou LO, Djibril DIOUF, Olivier M. MBAYE, Mouhamed L. SALL, Insa SECK, Birane CISSE, Cheikh FAYE, Amadou L. DIOUF, Saliou NDIAYE**).

Merci à tous mes aînés du Département : **Dr Adama SY, Dr Pape A. GAYE, Dr Ibrahima THIAM, Dr Mouhamadou M. SOW, Dr Alioune FALL, Dr S. Falou POUYE, Dr Pape A. DIAW, Dr Diéne D. THIARE, Dr Birame NDIAYE, Dr Tidiane DIOP**.

Merci aux deux secrétaires du Département **Anna F. BADJI** et **Diabel DIAW**.

Merci à **Ahmeth GASSAMA, Boubacar BAH** et **Momar TOURE**, pour votre hospitalité : vous vous êtes bien occupés de moi lors de mes premiers jours à Marseille.

Merci à **Mama T. GALLEDU** pour toutes ces sorties que tu m'as gracieusement offertes pendant mes séjours à Marseille.

Merci à l'**Ambassade de la France** au Sénégal pour avoir financé tous mes séjours en France.

## Dédicace

**Dieu merci “ALHAMDOULILAH” Lui qui m’a donné la force d’accomplir ce travail.**

**Je dédie ce travail à :**

- **ma Maman Maréme CISSE : une maman qui a toujours bien veillé sur les études de ses enfants ; merci du fond du cœur Maman ! que le Bon Dieu t’accorde longue vie et santé,**
- **mon Père Doudou NDIAYE : un papa qui s’est toujours donné pour que ses enfants ne manquent de rien,**
- **mes Tantes :Sokhna SECK et Fatou SAGNA,**
- **ma femme qui m’a toujours apporté son soutien et mon fils aîné Mamour NDIAYE à qui je dis longue vie, santé et beaucoup de courage pour dépasser ton père qui a fait ses modestes preuves.**

<b>Introduction générale</b> .....	15
1. Contexte .....	17
2. Objectifs .....	18
<b>Revue Bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1 : présentation du Sénégal, étude pédoclimatique des régions d'études</b> .....	21
I.1. Informations générales sur le Sénégal.....	22
I.1.1. Situation géographique du Sénégal.....	22
I.1.2. Relief .....	23
I.1.3. Climat .....	23
I.1.4. Végétation .....	24
I.1.5. Hydrographie .....	25
I.1.6. Population .....	25
I.1.7. Economie .....	26
I.2. Description des conditions pédoclimatiques des régions de collectes des graines dans cette étude.....	28
I.2.1. La Région Dakar.....	29
I.2.1.1. Climat et Humidité .....	29
I.2.1.2. Température.....	29
I.2.1.3. Pluviométrie .....	29
I.2.1.4. Les sols de la Régions .....	29
I.2.2. La région de Thiès .....	30
I.2.2.1. Climat et Température .....	30
I.2.2.2. Pluviométrie.....	31
I.2.2.3. Humidité de la région.....	31
I.2.2.4. Les sols de la région.....	31
I.2.3) La région de Louga.....	32
I.2.3.1. Climat et Température.....	32
I.2.3.2 Pluviométrie .....	32
I.2.3.3. Les sols .....	32
I.2.4. La région de Diourbel.....	33

I.2.4.1. Climat et Température.....	33
I.2.4.2. La pluviométrie.....	33
I.2.4.3. Les sols de la Région de Diourbel.....	33
I.2.4.4. La commune de Touba.....	34
I.2.5. La région de Matam.....	35
I.2.5.1. Pluviométries.....	35
I.2.5.2. Température et humidité.....	35
I.2.5.3. Les sols de la région de Matam.....	35
I.2.6. La Région de Tambacounda.....	36
I.2.6.1. Le climat.....	36
I.2.6.2. La pluviométrie.....	36
I.2.6.3. Les températures .....	37
I.2.6.4. L'insolation .....	37
I.2.6.5. L'humidité relative et l'évaporation.....	37
I.2.6.6. Les Sols de la Région de Tambacounda.....	37
I.2.7. La région de Kaolack.....	38
I.2.7.1. Climat et humidité relative.....	38
I.2.7.2. Température.....	38
I.2.7.3. Pluviométrie .....	38
I.2.7.4. Les sols de la Région de Kaolack.....	39
I.2.8 Ressources en Neem du Sénégal et la Répartition géographique.....	39
<b>Chapitre 2 : Plantes phytochimiques : le Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss) et ses multiples vertus.....</b>	<b>41</b>
II.1. Les origines de l'utilisation des produits naturels dans la lutte contre les insectes.....	42
II.1.1 Utilisation de l'huile de neem dans la lutte contre les ennemis de cultures.....	47

II.1.1.1 Effets de l'huile de neem sur les cellules de l'intestin moyen des larves prédatrices <i>Ceraeochrysa claveri</i> .....	47
II.1.1.2. Activité acaricide de l'huile et quatre de ses sous composés séparés par chromatographie sur colonne.....	47
II.1.1.2.1. Extraction et fractionnement.....	48
II.1.1.2.2. Dosage in vitro de l'activité acaricide.....	48
II.1.1.2.3.) Evaluation de la toxicité .....	49
II.1.1.3.) La bio-efficacité du neem dans la lutte phytochimique antiparasitaire en agriculture : <i>Spodoptera littoralis</i> .....	51
II.1.2. Les principales cultures et ravageurs rencontrés au Sénégal.....	52
II.1.3. La lutte apportée aux ravageurs.....	53
II.1.3.1. La lutte chimique.....	53
II.1.3.2. L'utilisation des huiles essentielles.....	55
II.1.3.3. l'utilisation des plantes insecticides.....	55
II.2. Le Neem : Chimie et Principe actifs.....	57
II.2.1. Description de l'arbre.....	58
II.2.2. Caractéristique botanique du Neem.....	59
II.2.3. Développement des fruits de Neem.....	59
II.2.4.) Formation des limonoïdes.....	64
II.2.4.1. Par biosynthèse.....	64
II.2.5. Méthodes d'obtention de l'Azadirachtine – A.....	67
II.2.5.1. Synthèse organique de l'Azadirachtine –A.....	67
II.2.5.1.1. Synthèse de Ley et al.....	68
II.2.5.1.2. Synthèse de Murai et al.....	69
II.2.5.2. Procédés d'extractions de l'azadirachtine à l'échelle du laboratoire et semi industrielle.....	70
II.2.5.2.1. Extraction de l'Azadirachtine des graines de Neem selon la méthode Yamasaki et al .....	71

II.2.5.2.2. Extraction de l'Azadirachtine des graines de Neem selon la méthode Sharma et al.....	71
II.2.5.2.3. Extraction de l'Azadirachtine des graines de Neem selon la méthode Dai et al.....	72
II.2.6. Mode d'action de l'Azadirachtine-A.....	73
II.2.7. Relation structure – activité.....	75
II.2.8. Etude de la stabilité de la molécule d'Azadirachtine-A.....	76
II.2.9. Ecotoxicologie du Neem.....	79
II.2.10. Propriétés médicinales du neem.....	80
II.2.10.1. Composés de Neem comme agents potentiels pour la prévention du cancer et le traitement.....	80
II.2.10.1.1. Les composants de Neem inhibent la prolifération des cellules du cancer .....	80
II.2.10.1.2. Les effets des composants du neem sur la mort des cellules cancéreuses.....	82
II.2.10.1.3. Synthèse de nanoparticules d'argent antibactériens en utilisant une solution aqueuse de gomme de neem ( <i>Azadirachta indica</i> ).....	84
II.2.10.1.4. L'utilisation de l'huile de neem en cosmétique....	85
II.2.11. Utilisation du tourteau de neem dans l'alimentation du bétail.....	85
II.2.11.1. Le tourteau de neem aliment de poulet.....	87
II.2.12. L'utilisation du tourteau de neem comme fertilisant : Engrais.....	90
II.2.13. Le neem source de biocarburant.....	90
II.2.13.1. Production de biodiésel à base d'huile de neem.....	90
II.2.13.1.1. Les raisons du remplacement des carburants dérivés du pétrole.....	90
II.2.13.1.2. L'huile de neem une source alternative.....	91
II.2.13.1.3. Méthode de production du biodiésel ( <i>Ali et al .2013</i> ).....	92

## **Partie Expérimentale :**

<b>Chapitre 3 : Rappels des techniques d'extractions et d'analyses ; collecte de graines de neem (Azadirachta indica).....</b>	<b>95</b>
III.1. Rappels des techniques d'extraction et d'analyse.....	96
III.1.1. Les techniques d'extraction.....	96
III.1.1.1. L'extraction solide/liquide.....	96
III.1.1.1.1. L'Extraction par agitation.....	96
III.1.1.1.2. L'Extraction au soxhlet.....	97
III.1.1.1.2.1.) Description du montage de l'extraction au soxhlet.....	97
III.1.1.2. l'extraction par fluide liquide et supercritique.....	98
III.1.1.2.1. Description de la technique.....	99
III.1.1.3. L'extraction liquide/liquide.....	101
III.1.1.3.1. description de la technique.....	101
III.1.2. Les techniques d'analyses.....	102
III.1.2.1. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	102
III.1.2.1.1. Principe de la RMN.....	103
III.1.2.1.2. Description de le technique de la RMN.....	103
III.1.2.2. La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).....	104
III.1.2.2.1. Principe de la CLHP.....	105
III.1.2.2.2. Description de la technique CLHP.....	105
III.2. La collecte des fruits de Neem.....	106
III.2.1. Collecte dans la région de Dakar.....	106
III.2.2. Collecte dans la région de Thiès.....	107
III.2.3. Collecte dans la région de Louga.....	109
III.2.4. Collecte dans la région de Diourbel.....	109
III.2.4.1. Collecte dans la commune de Diourbel.....	109
III.2.4.2. Collecte dans la commune de Touba.....	111
III.2.5. Collecte dans la région de Matam.....	111
III.2.6. Collecte dans la Région de Tambacounda.....	112
III.2.7. Collecte dans la région de Kaolack.....	112

<b>Chapitre 4</b> : Extraction et dosage de la teneur en Azadirachtine-A (Aza-A) dans les fruits de neem des régions de collectes.....	113
IV.1. Procédure d'extractions.....	114
IV.1.1. Broyage des amandes.....	114
IV.1.2. Détermination de la teneur en huiles dans les fruits de neem.....	114
IV.1.3. L'extraction de l'Aza-A.....	115
IV.1.3.1. Extraction de l'Aza-A dans l'huile de neem.....	115
IV.1.3.2. Extraction de l'Aza-A dans le tourteau.....	115
IV.2. Dosage de l'Aza-A.....	119
IV.2.1. Préparation de l'étalon d'Aza-A.....	119
IV.2.1.1. Purification par chromatographie flash automatisé .....	119
IV.2.1.2. Purification à la CLHP préparatrice.....	123
IV.2.2. Détermination de la droite d'étalonnage.....	131
IV.2.3. Autres méthodes de purifications tentées.....	132
IV.2.3.1. La méthode par précipitation.....	132
IV.2.3.2. Purification sur colonne de micro-silice.....	135
IV.2.3.3. Purification par recristallisation.....	137
IV.2.4. Résultats des dosages de l'Aza-A pour les différentes régions de collecte.....	138
IV.2.4.1. La région de Dakar.....	138
IV.2.4.2. La région de Thiès (Commune de Tivaoune).....	139
IV.2.4.3. La région de Diourbel.....	139
IV.2.4.4. La région de Louga.....	139
IV.2.4.5. La région de Matam.....	140
IV.2.4.6. La région de Kaolack.....	140
IV.2.4.7. La région de Tambacounda.....	140
IV.2.4.8. Analyse des résultats des dosages de l'Aza-A pour les différentes régions de collectes.....	140
IV.3. Influence de la granulométrie sur les rendements d'extraction en Aza-A .....	141

IV.3.1. Répartition granulométrique.....	141
IV.3.2. Extraction et quantification de l'Aza-A.....	143
IV.3.2.1. Résultats de l'extraction.....	143
IV.4. Influence du rapport MeOH/H <sub>2</sub> O sur l'extraction de l'Aza-A.....	146
IV.4.1. Résultats d'extraction.....	146
IV.5. Influence du rapport volume solvant d'extraction / masse de tourteau sur l'extraction de l'Aza-A.....	147
IV.5.1. Résultats des extractions.....	148
IV.6. Impact de la durée d'agitation (ou extraction) sur le rendement en Aza-A.....	149
IV.6.1. L'extraction en trois étapes (3 x 1 heure).....	151
IV.6.1.1. Résultats des extractions.....	151
IV.7. Influences des solvants sur l'extraction de l'Aza-A.....	153
IV.7.1. Extraction avec 100 % méthanol (MeOH).....	153
IV.7.2. Extraction avec 100 % eau (H <sub>2</sub> O).....	154
IV.7.3. Comparaison des systèmes de solvants MeOH/H <sub>2</sub> O et EtOH/H <sub>2</sub> O.....	156
IV.8. La teneur en huile dans les fruits de neem des différentes régions étudiées.....	157
IV.8.1. Facteurs climatiques et formation d'huile dans les fruits de neem.....	159
IV.9. Extraction au CO <sub>2</sub> supercritique.....	161
IV.9.1. Matériels et Méthode.....	161
IV.9.1.2. Les conditions opératoires choisies sont les suivantes.....	161
IV.9.2. Description du mode opératoire.....	162
IV.9.3.) Résultats des extractions au CO <sub>2</sub> critique.....	162
IV.10. Extraction à l'échelle semi-industrielle : sur pilote.....	164
IV.10.1. Matériels et méthode.....	164
IV.10.1.1. Matériel végétal.....	164
IV.10.1.2. Solvants utilisés.....	164
IV.10.1.3. Appareils et verrerie.....	165
IV.10.1.3.1. Description du pilote.....	165

IV.10.2. Description du mode opératoire.....	167
IV.10.2.1. Délipidation du broyat.....	167
IV.10.2.2. Extraction des limonoïdes du tourteau.....	167
IV.10.2.3. Extraction liquide-liquide.....	167
IV.10.2.4. Concentration de l'extrait (MTBE + limonoïdes).....	168
IV.10.3. Résultats des extractions sur pilote.....	168
IV.11. Matériels et méthodes d'analyses.....	169
IV.11.1. Spectroscopies RMN ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ ).....	169
IV.11.2. Spectroscopie Masse.....	169
IV.11.3. Dosage CLHP des extraits d'azadirachtine technique.....	170
IV.11.4. Référence des appareils utilisés.....	170
<b>Discussion</b> .....	172
<b>Conclusion et Perspectives</b> .....	178
<b>Article de la Thèse</b> .....	184

## Liste des Figures

<b>Figure 1 :</b> <i>carte géographique du Sénégal</i> .....	22
<b>Figure 2 :</b> <i>Cartes des sols du Sénégal</i> .....	23
<b>Figure 3 :</b> <i>Carte pluviométrique du Sénégal en 2007</i> .....	24
<b>Figure 4 :</b> <i>répartition de la population du Sénégal par région en 2013</i> .....	25
<b>Figure 5:</b> <i>Densité de la population du Sénégal selon la région en 2013</i> .....	26
<b>Figure 6:</b> <i>Répartition de la population occupée par secteurs d'activité (en milliers d'actifs)</i> .....	27
<b>Figure 7 :</b> <i>Les différentes zones géographiques sélectionnées pour l'étude de la variabilité de la teneur en Aza-A des fruits de neem au Sénégal</i> .....	28
<b>Figure 8 :</b> <i>Carte des 19 arrondissements de Dakar dont Fass-Gueule Tapée-colobane ou se trouve UCAD</i> .....	30
<b>Figure 9:</b> <i>Carte de situation de la commune de Tivaoune dans la région de Thiès</i> .....	32
<b>Figure 10:</b> <i>Répartition géographique du Neem au Sénégal</i> .....	40
<b>Figure 11:</b> <i>Pourcentage de réponse positive sur l'utilisation de la graine, du fruit, des feuilles, du bois, de l'écorce et des racines de Neem selon différentes zones géographiques</i> ...	45
<b>Figure 12 :</b> <i>La mortalité cumulée de S. scabiei var. cuniculi larvaire en fonction du temps exposées à l'huile de neem</i> .....	50
<b>Figure 13 :</b> <i>les structures proposées depuis sa première isolation de 1968 par Morgan et al à 1985 par Ley et al</i> .....	57
<b>Figure 14 :</b> <i>structures de limonoïdes isolés des graines de neem</i> .....	58
<b>Figure 15 :</b> <i>teneur de cinq tritertpnoïdes et l'huile des fruits des six arbres (A-F) sélectionnés</i> .....	63
<b>Figure 16 :</b> <i>Formation par la voie de biosynthèse de limonoïdes</i> .....	65
<b>Figure 17 :</b> <i>Présentation chimique de la molécule d'Azadirachtine-A</i> .....	67
<b>Figure 18 :</b> <i>rétro-synthèse des deux grands fragments (décaline et pyranne)</i> .....	68
<b>Figure 19 :</b> <i>rétro-synthèse des deux fragments (décaline et pyranne)</i> .....	69

<b>Figure 20</b> : méthode de couplage des deux grands fragments (décaline et pyranne).....	70
<b>Figure 21</b> : structures de l'ecdysone et de la 20-hydroxyecdysone.....	74
<b>Figure 22</b> : Différents analogues de la molécule d'azadirachtine.....	76
<b>Figure 23</b> : Courbes de disparition de l'azadirachtine-A à pH = 6 en fonction de la température de chauffage.....	78
<b>Figure 24</b> : L'analyse des lésions de l'ADN bactérien provoqué par les nanoparticules d'argent en utilisant une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.....	85
<b>Figure 25</b> : Schéma de préparation de biodiésel.....	93
<b>Figure 26</b> : Montage de l'extraction par agitation.....	97
<b>Figure 27</b> : dispositif du montage du soxhlet.....	98
<b>Figure 28</b> : Diagramme schématique des trois états d'un composé.....	100
<b>Figure 29</b> : Représentation schématique d'une chaîne d'extraction par fluide supercritique.....	100
<b>Figure 30</b> : les étapes d'une extraction liquide/liquide.....	102
<b>Figure 31</b> : Schéma de principe de la RMN.....	103
<b>Figure 32</b> : procédure d'analyse.....	104
<b>Figure 33</b> : schéma de principe d'une chaîne CLHP.....	105
<b>Figure 34</b> : Schéma du procédé d'extraction.....	118
<b>Figure 35</b> : Structures des deux isomères Aza-A et Aza-B.....	119
<b>Figure 36</b> : Profil du gradient d'élution (en bleu nous avons le pourcentage d'acétonitrile dans le mélange ACN / H <sub>2</sub> O).....	120
<b>Figure 37</b> : Chromatogramme du produit de la première purification (biotage).....	121
<b>Figure 38</b> : Chromatogramme en 3D.....	121
<b>Figure 39</b> : spectre RMN <sup>1</sup> H du mélange Aza-A et Aza-B (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ) issu de la première purification par chromatographie flash automatisé.....	122
<b>Figure 40</b> : spectre RMN <sup>13</sup> C du mélange Aza-A et Aza-B (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ) issu de la première purification par chromatographie flash automatisée.....	123
<b>Figure 41</b> : Profil CLHP préparatrice du produit de la première purification (biotage)....	124
<b>Figure 43</b> : Chromatogrammes (analytiques) des différentes fractions.....	126
<b>Figure 44</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H de la première fraction : l'Aza-A (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	127
<b>Figure 45</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C de la première fraction : l'Aza-A (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	129

<b>Figure 46:</b> <i>Spectre de masse de l'Aza-A (isolé dans la première fraction)</i> .....	130
<b>Figure 47 :</b> <i>Schéma d'attribution des pics du spectre de masse de l'Aza-A</i> .....	131
<b>Figure 48 :</b> <i>Droite d'étalonnage</i> .....	132
<b>Figure 49 :</b> <i>Spectre de masse du produit de la précipitation</i> .....	133
<b>Figure 50 :</b> <i>Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz ; CDCl<sub>3</sub>) du produit de la précipitation</i> .....	134
<b>Figure 51 :</b> <i>Spectre RMN <sup>13</sup>C (400 MHz ; CDCl<sub>3</sub>) du produit de la précipitation</i> .....	134
<b>Figure 52 :</b> <i>Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz ; CDCl<sub>3</sub>) de l'extrait purifié (1 :1)</i> .....	135
<b>Figure 53 :</b> <i>Spectre RMN <sup>13</sup>C (400 MHz ; CDCl<sub>3</sub>) de l'extrait purifié (1 :1)</i> .....	136
<b>Figure 54 :</b> <i>Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz ; CDCl<sub>3</sub>) de l'extrait purifié (6 :4)</i> .....	136
<b>Figure 55 :</b> <i>Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz ; CDCl<sub>3</sub>) de l'extrait de la seconde purification</i> ...	137
<b>Figure 56 :</b> <i>Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz ; CDCl<sub>3</sub>) du produit de la recristallisation</i> .....	138
<b>Figure 57:</b> <i>Digramme du débit de filtration (ml/min)</i> .....	143
<b>Figure 58:</b> <i>Rendement massique en fonction de la granulométrie</i> .....	144
<b>Figure 59:</b> <i>Pourcentage d'Aza-A dans l'extrait technique</i> .....	146
<b>Figure 60 :</b> <i>rendement d'extraction et pourcentage d'aza-A en fonction du rapport de solvants alcool/eau</i> .....	147
<b>Figure 61:</b> <i>Diagramme d'évolution du rendement d'extraction en fonction du rapport Vs/Mt</i> ... ..	148
<b>Figure 62:</b> <i>Porcentage d'Aza-A dans l'extrait technique en fontion du rapport Vs/Mt</i> .....	149
<b>Figure 63:</b> <i>Evaluation de la quantité d'azadirachtine technique en fonction du temps d'agitation (MeOH/H<sub>2</sub>O: 45/55)</i> .....	150
<b>Figure 64:</b> <i>Diagramme des rendements d'extraction &amp; de la teneur en Aza-A</i> .....	152
<b>Figure 65:</b> <i>Teneur en huile des fruits mûrs selon les localités d'origine</i> .....	159
<b>Figure 66:</b> <i>Teneur en huile des fruits non mûrs selon les localités d'origine</i> .....	160
<b>Figure 67 :</b> <i>Schéma de fonctionnement</i> .....	161
<b>Figure 68 :</b> <i>Dispositif expérimental de laboratoire</i> .....	161
<b>Figure 69 :</b> <i>Extraction 100% CO<sub>2</sub> sur neem</i> .....	163

<b>Figure 70</b> : <i>Chromatogramme en 3D de l'extrait au CO<sub>2</sub></i> .....	163
<b>Figure 71</b> : <i>Chromatogramme de l'extrait au CO<sub>2</sub></i> .....	164
<b>Figure 72</b> : <i>le pilote d'extraction</i> .....	166
<b>Figure 73</b> : <i>Schéma du principe d'encapsulation (inclusion)</i> .....	182
<b>Figure 74</b> : <i>Structures du <math>\beta</math>-Cyclodextrine et analogues</i> .....	183
<b>Figure 75</b> : <i>Modes d'inclusions possibles des complexes <math>\beta</math> - CD-Azadirachtine -A et PM<math>\beta</math>CD- Azadirachtine - A</i> .....	183

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1 :</b> <i>Les variations des températures.....</i>	37
<b>Tableau 2 :</b> <i>Substances secondaires d'origines naturels.....</i>	44
<b>Tableau 3 :</b> <i>Quelques formulations à base d'azadirachtine.....</i>	46
<b>Tableau 4 :</b> <i>Les mortalités des quatre fractions de l'extrait d'éther de pétrole contre les larves S. scabiei var. cuniculi in vitro.....</i>	51
<b>Tableau 5 :</b> <i>Principales espèces d'insectes rencontrées dans les stocks de céréales et légumineuses au Sénégal.....</i>	53
<b>Tableau 6 :</b> <i>Insecticides autorisés dans le traitement des denrées alimentaires (extrait de la liste des pesticides autorisés par le CSP* du CILSS*, version de juillet 2009).....</i>	54
<b>Tableau 7 :</b> <i>Quelques plantes couramment utilisées dans les greniers paysans contre les insectes des stocks au Sénégal et en Afrique de l'Ouest.....</i>	56
<b>Tableau 8 :</b> <i>résultats des tests d'écotoxicologie du Neem.....</i>	79
<b>Tableau 9 :</b> <i>composition des tourteaux des graines lavées et graines non lavées.....</i>	87
<b>Tableau 10 :</b> <i>résultats portants sur le gain en poids corporel et la prise alimentaire.....</i>	87
<b>Tableau 11 :</b> <i>indices hématologiques de coquelets nourris à base de tourteaux de graines neem traitées et non traitées.....</i>	89
<b>Tableau 12 :</b> <i>Les caractéristiques de carcasse et des organes de coquelets nourris à base de tourteaux de graines neem traitées et non traités traitées.....</i>	89
<b>Tableau 13 :</b> <i>Les propriétés observées.....</i>	94
<b>Tableau 14 :</b> <i>échantillons de fruits collectés à Dakar.....</i>	106
<b>Tableau 15 :</b> <i>Suivi des échantillons de la commune de Diourbel.....</i>	110
<b>Tableau 16 :</b> <i>Suivi des échantillons de la commune de Touba.....</i>	111
<b>Tableau 17 :</b> <i>suivi échantillons des fruits de la Commune de Nabadji Civol.....</i>	112
<b>Tableau 18 :</b> <i>les résultats d'extraction des fruits mûrs de neem de Dakar.....</i>	138
<b>Tableau 19 :</b> <i>les résultats des extractions des fruits de neem de Tivaoune.....</i>	139
<b>Tableau 20 :</b> <i>les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Diourbel.....</i>	139
<b>Tableau 21 :</b> <i>les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Touba.....</i>	139

<b>Tableau 22</b> : les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Ndande...	139
<b>Tableau 23</b> : les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Nabadji Civol.....	140
<b>Tableau 24</b> : les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Kayemor	140
<b>Tableau 25</b> : les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Backel..	140
<b>Tableau 26</b> : répartition granulométrique du broyat.....	142
<b>Tableau 27</b> : résultats comparatifs des systèmes de solvants.....	153
<b>Tableau 28</b> : Comparaison des mélanges de solvants MeOH/H <sub>2</sub> O (45/55) et EtOH/H <sub>2</sub> O (45/55).....	156
<b>Tableau 29</b> : Récapitulatif des résultats d'extraction (%).....	156
<b>Tableau 30</b> : La région de Dakar.....	157
<b>Tableau 31</b> : La région de Thiès (Commune de Tivaoune).....	157
<b>Tableau 32</b> : La région de Diourbel .....	158
<b>Tableau 33</b> : Région de Matam (Commune de Nabadji Civol).....	158
<b>Tableau 34</b> : Région de Louga (Commune de Ndande).....	158
<b>Tableau 35</b> : Régions de Tambacounda et Kaolack .....	159
<b>Tableau 36</b> : Teneur en Aza-A dans les extraits technique selon les régions.....	168

# *INTRODUCTION GENERALE*

L'*Azadirachta indica* A. Juss, communément appelé Neem, est un arbre de la famille des méliacées. Il est originaire du subcontinent indien<sup>1</sup>. Il est répandu dans les zones intertropicales, notamment dans les îles du pacifique en Amérique centrale et du sud<sup>2</sup>. Il a été introduit en Afrique au courant du XIX<sup>e</sup> siècle comme un arbre ornemental. C'est ainsi qu'il est massivement planté au Sénégal pour fixer la bordure des routes et comme source de bois de chauffage, mais surtout comme source de reboisement des zones arides. Le Neem est caractérisé par une grande rusticité, une résistance à la sécheresse et une croissance extrêmement rapide.

Le Neem constitue l'une des plus riches sources de métabolites secondaires trouvés dans la nature. De nos jours plus de trois cent (300) composés sont isolés dans les différentes parties de l'arbre.<sup>3</sup> Parmi ces composés les limonoïdes (tétranortriterpènes) occupent une place importante.<sup>4</sup> Le Neem représente une espèce végétale dont toutes les parties : feuilles, écorce, racines, fruits, trouvent des applications thérapeutiques (pharmacie, cosmétique), et en agriculture comme insecticides, fongicides et inhibiteur de croissance et de production d'insectes (acridiens, acaridés, nématodes...)<sup>5</sup>. Depuis des siècles, les extraits de graines de Neem sont utilisés dans le traitement des maladies chez l'homme et dans la protection des cultures contre les insectes ravageurs.<sup>6</sup> C'est en 1937 que des scientifiques indiens ont découvert qu'ils pouvaient enrayer une infestation de sauterelles en répandant sur les récoltes un extrait de feuille de Neem.<sup>7</sup> Les recherches subséquentes ont révélé la présence d'un limonoïde : l'azadirachtine, comme étant le principe actif le plus important dans l'activité anti-appétante du Neem.

---

<sup>1</sup> Saxena M., Ravikanth K., Kumar A., Gupta A., Singh B., and Sharma A., Purification of *Azadirachta indica* seed Cake and Its Impact on Nutritional and Antinutritional Factors *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 4939-4844

<sup>2</sup> Petit J. L., Le nim (Neem) l'arbre miracle : l'insecticide se fait désirer 2008, pp 49-50

<sup>3</sup> Govindachari T. R., *Curr. Sci.* **1992**, 63, 117

<sup>4</sup> Jones P. S., Ley S. V., Morgan E. D., Santafianos, D. in: Jacobson M. (Ed.), Focus on *Phytochemical Pesticides*, The Neem Tree, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, FL **1989**, P. 19, Chapter 2.

<sup>5</sup> Govindachari T. R., Gopalakrishnan G., Suresh G., Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels *Filoterapia*, **1999**, 70: 558-560

<sup>6</sup> Chopra R. N., Nayar S. L., Chopra I. C., In *Glossary of Indian Medicinal Plants*; New Delhi, India **1956**: P31.

<sup>7</sup> Hoddy . the neem tree, Multi-purpose weapon for a healthier environment, *Development and cooperation*, **1986**, 1: 21-23.

L'azadirachtine a été isolé pour la première fois en 1968 par *Butterworth et al.*<sup>8</sup> Depuis lors, beaucoup d'études ont été effectuées sur sa stabilité, les paramètres définissant sa production selon les conditions climatiques, son mode d'action sur les insectes, etc.<sup>9</sup> L'azadirachtine serait, selon la littérature, la principale composante à propriétés insecticides dans les extraits de graines de Neem. Toutefois, d'autres composés présents dans les extraits peuvent modifier le pouvoir insecticide. Bien que beaucoup d'isomères de l'azadirachtine (azadirachtine A, B, D, F, H, I, et K) aient été identifiés, l'azadirachtine-A est l'isomère le plus important. Il est le seul isomère considéré pour exprimer l'activité insecticide des graines de Neem.<sup>10</sup> L'azadirachtine peut être isolé en petite quantité dans les différentes parties du Neem, mais les graines restent la principale source de production d'azadirachtine.<sup>3</sup> C'est pourquoi, cette étude porte uniquement sur les graines de Neem.

### 1) Contexte

A l'instar de tous les pays du Sahel, le Sénégal se trouve confronter à un problème devenu préoccupant juste après la sécheresse : la protection des végétaux, des récoltes et des stocks. Ainsi, les pertes de récolte de l'ordre de vingt pour cent (20 %)<sup>11</sup> imputables aux prédateurs affectent les performances de l'agriculture et remettent en cause la perspective d'autosuffisance et de sécurité alimentaire.

L'agriculture actuelle doit faire face à de nombreux ravageurs de plus en plus résistants aux produits de synthèse. De plus, les insecticides synthétiques ont montré des effets néfastes pour la santé publique et sur l'environnement ce qui explique leur retrait progressif du marché. Dans le cadre de la recherche d'insecticides naturels, le Neem figure parmi les plantes les plus utilisées.<sup>12</sup> L'intérêt croissant pour l'utilisation des pesticides à base de Neem

---

<sup>8</sup> Butterworth J. H. and Morgan .D. solation of substance that suppresses feeding in locusts, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1968**, pp 43-48.

<sup>9</sup> Simmonds M.S.J.; Blaney W.M.; Ley S.V.; Anderson J.C.; & Toogood P.L.; Aazadirachtin: structural requirements for reducing growth and increasing mortality in lepidopterous larvae; *Entomol. exp. appl.* **1990** 55: 169-181

<sup>10</sup> Govindachari T. R., Gopalakrishnan G., Raghunathan R, Rajan S. S., *Current Sci.* **1994**, 66:295

<sup>11</sup> Direction de la Protection des Végétaux (DPV), Bilan de la campagne phytosanitaire, DPV, Dakar, Sénégal **1993**, pp 29.

<sup>12</sup> Seye F. ; Ndioune R. D. ; Ndiaye M. *Afrique SCIENCE* 02(2) (2006) 212 - 225

dans le monde est motivé par leurs effets comparables à ceux des pesticides chimiques ainsi que par leur probable innocuité sur l'environnement.

Le bio-insecticide ne présente pas de danger pour les mammifères, la faune aquatique, les abeilles et les oiseaux pourvu qu'il soit utilisé aux doses efficaces.<sup>13</sup> L'azadirachtine-A est considéré comme le principal composé à propriétés insecticides du Neem<sup>14</sup>, même s'il a été prouvé qu'il ne suffisait pas, à lui seul, pour expliquer les remarquables propriétés du Neem. Cependant, il est fortement absorbé par le sol et rapidement dégradé, d'où la non contamination des eaux létales.<sup>15</sup>

L'intérêt scientifique et commercial des extraits de Neem en raison de leurs propriétés insecticides a nécessité la mise au point de méthodes d'extraction efficaces permettant d'obtenir de l'azadirachtine technique commercialisable. Ceci est dû à la volonté d'améliorer les rendements agricoles et de protéger les récoltes tout en préservant la nature.

## 2) Objectifs :

Au terme de cette étude portant sur la valorisation des graines de Neem du Sénégal en vue d'une exploitation industrielle, les usagers pourront:

- ❖ Comprendre les meilleures conditions de collectes des graines de Neem (cueillettes ou ramassage) utilisées au Sénégal,
- ❖ Savoir, quel est le meilleur mode de séchage : à l'ombre ou au soleil ?

Car selon Morgan *et al.*<sup>8</sup>, la fraîcheur des fruits affecterait le rendement d'extraction de l'azadirachtine. Il est nécessaire de sécher les graines avant de passer aux extractions. Il est

---

<sup>13</sup> Peter Schenk, 2001, effets de l'huile de neem sur l'acarien varroa et les abeilles, revue suisse apiculture **1998** (3) 114-119.

<sup>14</sup> Sidhu O. P. ; Kumar V. and Behl H. M. Variability in Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) with Respect to Azadirachtin Content *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 910-915

<sup>15</sup> Thermotriology Corporation (homologation temporaire accordée par l'Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire (ARLA) selon l'article 17 du Règlement sur les produits antiparasitaires ; Octobre **2000** ; Note réglementaire sur le Neemix, insecticide similaire au produit d'Ultrateck. Site: [www.pmr-arla.gc.ca/francais/pdf/reg/reg\\_2000-13-f.pdf](http://www.pmr-arla.gc.ca/francais/pdf/reg/reg_2000-13-f.pdf).

aussi très important de veiller sur la conservation de l'azadirachtine dans les graines jusqu'au moment de l'extraction car il se dégrade facilement dans certaines conditions climatiques.

Pour une bonne reproductibilité des expériences, cette étude est abordée par la réalisation d'une série d'échantillons de graines de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Cet échantillonnage est basé aussi bien sur le mode de séchage (soleil ou ombre) que sur le degré de maturité des fruits.

A ce jour, les conditions telles que type de sol, pluviométrie et humidité relative qui influence la production d'azadirachtine dans les graines de Neem n'ont pu être déterminées avec certitude, malgré toutes les études menées en ce sens depuis plusieurs décennies.

❖ Apporter notre contribution à l'élucidation de cette question, nous comptons appliquer cette technique d'échantillonnage sur toutes les graines de Neem en provenance des diverses régions du Sénégal. Par cette approche, nous avons une bonne orientation sur le choix des lieux et de la période (état de maturité) de cueillette des graines, du mode de séchage à adopter par la suite avant extraction.

❖ Cerner tous les facteurs naturels qui influencent la teneur en azadirachtine ; sa méthode d'extraction optimale en peu d'étapes. Selon la littérature, l'azadirachtine est le composé le plus polaire des tétranortriterpénoïdes isolés des graines de Neem.<sup>16</sup> Il est extrait par les solvants polaires : les alcools, les éthers... etc. Selon *Kaushik et al. 2002*, avec l'éthanol, soixante neuf à soixante onze pour cent (69 à 71 %) de l'azadirachtine sont extraits à la première extraction ; environ dix huit à dix neuf pour cent (18 à 19%) à la deuxième extraction et à la troisième de neuf à onze pour cent (9 à 11%). Trois extractions suffisent pour extraire complètement l'azadirachtine des graines.<sup>17</sup>

❖ Trouver le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O qui permet d'extraire tout l'azadirachtine des amandes de Neem. Le choix du méthanol comme Co-solvant principal d'extraction a suscité de nombreuses études bibliographiques. Le méthanol est reconnu par de nombreux auteurs

---

<sup>16</sup> Ley S. V. ; Delholm A. A.; Wood A.; The chemistry of azadiractin *Natural Product Report*, **1993**, 10: 109-157

<sup>17</sup> Kaushik N. Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seed by HPLC and GLC *Anal Bioanal Chem.*, **2002**, 374: 1199-1204

comme le solvant qui a la plus forte capacité d'extraction de l'azadirachtine contenue dans les graines de Neem en comparaison avec le chloroforme, l'acétone, l'éthanol et le n-butanol.<sup>18</sup>

❖ Effectuer une approche semi-industrielle sur pilote à l'échelle du kilogramme constitue un des objectifs de ce projet.

Ce manuscrit est constitué de deux parties :

- ✓ La première présente la synthèse bibliographique sur le Sénégal, les multiples propriétés et domaines d'utilisation du neem.
- ✓ La seconde partie présente les différentes études effectuées et les résultats obtenus.

---

<sup>18</sup> Sneider B.H., and Ermel K., Quantitative determination of azadirachtin from neem seeds using high performance liquid chromatography; *Natural Pesticides from the neem and other plants*, **1986**, p 161.

# Revue Bibliographique :

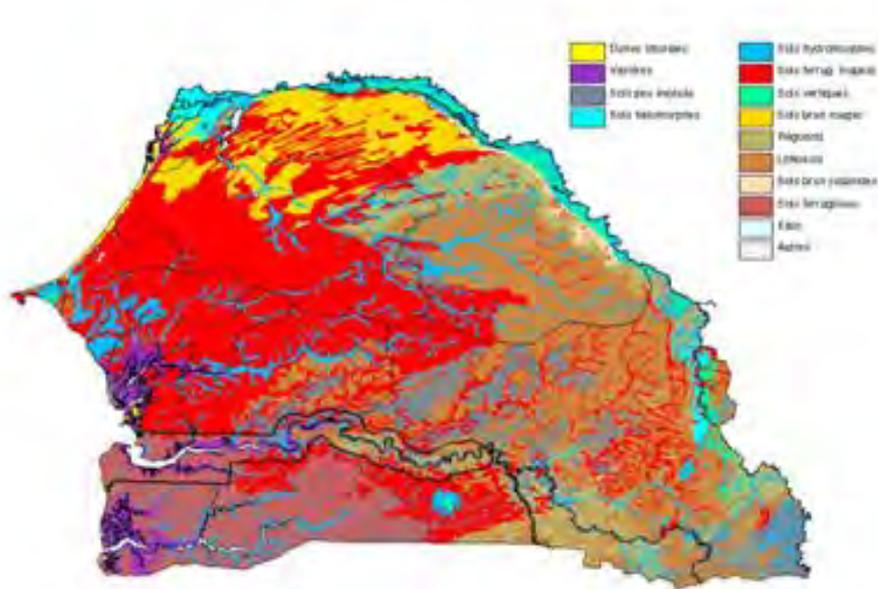
## *Chapitre 1 :*

*Présentation du Sénégal, étude pédoclimatique des régions d'étude.*



### ***1.1.2.) Relief***

Le Sénégal est principalement composé d'une plaine légèrement vallonnée et peu découpée. Exceptée, la partie Sud-Est dominée par les massifs du Fouta Djallon dont le point culminant atteint 581 m, les altitudes sont partout inférieures à 130 m. Les types de sols rencontrés au Sénégal sont très variés voir carte ci-dessous (**figure 2**).

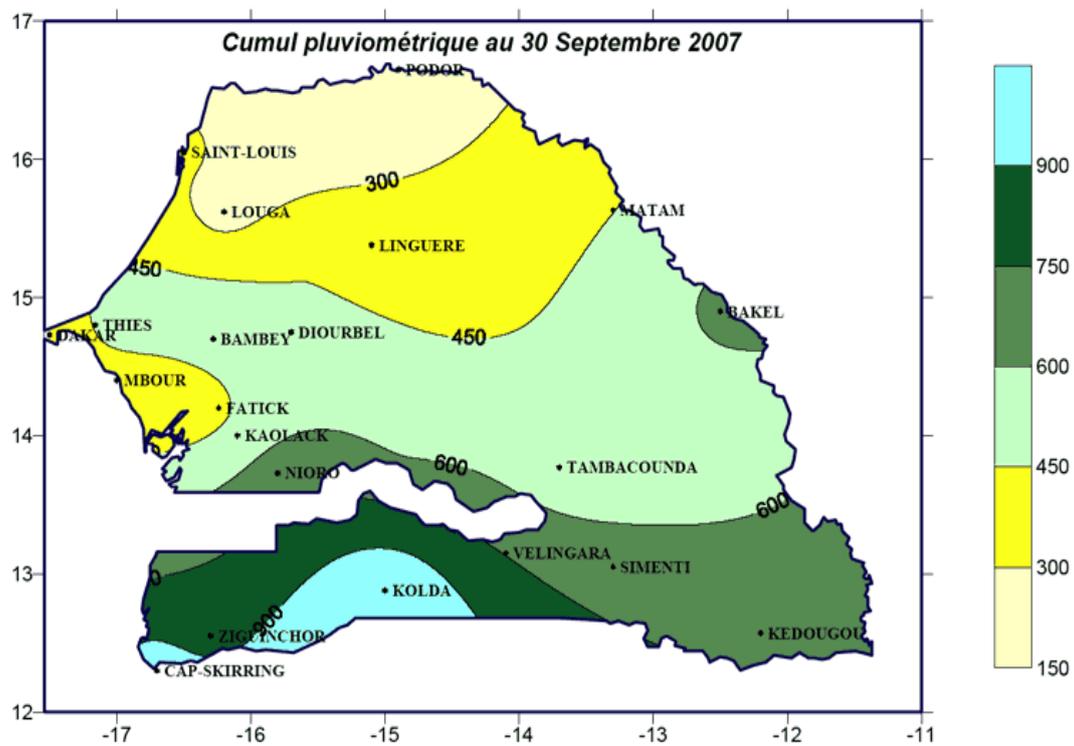


**Figure 2 :** *Cartes des sols du Sénégal*

### ***1.1.3.) Climat***

Au plan climatique, la position de Finistère Ouest-africain détermine les différences climatiques entre le littoral et l'intérieur. Sur la base de la durée moyenne de la saison des pluies, de la hauteur d'eau tombée qui augmente selon un gradient nord-Sud et de l'influence de grandes masses d'air le long de la Côte, le Sénégal peut être découpé en six régions climatiques<sup>19</sup> : la Grande-Côte, la région sahélienne, la région du Saloum-Petite côte, la région

de Basse-Casamance, la moyenne Casamance et Haute-Casamance. La carte ci-dessous résume la situation pluviométrique au Sénégal sur la période allant de 1961 à 2007.



**Figure 3 : Carte pluviométrique du Sénégal en 2007<sup>20</sup>**

#### ***1.1.4.) Végétation***

Les facteurs climatiques jouent un rôle prépondérant dans la répartition de la végétation au Sénégal, du fait de l'absence de reliefs importants et le développement limité du réseau hydrographique. Ainsi, on distingue le domaine sahélien (steppe arbustive), le domaine soudanien (savane boisée), le domaine subguinéen (forêt dense à feuilles caduques) et les groupements azonaux (peuplements touffus de palétuviers). Ces facteurs seront pris en compte dans la suite de nos travaux sur la provenance des graines étudiées.

<sup>20</sup> <http://www.au-senegal.com/Cartes-thematiques-du-Senegal.html> le 09-01-2011.

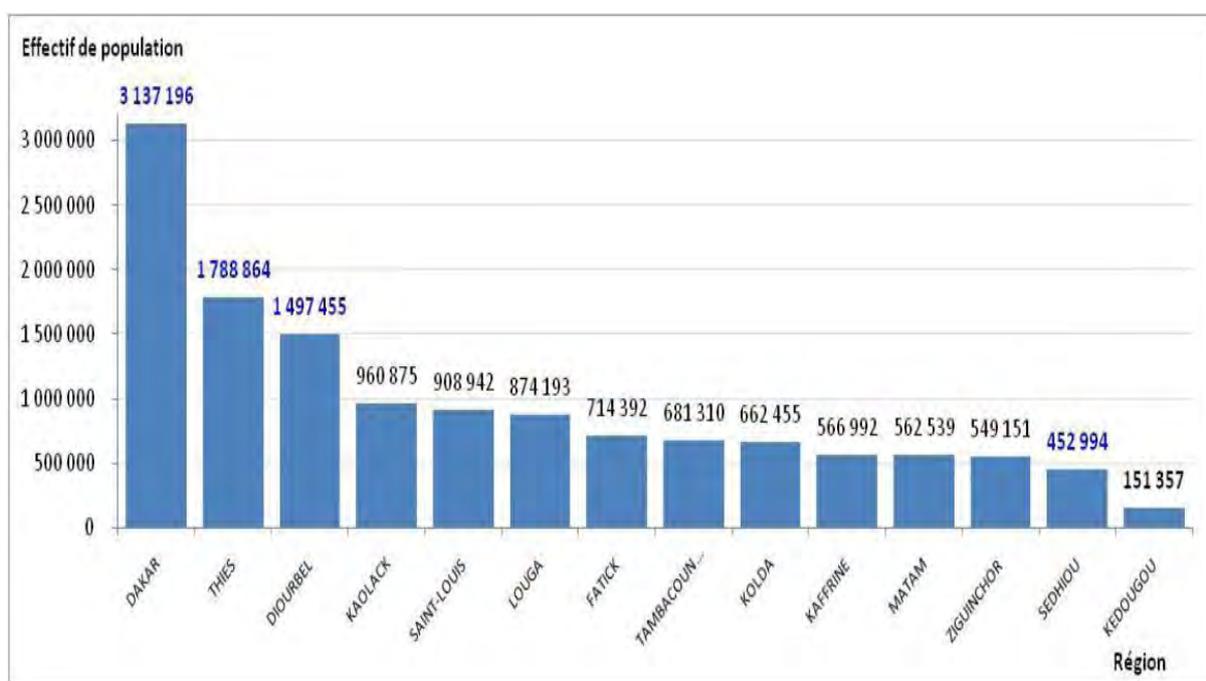
### ***1.1.5.) Hydrographie***

Liés au climat, plusieurs bassins hydrographiques s'étendent sur le territoire sénégalais. Il s'agit du fleuve Sénégal (couvrant un bassin versant de 350 000 Km<sup>2</sup> et long de 1 750 Km), le fleuve Gambie (bassin versant 80 000 Km<sup>2</sup> et long de 1 150 Km), le Sine et le Saloum qui sont des cours d'eau fossiles, la Casamance, un petit fleuve côtier (bassin versant de 37 000Km<sup>2</sup> et long de 300 Km).

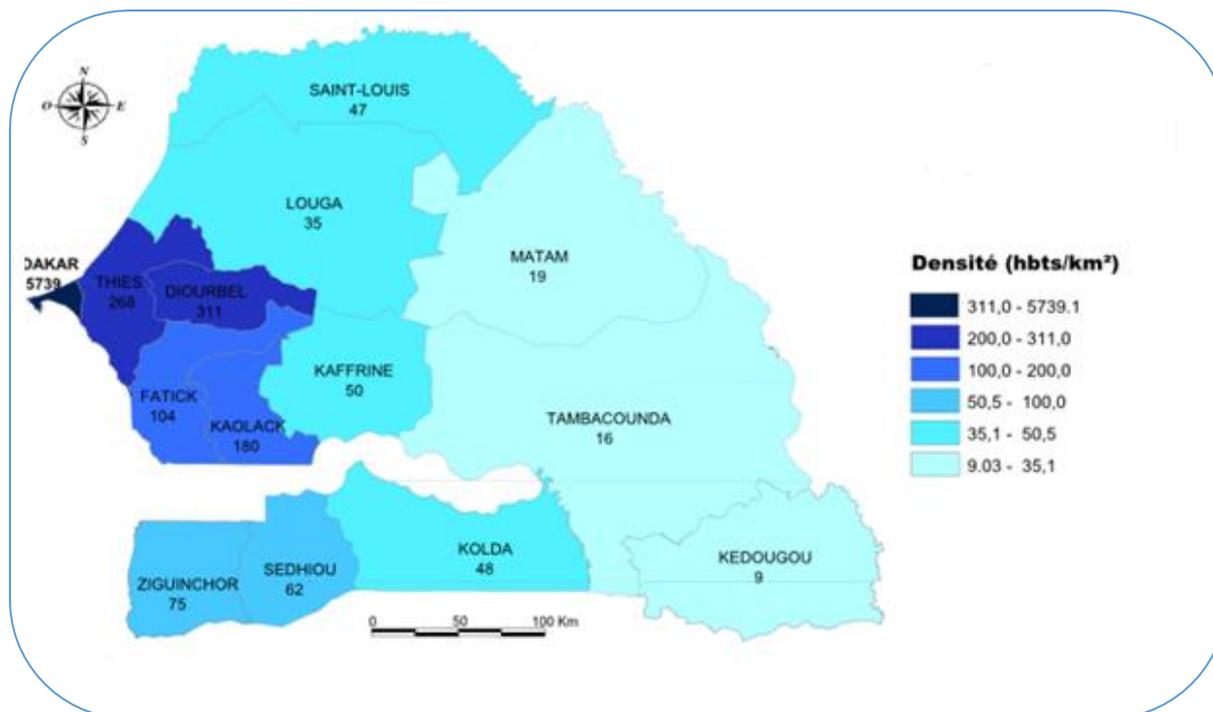
### ***1.1.6.) Population***

Au dernier recensement qui date de 2013, le Sénégal comptait environ 13 508 715 habitants dont 49.9% d'hommes et 50.1% de femmes. La population se caractérise par sa jeunesse dont celle rurale y apparaît plus jeune avec un âge médian se situant à 16 ans. Avec une densité nationale de 69 habitants au Km<sup>2</sup>, Dakar est la région la plus peuplée soit 5 739 habitants au Km<sup>2</sup> contre seulement 9 habitants au Km<sup>2</sup> à Kédougou (figure 4 et 5).<sup>21</sup>

**Figure 4 : répartition de la population du Sénégal par région en 2013**



<sup>21</sup> Résumé du Rapport définitif Recensement Général de la Population et de l'Habitat, de l'Agriculture et de l'Elevage (RGPHAE) 2013, publié en Septembre 2014.



**Figure 5:** Densité de la population du Sénégal selon la région en 2013

Cette population très hétérogène renferme un nombre important de groupes ethniques répartis sur l'ensemble du territoire.<sup>22</sup> On y parle sept langues vernaculaires officielles recoupant les groupes ethniques.

### ***1.1.7.) Economie.***

L'économie sénégalaise est avant tout une économie agricole et rurale car plus de 70 % de la population active s'adonnent à des tâches primaires et contribuent ainsi pour plus de 20 % au produit national brut.<sup>22</sup> Sur une population active de l'ordre de 3 500 000 individus, on compte moins de 10% de salariés qui sont constitués de près de 80 000 fonctionnaires et de 150 à 200 000 salariés du secteur privé. Il en résulte que 90% des travailleurs recensés au plan national sont des agriculteurs et des travailleurs du secteur de l'informel.

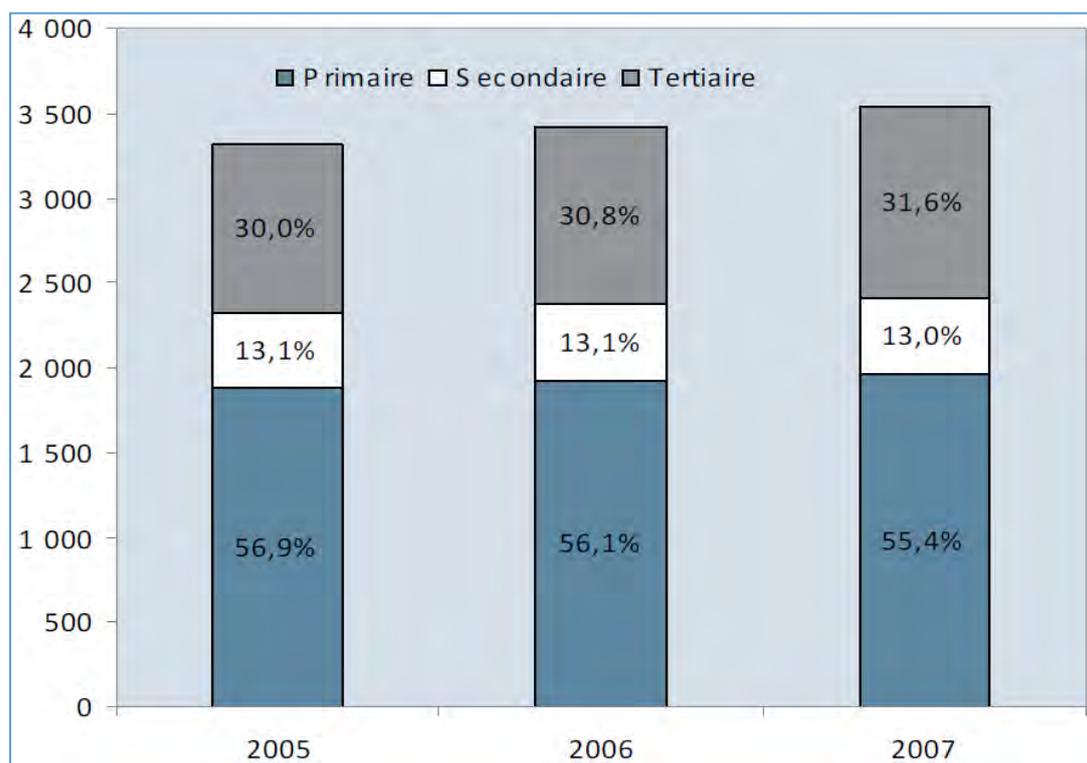
Une analyse fine de la population active indique qu'à l'instar de la quasi-totalité des pays en développement, la répartition par secteur d'activité fait apparaître une forte concentration

<sup>22</sup> [http://www.ansd.sn/senegal\\_indicateurs.html](http://www.ansd.sn/senegal_indicateurs.html) le 09-01-2011

de celle-ci dans le secteur primaire qui devance de loin les secteurs tertiaire et secondaire (**figure 6**). Il faut toutefois noter que la physionomie du marché du travail est différente entre la ville et la campagne. En effet, à la grande diversité des emplois urbains s'opposent une concentration des populations rurales dans le secteur agricole.

Au plan géographique, les différentes régions n'offrent pas les mêmes possibilités ou chance d'accès à l'emploi. Cette population est intégrée dans l'aspect valorisation de nos résultats, c'est-à-dire dans la collecte des graines et dans l'utilisation du produit formulé pour une augmentation des rendements agricoles.

**Figure 6:** Répartition de la population occupée par secteurs d'activité (en milliers d'actifs)<sup>23</sup>



<sup>23</sup> Comptabilité nationale /ANSD, 2008 in SES, 2007

## I.2.) Description des conditions pédoclimatiques des régions de collectes des graines dans cette étude.

Les fruits utilisés dans ces travaux ont été collectés dans différentes régions du Sénégal : Dakar (la capitale), Thiès (Tivaoune), Diourbel (Touba) et Louga (Ndande), Tambacounda, (Backel), Matam (Nabadji Civol), Kaolack (Kaymor). La collecte portait sur les fruits non mûrs ( $F_{nm}$ ), les fruits mûrs cueillis ( $F_{mc}$ ) et les fruits mûrs ramassés par terre ( $F_{mr}$ ).



**Figure 7 :** Les différentes zones géographiques sélectionnées pour l'étude de la variabilité de la teneur en Aza-A des fruits de neem au Sénégal.

## **I.2.1.) La Région Dakar<sup>24</sup>**

### **I.2.1.1.) Climat et Humidité**

Le climat de la région de Dakar est de type canarien. Il est caractérisé, pendant une bonne période de l'année, par un micro – climat marqué par l'influence de l'alizé maritime ; d'où l'existence d'une fraîcheur et d'une humidité quasi permanente et relativement forte de l'ordre de 25%. Toutefois, l'harmattan, l'alizé continental saharien, se fait sentir faiblement en saison sèche et au fur et à mesure que l'on s'éloigne des côtes.

### **I.2.1.2.) Température**

La température varie entre 17° et 25° C de décembre à avril et de 27° à 30 ° C de mai à novembre. Le régime des vents est marqué par l'influence prédominante de l'alizé. Ce dernier est issu de l'anticyclone des Açores. Sa direction principale varie du Nord-Nord-Ouest au Nord-Nord-Est.

### **I.2.1.3.) Pluviométrie**

La pluviométrie est caractérisée par une durée relativement courte de l'hivernage, variant entre trois et quatre mois de juin à octobre. Elle est marquée, par une inégale répartition dans le temps. De 2000 à 2011 les mois de Juillet, Aout, et Septembre concentrent les 81.69 % des pluies tombées. L'année de collecte des fruits, la moyenne des quantités de pluies tombées aux mois de juillet, Aout et Septembre, était de 415.6 mm.

### **I.2.1.4.) Les sols de la Régions<sup>24</sup>**

La zone Sud-Est est formée de coulées volcaniques et d'affleurements du substratum (limons, marnes et calcaires) recouvert au centre d'une cuirasse latéritique. Cette zone correspond aux quartiers du Plateau dans le département de Dakar.

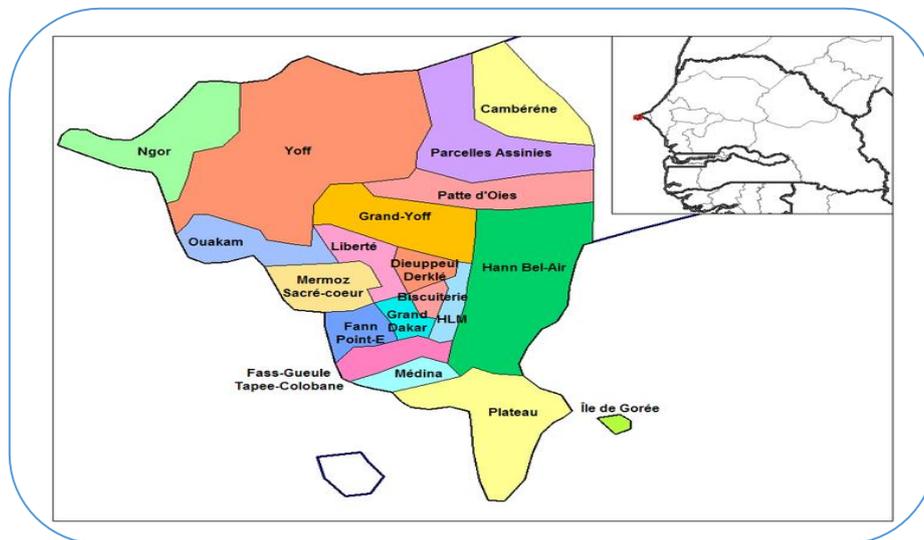
---

<sup>24</sup> [http://www.reseau-espaces-volontariats.org/documents/content/Senegal/Pays/presentation\\_regions.pdf](http://www.reseau-espaces-volontariats.org/documents/content/Senegal/Pays/presentation_regions.pdf)

La zone centrale est constituée de sables reposant sur un substratum argilo calcaire avec quelques affleurements. Cette zone abrite les quartiers d'habitation populaire de la Médina et les quartiers résidentiels de Fenêtre Mermoz, Point E et la zone industrielle.

La partie Nord-Ouest qui correspond au second massif d'origine volcanique. Cette zone abrite les villages traditionnels de Ouakam, Ngor et Yoff ainsi que l'aéroport international de Dakar.

Dans cette région le cœur de la saison des pluies se situe aux mois de Juillet, Août à Septembre avec une moyenne maximale 537.7 mm. Les températures moyennes minimum et maximum sont respectivement : 26°C et 30°C pendant les mois de juillet aout et septembre.<sup>25</sup>



**Figure 8 :** Carte des 19 arrondissements de Dakar dont Fass-Gueule Tapée-colobane ou se trouve UCAD<sup>24</sup>

## I.2.2.) La région de Thiès<sup>26</sup>

### I.2.2.1.) Climat et Température

Le département de Tivaoune, situé dans la région de Thiès à 92 Km de Dakar (**Figure 3**) a un climat de type sahélien et se caractérise par l'alternance d'une saison pluvieuse de 3 à 4

<sup>25</sup> <http://fr.wikipedia.org/wiki/Dakar> 12-06-2013

<sup>26</sup> Cissé, I. TH., (ISRA); Sokhna, K, (Enda Graf); Gueye O. (IFAN/UCAD), Diouf, A.; Diop Y., Wade C. (LACT/UCAD); Broutin C.; ECOCITE: Gestion Partagée et Durable des Espaces Agricoles et Naturels à la Périphérie des Centres Urbains; Rapport de mission de pré-diagnostic dans la zone de Thiès-Fandène, Du 25 au 28 février 2003.

mois et d'une saison sèche qui dure neuf mois en moyenne. Les températures varient avec les saisons. Pour les températures maximales moyennes, le maximum principal est d'octobre (35° C), le minimum principal de décembre (31°6 C). Le maximum secondaire intervient en juin (33°6 C) et le minimum secondaire en août (31°9 C). Donc au moment de la cueillette des fruits, faite entre les mois juin et juillet 2010, la moyenne des températures était de 32°7 C.

#### **I.2.2.2.) Pluviométrie**

La saison pluvieuse débute en juillet et se termine en octobre. Les trois mois d'hivernage (juillet, août, septembre), concentrent plus de 85 % des pluies tombées. Les totaux pluviométriques enregistrés se situent entre 337 mm et 485 mm.

#### **I.2.2.3.) Humidité de la région**

La proximité de l'océan, lui procure une humidité relative moyenne de 62%. Cependant, elle demeure très variable et on note que l'humidité maximale se situe à 87% et la minimale à 37%. Les mois où les teneurs en eau dans l'air sont fortes coïncident avec la saison des pluies.

#### **I.2.2.4.) Les sols de la région<sup>26</sup>**

Les sols de la région sont caractérisés par une majorité de sols ferrugineux tropicaux non lessivés. Les sols ferrugineux tropicaux faiblement lessivés sur sable siliceux au nord et au centre caractérisés par des concrétions ferrugineuses sur grès plus ou moins argileux sont présents au S-E ; ce sont les sols deck. Dans la zone des Niayes, dans les dépressions, dans les vallées asséchées et, inter dunes les vertisols, et les sols minéraux à pseudo gley très humifères se particularisent.



**Figure 9:** Carte de situation de la commune de Tivaouane dans la région de Thiès

### **I.2.3) La région de Louga<sup>27</sup>**

#### **I.2.3.1.) Climat et Température**

Le climat comporte deux saisons : une saison sèche qui commence généralement en octobre et une saison humide qui ne débute que rarement avant la seconde quinzaine de juin.

#### **I.2.3.2) Pluviométrie**

La hauteur totale est assez variable puisque depuis 1930 à Louga, elle a pu descendre en 1931 à 245 mm et atteindre 805 mm en 1933. Ces dix dernières années La moyenne maximum des hauteurs a été de 320.5mm (JAS). La moyenne minimum a été de 93.5 mm (MJJ).

#### **I.2.3.3.) Les sols<sup>27</sup>**

<sup>27</sup> [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/num-dakar-01/11035.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/num-dakar-01/11035.pdf) 21 Mai 2016; Aubert G. Première observation sur les sols du Sénégal, les sols de la région de Louga.

Différents types de sols peuvent être observés dans la région de Louga :

- ❖ Sols bruns ou châtaîns sur les limons qui occupent les fonds entre les dunes, ou sur les marnes et grès calcaires qui affleurent certains points ;
- ❖ Sols noirs, assez humifères, semble – t – il dans les marigots ;
- ❖ Sols gris ou rouges, de beaucoup les plus importants comme superficie, sur les dunes, et les plateaux sableux. Ce sont eux qui supportent les cultures d'arachide.

#### **I.2.4.) La région de Diourbel<sup>28</sup>**

##### **I.2.4.1.) Climat et Température**

Le climat de la région est de type soudano sahélien, à prédominance sahélienne. Il est défini par l'alternance d'une longue saison sèche (s'échelonnant du mois d'octobre au mois de juin) et d'une saison des pluies (allant du mois de juin au mois d'octobre). Le climat est chaud et sec. Il est soumis huit (8) mois sur douze (12) à l'harmattan.

Les températures sont toujours élevées et fluctuantes avec un minimum de 24° en janvier et un maximum de 35° en juin en moyenne. Le climat se caractérise par une faible pluviosité et une forte évaporation. La région ne disposant pas de frange maritime, ni de littoral et de cours d'eau pérenne.

##### **I.2.4.2.) La pluviométrie**

Sur le plan pluviométrique, la région est comprise entre les isohyètes 400 et 500 mm. Entre 2000 et 2006, la pluviométrie moyenne annuelle enregistrée est de 465 mm avec un minimum de 303,6 mm et un maximum de 622,8 mm. Au cours des trente (30) dernières années, la variabilité inter annuelle s'est accrue et on observe une forte tendance à la baisse.

##### **I.2.4.3.) Les sols de la Région de Diourbel<sup>28</sup>**

---

<sup>28</sup> [http://www.diourbel.org/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=105&Itemid=233](http://www.diourbel.org/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=105&Itemid=233)  
21 Mai 2016

Les sols sont essentiellement formés de sédiments sableux ou sablo-argileux d'origine éolienne et alluviale. Trois (03) types de sols sont généralement répertoriés dans la région de Diourbel.

- ❖ Les sols ferrugineux tropicaux non ou peu lessivés communément appelés « diors ». Leur texture est grossière avec en moyenne 95 % de sable, 3 % d'argile et 1,5 % de limon. Ils sont perméables, leur capacité de rétention en eau est généralement faible. Ces sols sont très pauvres en matières organiques (0,20 %) et se matérialisent par une capacité d'échange faible, un taux d'azote extrêmement faible (0,3 à 1,5 %), un taux de saturation du complexe absorbant variable avec l'histoire culturale et un PH généralement acide. Ces sols sont pauvres en phosphore (généralement une concentration de moins de 150 mg / kg de terre). Ils représentent 80 % des sols de la région.
  
- ❖ Les sols bruns hydromorphes ou « deck » Ils couvrent 15 % des terres. D'un aspect argileux, ils sont rencontrés dans les zones propices aux cultures céréalières notamment le sorgho et à la pratique du maraîchage. Ce type de sol se rencontre particulièrement dans le département de Bambey. Il intéresse la vallée du Ndiémane sur 10.000 ha.
  
- ❖ Les sols ferrugineux tropicaux rouges ou lithosols communément appelés « deck-diors ». Ils se présentent dans l'espace régional sous forme de poches et représentent 5% seulement des terres. Ils sont favorables à la culture du sorgho, du maïs, de la tomate, du gombo et des agrumes.

#### **I.2.4.4.) La commune de Touba**

Touba, situé dans la région de Diourbel, a un climat de type soudano-sahélien, chaud et sec avec des moyennes thermiques annuelles comprises entre 27 °C et 29 °C. La pluviométrie moyenne annuelle est comprise entre 400 et 500 mm avec une forte variabilité spatio-temporelle. Sur le plan pédologique, les sols sont essentiellement formés de sédiments

sableux ou sablo-argileux d'origine éolienne et alluviale. La végétation est caractérisée par une faible diversité des espèces et la densité ligneuse est très variable.<sup>29</sup>

### **I.2.5.) La région de Matam<sup>30</sup>**

#### **I.2.5.1.) Pluviométries**

La région est comprise entre les isohyètes 300 et 500 mm, avec des précipitations pouvant atteindre parfois 600 mm d'eau dans la partie sud.

Les quantités d'eau et le nombre de jours de pluies annuelles sont croissants du Nord au Sud. Les départements les plus arrosés sont Kanel et Ranérou–Ferlo.

La pluviométrie se caractérise par des variabilités annuelles et mensuelles. Les mois les plus pluvieux sont ceux d'août et de septembre. Les premières pluies sont en général enregistrées en fin Mai ou début Juin et les dernières sont recueillies en fin septembre mi-octobre.

L'hivernage dure 3 à 4 mois environ et s'installe de manière échelonnée du sud au nord.

#### **I.2.5.2.) Température et humidité**

Le climat de la région est caractérisé par une période de haute température qui dure cinq (05) mois (de février à juin) avec une moyenne oscillant entre 43° C et 45° C, des maxima qui atteignent plus de 48° C et une période de basse température de sept (07) mois (de juillet à janvier) avec un adoucissement du climat dû aux précipitations et à l'installation de la saison froide.

La température s'adoucit et descend parfois jusqu'à 20° C durant cette période. L'humidité relative est assez élevée en hivernage (surtout entre août et septembre). Du mois de décembre au mois de juin, elle baisse pour atteindre son niveau minimal.

#### **I.2.5.3.) Les sols de la région de Matam<sup>30</sup>**

---

<sup>29</sup> BA M., SALL M. Les changements d'occupation/utilisation du sol et leurs incidences sur la diversité biologique: études de cas sur les paysages agraires, pastoraux et forestiers du bassin arachidier du Sénégal (Centre de Suivi Ecologique – CSE) la biodiversité agricole en Afrique de l'ouest ; Archive documents de la FAO (Google 23-04-2012).

Les sols se rangent en quatre grandes catégories :

- ❖ les sols des cuvettes de décantation (walo) autrement dénommés hollaldé, sont soumis en l'absence d'endiguement artificiel, à une submersion de longue durée au moment de la crue. Les sols hollaldé sont destinés à la riziculture dans les zones aménagées ou aux cultures de décrue dans les cuvettes naturelles.
- ❖ les sols des levées fluvio-deltaïques (fondé), dont la cote peut atteindre 15 m à Matam, se trouvent ainsi à l'abri des faibles crues. Les sols de fondé sont essentiellement destinés aux productions de diversification.
- ❖ les sols de « falo », sur les berges du fleuve ou des marigots, sont constitués de dépôts actuels, de texture sableuse à sablo-argileuse. Le falo constitue le lit mineur du fleuve ; il est inondé pendant la période des hautes eaux et exondé en étiage. Durant cette période, les populations s'adonnent aux cultures de falo.
- ❖ les sols dunaires (diéri et ferlo sableux), de texture essentiellement sableuse (dior). Toutefois on note quelques poches de sols latéritiques (dans le ferlo et une partie du diéri).

## **I.2.6.) La Région de Tambacounda<sup>31</sup>**

### **I.2.6.1.) Le climat**

La région de Tambacounda est comprise dans les zones phytogéographiques soudano - sahélienne et soudano – guinéenne. Une telle situation lui confère un milieu naturel diversifié, un environnement écologique important.

### **I.2.6.2.) La pluviométrie**

La région de Tambacounda se situe entre les isohyètes 500 et 1500 mm, ce qui la place parmi les régions les plus pluvieuses du pays. La pluviométrie se caractérise par une grande variabilité annuelle et mensuelle. Les mois d'Août et Septembre sont les plus pluvieux. La saison hivernale dure 4 à 5 mois et son installation s'effectue d'une manière

---

30 Ministère De L'économie Et Des Finances Agence Nationale De La Statistique Et De La Démographie, Service Régional De La Statistique Et De La Démographie De Matam, Situation Economique Et Sociale Régionale (2012) P 5.

échelonnée du Sud au Nord. La quantité d'eau et le nombre de jours de pluie sont croissants du Nord au Sud.

### **I.2.6.3.) Les températures**

On distingue deux grandes périodes de régime thermique. Il s'agit notamment de la période de basses températures, allant de juillet en février avec cependant plus de fraîcheur aux mois de décembre et de janvier et de la période de hautes températures se situant entre mars et juin. Les variations des températures maximales, minimales et moyennes des deux périodes sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1:** *Les variations des températures*<sup>31</sup>

<b>Périodes</b>	<b>Températures (°C)</b>		
	Maximales	Minimales	Moyennes
<b>Basses températures</b>	31 à 36	15 à 23	25 à 28
<b>Hautes températures</b>	39 à 40	21 à 26	29 33

### **I.2.6.4.) L'insolation**

L'insolation moyenne annuelle dépasse 3.000 heures, soit environ 8 à 9 heures d'ensoleillement par jour. Le mois d'août reçoit la durée d'insolation la plus courte.

### **I.2.6.5.) L'humidité relative et l'évaporation**

L'humidité relative est très élevée en hivernage et entre août et octobre elle atteint et dépasse 97%. De janvier à mars elle baisse pour atteindre une valeur minimale voisine de 10%. L'évaporation croit du sud au Nord, à l'inverse du gradient pluviométrique. De décembre à mai elle est supérieure à 200 mm.

### **I.2.6.6.) Les Sols de la Région de Tambacounda**

<sup>31</sup> Conseil Régional : Plan d'action pour le développement de la région de Tambacounda, Octobre 1997.

Les principaux types de sols de la région sont les suivants : les sols minéraux bruts d'érosion (lithosols), les sols peu évolués d'érosion gravillonnaire, sols ferrugineux tropicaux (non lessivés, lessivés sans concrétions et lessivés à concrétions), les vertisols, les sols hydromorphes et halomorphes. Il est à noter que les sols ferrugineux tropicaux et les sols peu évolués d'érosion prédominent dans la région.<sup>32</sup>

### **I.2.7.) La région de Kaolack<sup>33</sup>**

#### **I.2.7.1.) Climat et humidité relative**

La zone étudiée a un climat Soudano-sahélien avec comme station de référence celle de Nioro du Rip. Ce climat est caractérisé par une alternance d'une saison sèche (de Novembre à Mai) et d'une saison de pluie (de Juin à Octobre).

L'humidité relative est fonction des vents : alizé, harmattan et mousson et l'altitude. Sa moyenne maximale et minimale s'élève respectivement à 74 % et 42.2 %. L'insolation est de moyenne annuelle de 7 heures par jour.

#### **I.2.7.2.) Température**

La moyenne des températures se situe autour de 28° C. Les températures maximales atteignent les 40° C pendant les mois d'avril à juin et descendent jusqu'à 33° C au cours de Décembre et Janvier. Les températures minimales sont comprises entre 15°C de Décembre à Janvier et 24 °C de juin à Aout.

#### **I.2.7.3.) Pluviométrie**

La région de Kaolack, plus précisément le Département de Nioro se situe entre les isohyètes 900 mm au Nord et 1000 mm au Sud. De 2000 à 2011 les mois de Juillet, Aout, et Septembre concentrent les 87.20 % des pluies tombées. L'année de collecte des fruits la

---

<sup>32</sup> Plan régional de développement intégré de Tambacounda 2001 - 2006 TOME 1 : bilan diagnostic (2001) p 12.

<sup>33</sup> Ministère de l'Agriculture, Bureau Pédologique du Sénégal, *Etude sémi-détaillée des sols de Nioro*, étude publiée en 1993 pp 26-50.

moyenne, des quantités de pluies tombées aux mois de juillet, Aout et Septembre, était de 732.05 mm.

#### **I.2.7.4.) Les sols de la Région de Kaolack<sup>33</sup>**

Les principes sols rencontrés dans la zone de Nioro sont :

- ❖ Les Dior formé de sable ou sablo-limoneux avec moins de 10 % d'argile.
- ❖ Les Dior Deck formé de sable-limoneux avec plus de 10 % d'argile
- ❖ Les Deck Dior formés de limon très sableux avec plus de 15 % d'argile
- ❖ Les Deck peu représentés dans la zone de Nioro, sont caractérisés par une texture limono-argilo sableuse et argilo-sableuse.
- ❖ Les Deck Bane correspondent aux sols de texture limon argileux. Ces sols sont rencontrés dans Kayemor où les fruits ont été collectés.
- ❖ Les Banes correspondent aux sols aux classes de textures argile limoneuse, argile fine et argile.

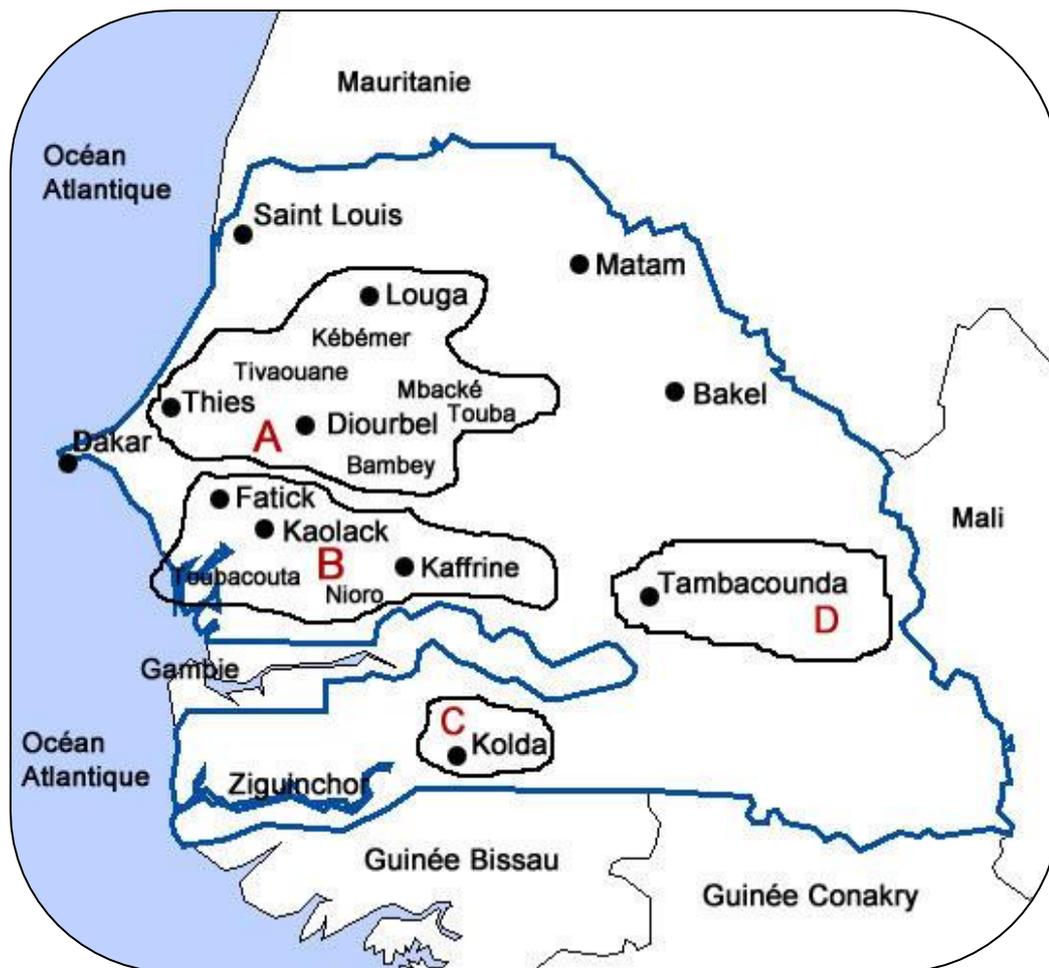
#### **I.2.8) Ressources en Neem du Sénégal et la Répartition géographique**

Le Sénégal compte environ 10 à 20 million d'arbres de Neem répartis principalement dans les régions de : Louga, Diourbel, Kaolack, Fatick, Tambacounda, et Kolda. Cependant, il peut aussi être retrouvé dans d'autres zones du pays (**figure 10**). Il est évalué qu'un village seul peut produire une à quatre tonnes de graines séchées par an. Il faut environ 1.5 tonnes de graines fraîches pour avoir une tonne de graines séchées.<sup>34</sup>

En effet son adaptation aux climats chauds et secs, fait que le Neem est communément planté dans les régions sèches et subtropicales d'Océanie, d'Afrique, d'Amérique et d'Asie.<sup>34</sup>

---

<sup>34</sup> Reynolds, J., Neem Value Chain Senegal, Analysis and Strategic Framework For Sub-Sector Growth Initiatives, USAID, September 2007.



**Figure 10:** Répartition géographique du Neem au Sénégal

*Chapitre 2 :*  
*Plantes phytochimiques : le Neem (Azadirachta*  
*indica A. Juss) et ses multiples vertus.*

### ***II.1.) Les origines de l'utilisation des produits naturels dans la lutte contre les insectes***

Il nous faut remonter très loin dans l'histoire pour comprendre les raisons qui ont conduit l'humanité à se doter d'un arsenal de produits chimiques pour tenter d'assurer à l'ensemble des populations une quantité adéquate de nourriture et pour combattre un grand nombre de maladies transmises par les Arthropodes.

Depuis plus de 12 000 ans, l'homme commençait à cultiver, c'est-à-dire à créer des agro-écosystèmes. Ce sont des environnements simplifiés où se répète la même variété de plante, rangée après rangée. Cette concentration de la même espèce, de la même variété, rend facile le travail des insectes phytophages et accroît considérablement leur potentiel reproducteur. A ces attaques par les insectes, il faut ajouter la contamination par les pathogènes et l'envahissement des mauvaises herbes.<sup>35</sup>

Devant cette prolifération d'organismes nuisibles, et en particulier d'insectes phytophages s'attaquant aux ressources nécessaires au bien-être de l'humanité, un programme de lutte bien pensé a été entrepris. Ce programme prend en compte les équilibres biotiques et abiotiques. Cette approche prend en considération autant les besoins alimentaire et sanitaire d'une population toujours croissante que la préservation de l'environnement.

En effet, l'emploi de produits insecticides naturels et en particulier ceux d'origine végétale remonte à des temps très anciens. Ces produits insecticides employés jusqu'à une période très récente, ont connu un déclin suite à la découverte de substances chimiques de synthèse répartie en trois générations de pesticides:

- ❖ la première génération est constituée des composés à base d'arsenic, de soufre, de chaux, des dérivés du pétrole, des substances à base de fluor.
- ❖ la deuxième génération regroupe les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates.
- ❖ la troisième génération est celle des substances produites par les plantes elles-mêmes, soit les hormones des insectes et leurs analogues.

Mais la lutte chimique, malgré ses avantages indéniables, ne tarda pas à montrer ses limites par son spectre d'action sur les écosystèmes, notamment en raison de la pollution de

---

<sup>35</sup> Pimentel D., Hunter M. S., Lagro J. A., Efroymson R. A., Landers . C, Mervis . T., McCarthy C A., Boyd A. E.; Benefits and risks of genetic engineering in agriculture. *BioScience*, **1989**, 39, 606-614.

l'environnement et des problèmes d'intoxication à l'encontre d'une multitude d'organismes souvent non-ciblés. C'est dans ce contexte que l'on note un regain d'intérêt des substances qualifiées de « bio-pesticides » ou « pesticides écologiques » en particulier les produits insecticides d'origine végétale qui sont peu toxiques pour l'homme et pour l'ensemble des composantes de l'environnement.

La capacité que possèdent les plantes à se protéger a été réexaminée en détail depuis le début du siècle<sup>36</sup> en vue d'être exploitée à des fins agronomiques. La lutte contre les insectes entre donc dans une nouvelle phase puisque cette approche « botanique » fournit des moyens en meilleure harmonie avec l'environnement, moyens provenant des organismes à protéger eux-mêmes. Ces composés naturels et leurs dérivés devraient pouvoir réduire sensiblement les pertes subies par les plantes cultivées et la forêt. Ils devraient aussi servir de base pour la mise au point de nouvelles molécules capables d'anéantir les vecteurs de maladies. Les progrès notoires qui ont été accomplis dans ce domaine depuis le début de la présente décennie sont dus en grande partie à la collaboration étroite des phytotechniciens, des entomologistes, des chimistes et des toxicologues.<sup>37</sup> On peut donc envisager la mise au point d'insecticides plus spécifiques, non toxiques pour les organismes non-visés, biodégradables, et moins susceptibles de provoquer la résistance chez les espèces cibles. Il est aussi possible d'entrevoir, dans le contexte d'un développement soutenu, la production de molécules écologiquement désirables et économiquement adaptées aux pays les moins nantis<sup>38</sup> comme le Sénégal.

Les plantes synthétisent de nombreux métabolites secondaires dotés de propriétés répulsives, anti-apétantes ou biocides à l'égard des herbivores. Le règne végétal constitue la plus riche source de produits insecticides naturels du monde soit plus de 400.000 substances chimiques (terpènes, alcaloïdes, phénols, tannins) ont été reportés dans la littérature.<sup>39</sup>

---

<sup>36</sup> Verschaffelt C., The cause determining the selection of food in some herbivorous insects. *Proc. Acad. Sci.* (Amst); **1910**, 13, 536-542.

<sup>37</sup> Miller J. R., Miller T. A., (eds). (1986), *Insect-plant interactions*, Springer-Verlag, New-York

<sup>38</sup> Saxena R. C. (1988) ; Neem : a source of natural insecticides, Final Workshop of IRRI-ADB-EWC

<sup>39</sup> [http://www.ansd.sn/senegal\\_indicateurs.html](http://www.ansd.sn/senegal_indicateurs.html) le 09-01-2011

**Tableau 2** : Substances secondaires d'origines naturels<sup>40</sup>

Groupes Chimiques	Nombres de produits actifs identifiés
Alcaloïdes	4 500
Flavonoïdes	1 200
Terpènes	1 100
Autres	3 600
Total	10 400

La plante qui a surtout retenu l'attention des spécialistes à cause de ses propriétés anti-appétantes, est le Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*), une Méliacée originaire de l'Asie.<sup>41</sup> Au cours d'une invasion de sauterelles au Soudan en 1959, on a particulièrement remarqué que cet arbre était la seule plante qui échappait aux attaques des ces ravageurs, bien que les acridiens s'y soient posés à plusieurs reprises. Depuis, on a pu établir que le Neem renfermait plusieurs composés dont l'action ne se limitait pas à la phagorépression. Les recherches entreprises dans plusieurs laboratoires dans le monde ont permis de caractériser les principes actifs et leurs effets physiologiques, et d'établir que plus de 125 espèces d'insectes (provenant de sept ordres différents), dont les acridiens sont réfractaires au Neem et à ses molécules.<sup>42</sup>

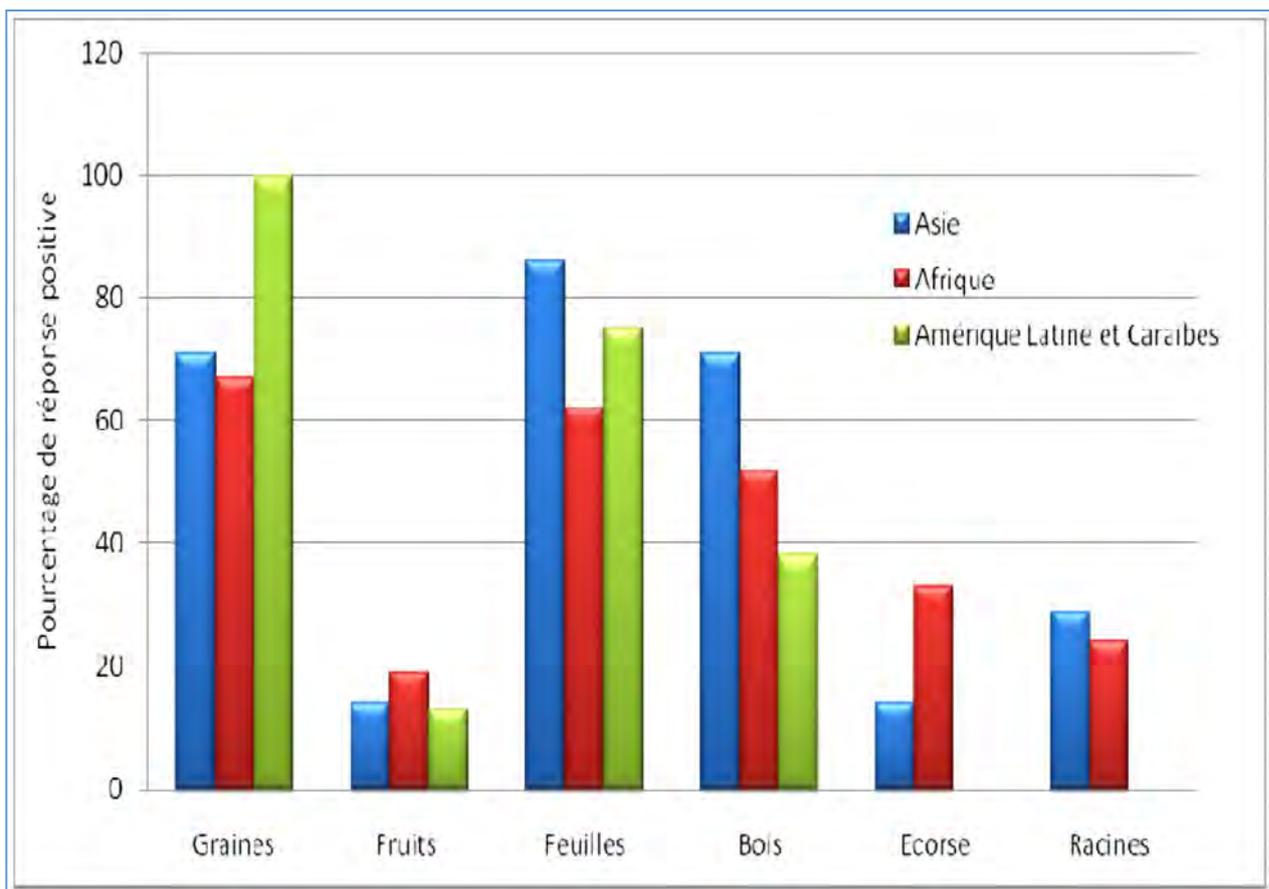
Les résultats d'enquête, à travers le monde sauf le continent européen, portant sur l'utilisation des différentes parties du Neem (fruits et graines, feuilles, racines, écorces, bois) montrent que les graines (pour leur propriétés biocides) et les feuilles (pour leur vertus thérapeutiques) sont les plus utilisées ; suivies du bois (**figure 11**).

---

<sup>40</sup> ISRA/CNRA, Utilisation de feuille de neem pour le contrôle des insectes ravageurs du niébé, ISRA, Bambey Sénégal, pp 8.

<sup>41</sup> Saxena M., Ravikanth K., Kumar A., Gupta A., Singh B., and Sharma A., Purification of *Azadirachta indica* seed Cake and Its Impact on Nutritional and Antinutritional Factors *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 4939-4844

<sup>42</sup> Wharten J. D. Neem (*Azadirachta indica* A.Juss): organisms affected and reference list update, *Proc. Ntomol. Soc. Wash*, **1989**, 91, 367-3



**Figure 11:** *Pourcentage de réponse positive sur l'utilisation de la graine, du fruit, des feuilles, du bois, de l'écorce et des racines de Neem selon différentes zones géographiques.*<sup>43</sup>

Depuis plusieurs années, les produits à base de Neem sont utilisés au Canada, au Brésil, au Japon, en Australie, en Inde et dans certains pays européens. En France, l'autorisation permettant l'utilisation d'extraits de Neem (concentré d'azadirachtine), n'est pas encore adoptée. Néanmoins, l'économie du Neem progresse partout dans le monde.

En effet de nombreuses entreprises brevettent de nouveaux produits insecticides à base de Neem tels que : *Agroneem* aux Etats-Unis et au Canada, *Neemazal* en Allemagne et en Australie , plus de 12 noms en Inde dont *Azadi*, *Margocide*, *Neemarin*, *Nimorich* (Tableau 2).

<sup>43</sup> Forster, P., Moser, G., Status report on global Neem usage, Ed. Eshbron (2000).

**Tableau 3 : Quelques formulations à base d'azadirachtine<sup>44,45,46</sup>**

<b>Nom commercial</b>	<b>Teneur en Azadirachtine</b>	<b>Fabriquant</b>
<b>Nimbecidine®</b>	0.03%	T. Stanes and Company Ltd. (Inde)
<b>Econeem®</b>	1%	Margo Bio-control Pvt. Ltd. (Inde)
<b>Soluneem®</b>	6.5%	Vittal Mallya Research Foundation (Inde)
<b>Limonool®</b>	0.03	Bio Multi-tech (Pvt) Ltd. (Inde)
<b>Neemgold®</b>	0.15%	SPIC Biotechnology Division (Inde)
<b>Econeem Plus®</b>	1%	Margo Bio-control Pvt. Ltd. (Inde)
<b>Fortune Aza®</b>	3%	Fortune Bio tech Lab, Hyderabad (Inde)
<b>NeemAzal TM-F</b>	5%	EID Parry (India) Ltd. (Inde)
<b>Neemix 4.5®</b>	4.5%	(Canada)
<b>Margocide-OK<sup>z</sup></b>	-	Monofix Agroproducts Ltd. (Inde)
<b>Neemark</b>	-	west Coast Herbochem Pvt. Ltd. (Inde)
<b>Neem Oil Emulsion</b>	-	Sio Agro Research Laboratories (Inde)
<b>Neem Plus</b>	-	B.D.Keathen and Co. (Inde)
<b>Neemrich</b>	-	National Chemical Laboratories (Inde)
<b>Neemosan</b>	-	Agro Links (Inde)
<b>Neemta 2100</b>	-	A.J. chemicals (Inde)
<b>Nimlin</b>	-	Sunline Agro Chemicals (Inde)
<b>Neem Azal T/S</b>	1%	Trifolio-M (Allemagne)
<b>Margosan-o</b>	0.3%	Grace Sierra Co USA
<b>Bioneem</b>	1%	Ringer Corporation USA

<sup>44</sup>Kumar, A.R.V., Jayadevi, H.C., Ashoka, H.J., Chandrashekara, K., Azadirachtin use efficiency in commercial neem formulations. *J. Current science* 84 (11) 1459-1464 (2003).

<sup>45</sup> Parmar, B.S., Ketkar, C.M., Commercialization. In *Neem Research and Development*; Randhawa, N. S., Parmar, B. S., Eds.; Publication 3; Society of Pesticide Science: New Delhi, 270-283 (1993).

<sup>46</sup> Biofil, Le nim (ou neem), l'arbre miracle (2008).

## **II.1.1) Utilisation de l'huile de neem dans la lutte contre les ennemis de cultures**

Les produits à base d'azadrachtine sont essentiellement des poisons de l'estomac et présentent une toxicité de contact, quand ils sont appliqués à des doses plus élevées. L'huile de neem brute agit efficacement comme un poison de contact particulier contre les insectes et les acariens à corps mou<sup>47</sup>. Action systémique est possible dans le cas de l'application du sol ou de la tige d'injection<sup>48</sup>. Dans des conditions de laboratoire l'efficacité biologique et les modes d'action de phytochimiques du neem sont pour la plupart dépendant de la dose.

### **II.1.1.1) Effets de l'huile de neem sur les cellules de l'intestin moyen des larves prédatrices *Ceraeochrysa claveri***

Les effets de l'huile de neem ingérée sur les cellules de l'intestin moyen des larves prédatrices *Ceraeochrysa claveri* ont été analysés. *C. claveri* ont été nourris avec les œufs de *Diatraea saccharalis* traitée avec une huile de neem à une concentration de 0,5%, 1% et 2% pendant toute la durée des larves.

La microscopie optique et électronique a montré des dommages graves sur les cellules colonnaires, qui ont eu de nombreuses protubérances cytoplasmiques, le regroupement des microvillosités rompus, les cellules gonflées, cellules rompues, la dilatation et la vésiculation du réticulum endoplasmique rugueux, développement de réticulum endoplasmique lisse, l'élargissement des espaces extracellulaires du labyrinthe basal, espaces intercellulaires et une nécrose. L'ingestion indirecte de l'huile de neem avec des proies peut entraîner des altérations graves montrant des effets cytotoxiques directs de l'huile de neem sur les cellules de l'intestin moyen des larves *C. claveri*.

### **II.1.1.2.) Activité acaricide de l'huile et quatre de ses sous composés séparés par chromatographie sur colonne**

---

<sup>47</sup> Isman, M.B., Koul, O., Luczynski, A., Kaminski, J., Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J. Agric. Food Chem.* 38, **1990**, 1406 - 1411.

<sup>48</sup> Gahukar, R.T., Potential and utilization of plant products in pest control. In: Abrol, D.P. (Ed.), Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective. *Elsevier Inc*, New York, NY, USA, **2014**, pp. 125 - 139.

*Sarcoptes scabiei* est l'un des ectoparasites vétérinaires les plus importantes chez les lapins<sup>49</sup> et entraîne une perte considérable de poids, la productivité et la qualité de la fibre de laine<sup>50</sup>. Les acaricides chimiques ont un effet significatif sur la maladie d'acariens; Cependant, les problèmes de résistance et la toxicité pour l'environnement sont également source de préoccupation. Les acaricides botaniques sont devenus des points focaux de la recherche en raison de leur innocuité pour l'environnement et de l'efficacité.

#### **II.1.1.2.1.) Extraction et fractionnement**

L'huile de neem est extraite des graines avec de l'éther de pétrole. Le fractionnement est fait sur colonne de gel de silice G (100-200 mesh), l'éluant est constitué d'un mélange d'hexane et acétate d'éthyle (8 : 2 v/v). La chromatographie sur couche mince a permis de constituer quatre fractions F1 à F4.

#### **II.1.1.2.2.) Dosage in vitro de l'activité acaricide**

L'extrait d'éther de pétrole et les quatre fractions (F1-F10) ont été dilués, selon la méthode établie par *Fichi*<sup>51</sup> avec de la paraffine liquide à 500 mL / L.

Les larves d'acariens ont été placées dans de petites plaques de polystyrène (8,5 mm de diamètre et 0,3 mm de profondeur) avec 10 acariens par plaque. Les solutions de 10 µL de l'huile de neem non dilué, extrait à l'éther de pétrole le ou les fractions (F1-F4) sont directement ajoutées aux plaques de polystyrène. Les pyréthrinés naturels (500 mg / mL) ont été utilisés comme témoin positif et de la paraffine liquide en tant que témoin négatif. Toutes les plaques ont été placées dans une chambre humide à 75% d'humidité relative et à 25° C et ont été observées par microscope stéréoscopique toutes les 6 heures pendant 24 heures. Chaque plaque est observée pendant 5 minutes, et replacée dans la chambre d'essai.

---

<sup>49</sup> Harrenstien, L., Gentz, E.J., Carpenter, J.W. How to handle respiratory, ophthalmic, neurologic, and dermatologic problems in rabbits. Dermatologic conditions Ectoparasitism, Symposium on rabbit medicine. *Veterinary Medical*. **1995**, 90, 373–380.

<sup>50</sup> Aiello, S.E., Mays, A., Amstutz, H.Z. Rabbits. In: Aiello, S.E. (Ed.), Merck Veterinary Manual. Merck, Inc., NJ, **1998**, 1386–1396.

<sup>51</sup> Fichi, G., Flamini, G., Giovanelli, F., Otranto, D., Perrucci, S., Efficacy of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. *Experimental Parasitology*. **2007**, 115, 168–172.

L'immobilité des larves d'acariens, l'absence d'une réaction en cas de stimulation avec une aiguille, ou une immobilité persistante sont considérées comme une indication de la mort<sup>52</sup>.



**Photo 1 :** *Microscope Stéréoscopique*



**Photo 2 :** *larves acariens*

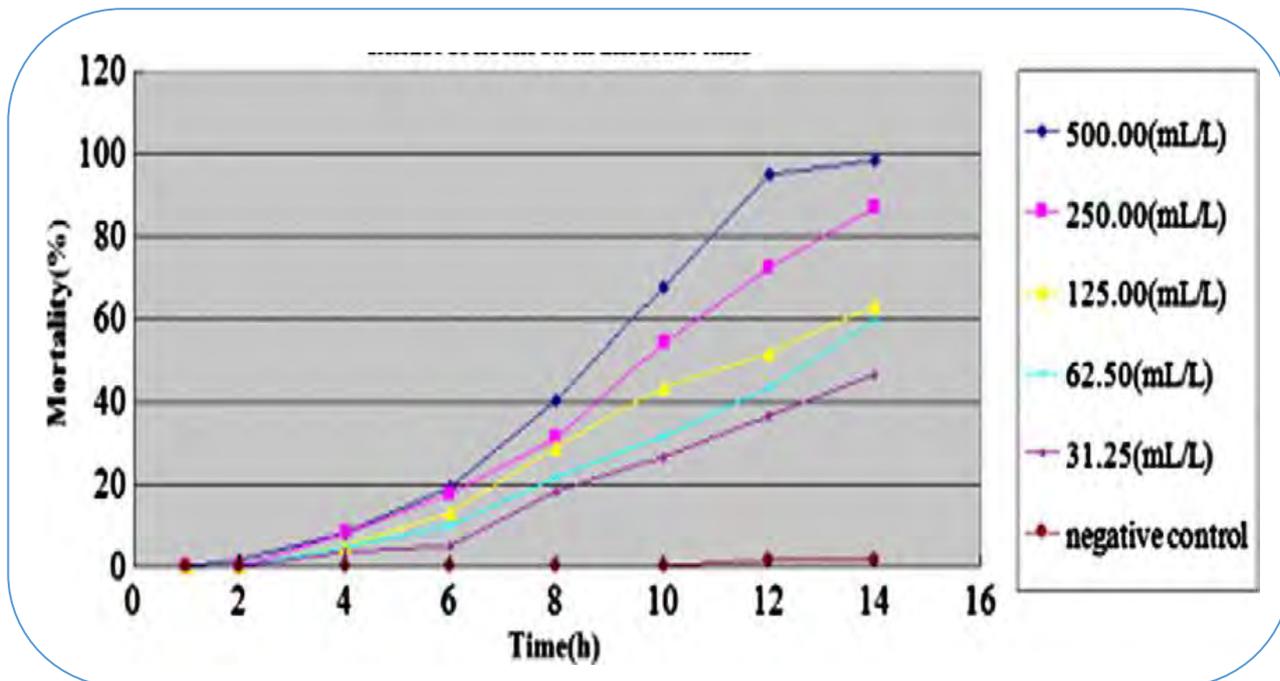
### **II.1.1.2.3.) Evaluation de la toxicité**

L'extrait à l'éther de pétrole, de l'huile de neem a été utilisé dans la toxicité essais (concentration létale médiane, CL50 et le temps létale médiane LT50)

Les essais de toxicité ont été effectués sur les larves de *S. scabiei*. Les extraits ont été dilué à 500.00, 250.00, 125.00, 62,50 et 31,2 mL / L avec de la paraffine liquide. Les plaques de polystyrène contenant des acariens (20 acariens par plaque) ont été trempées dans les différentes concentrations d'extraits. La paraffine liquide a été utilisée comme témoin. Chaque traitement a été répété trois fois. Toutes les plaques contenant les acariens ont été incubées sous 25°C et 75% d'humidité relative, et le nombre d'acariens morts étaient calculé toutes les 2 h pendant 24 h. Chaque plaque a été observée pendant 5 min puis replacée dans la chambre d'essai.

---

<sup>52</sup> Macchioni, F., Perrucci, S., Cecchi, F., Cioni, P.L., Morelli, I., Pampiglione, S., Acaricidal activity of aqueous extracts of chamomile flowers *Matricaria chamomilla* against the mite *Psoroptes cuniculi*. *Medical and Veterinary Entomology*. **2004**, 18, 205–207.



**Figure 12 :** La mortalité cumulée de *S. scabiei* var. *cuniculi* larvaire en fonction du temps exposées à l'huile de neem

La courbe de régression virulence a montré que l'effet du temps (coefficient  $R > 0,920$ ) était inférieur à l'effet de la concentration sur le *S. scabiei* var. *Les larves cuniculi* (coefficient de  $R = 0,982$ ). L'activité acaricide de l'extrait d'éther de pétrole était à la fois dépendante du temps et de la concentration. Avec l'augmentation de la concentration et le temps, le taux de mortalité de larves était élevé. Un résultat similaire a été rapporté par *Abdel-Ghaffar et Semmler*. Ils ont constaté que l'huile de neem a montré une relation pharmacodynamique similaire contre *Amblyomma variegatum* des bovins<sup>53</sup>.

Les quatre fractions F1 à F4 constituent respectivement 4,1%, 53,3%, 29,3% et 5,5% de l'extrait passé sur colonne chromatographique. L'activité acaricide des quatre fractions a été testée ; les données de mortalité sont reportées dans le **tableau 4**. La fraction 4 a une puissante activité acaricide, son activité atteint 100% au bout 16 h. La fraction 2 a également été active avec un taux de mortalité de 68,3%. Il a été rapporté par *Du et al* que l'extrait

<sup>53</sup> Abdel-Ghaffar, F., Semmler, M. Efficacy of neem seed extract shampoo on head lice of naturally infected humans in Egypt. *Parasitology Research*. **2007**, 100 (2), 329–332.

d'huile de neem présentait une activité acaricide puissante<sup>54</sup>. Les résultats confirment la substance active acaricide est principalement présente dans la fraction 4 (F4).

**Tableau 4 :** Les mortalités des quatre fractions de l'extrait d'éther de pétrole contre les larves *S. scabiei* var. *cuniculi* in vitro.

Temps (h)	Mortalité (%)			
	Fraction1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction4
2	0.00	0.00	3.33	0.00
4	1.67	3.33	3.33	13.33
6	5.00	3.33	8.33	30.00
8	6.67	8.33	8.33	53.33
10	10.00	13.33	15.00	71.67
12	20.00	26.67	20.00	88.33
14	25.00	38.33	23.33	91.67
16	33.33	68.33	31.67	100.00

En conclusion, les données présentées ici montrent que les extraits d'éther de pétrole de l'huile de neem, et en particulier deux de ses quatre fractions (F2 et F4) ont in vitro une activité acaricide contre *Sarcoptes scabiei* var. *Les larves cuniculi*.<sup>55</sup>

### II.1.1.3.) La bio-efficacité du neem dans la lutte phytochimique antiparasitaire en agriculture : *Spodoptera littoralis*

. Lorsque les larves *S. littoralis* (Troisième ou quatrième stade larvaire) sont nourris avec des aliments artificiels contenant 0.01 - 0,6 ppm (0.000001 - 0.00006 %) ou 0.3 - 0.6 ppm (0.00003 - 0,00006 %) d'azadirachtine, des effets régulateurs de croissance des insectes étaient observés à faible concentration alors que des concentrations plus élevées conduit

<sup>54</sup> Du, Y.H., Jia, R.Y., Yin, Z.Q., Pu, Z.H., Chen, J., Yang, F., Zhang, Y.Q. Acaricidal activity of extracts of neem (*Azadirachta indica*) oil against the larvae of the rabbit mite *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* in vitro. *Veterinary Parasitology*. **2008**, 157, 144–148.

<sup>55</sup> Deng Y., Shi D., Yin Z., Guo J., Jia R., Xu J., Song X. Acaricidal activity of petroleum ether extract of neem (*Azadirachta indica*) oil and its four fractions separated by column chromatography against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* larvae in vitro. *Experimental Parasitology*. **2012**, 130, 475–477

directement à la mortalité des ravageurs<sup>56,57</sup>. Un mélange d'huile de neem et d'hydroxy anisole butylé peut augmenter de 21 % l'activité anti appétant de l'azadirachtine sur *S litura* comparé à son activité prise seule<sup>58</sup>. Dans certains cas, les mélanges peuvent être inefficaces contre les parasites probablement en raison de l'antagonisme qui peut se produire entre les différents composants dans les formulations<sup>59</sup>



*Spodoptera littoralis*

### ***II.1.2.) Les principales cultures et ravageurs rencontrés au Sénégal***

Au Sénégal les céréales et les légumineuses constituent la base de la nourriture des populations. Le mil et le maïs sont les deux céréales majoritairement cultivées au Sénégal, tandis que l'arachide avec le niébé, sont les principales légumineuses cultivées dans le pays.

---

<sup>56</sup> Martinez, S., van Emden, H.F., Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* 30, **2001**, 113 - 125.

<sup>57</sup> Boursier, C.M., Bosco, D., Coulibaly, A., Negre, M., Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin-A? *Crop Prot.* 30, **2011**, 318 - 322.

<sup>58</sup> Khan, M.A., Saxena, R.B., Shakil, N.A., Gupta, A.K., Photostabilization of azadirachtin- A. *Pestic. Res. J.* 15, **2003**, 7 - 9.

<sup>59</sup> Sinzogan, A.A.C., Kossou, D.K., Atachi, P., van Huis, A., Participatory evaluation of synthetic and botanical pesticide mixtures for cotton bollworm control. *Intl. J. Trop. Insect Sci.* 26, **2006**, 246 - 255.

Cependant les principaux ravageurs rencontrés au Sénégal sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (**tableau 5**).

**Tableau 5:** Principales espèces d'insectes rencontrées dans les stocks de céréales et légumineuses au Sénégal.

Insectes	Famille	Denrées infestées
<i>Caryedon serratus</i> (Oliv.)	Bruchidae	Arachides
<i>Callosobruchus maculatus</i> (F.)	Bruchidae	Niébé
<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Say)	Bruchidae	Niébé
<i>Sitophilus zeamais</i> Motsch	Curculionidae	Céréales
<i>Sitophilus oryzae</i> (L.)	Curculionidae	Céréales
<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst)	Tenebrionidae	Céréales / légumineuses
<i>Tribolium confusum</i> (Du Val)	Tenebrionidae	Céréales / légumineuses
<i>Sitotroga cerealella</i> (Oliv.)	Gechidae	Céréales
<i>Corcyra cephalonica</i> (Stainton)	Pyralidae	Céréales
<i>Ephestia cautella</i> (Walker)	Pyralidae	Céréales
<i>Cryptolestes</i> sp.	Cucujidae	Céréales
<i>Rhyzopertha dominica</i> (F.)	Bostrichidae	Céréales
<i>Plodia interpunctella</i> (Hübner)	Pyralidae	Céréales
<i>Trogoderma granarium</i> (Everts)	Dermeestidae	Céréales

### II.1.3.) La lutte apportée aux ravageurs

Face aux attaques et à la déperdition des stocks de céréales et de légumineuses par les insectes un certain nombre d'insecticides sont utilisés dans la protection des stocks au Sénégal.

#### II.1.3.1.) La lutte chimique

Sur les 101 pesticides autorisés au Sénégal dont la dernière actualisation a eu lieu en 2009 seuls quatre molécules (**tableau 6**) ont été retenues dans la protection des denrées alimentaires.

**Tableau 6 :** *Insecticides autorisés dans le traitement des denrées alimentaires (extrait de la liste des pesticides autorisés par le CSP\* du CILSS\*, version de juillet 2009).*

Spécialité commerciale	Firme	Matière(s) active(s)	Domaine d'utilisation
DETIA GAS EX-B	Détia Degesch Gmbh	Phosphured'aluminium (570 g.l-1)	Ravageurs des denrées stockées
PHOSFINON 570 GE	STPC	Phosphured'aluminium (570 g.l-1)	En fumigation contre les insectes des denrées stockées
CELPHOS	Excel Crop Care LTD	Phosphured'aluminium (560 g.l-1)	Insecticide/rodenticide contre les insectes et les rongeurs des denrées stockées
SPINTOR POUDRE	Dow Agro Sciences	Spinosad (125 g.kg-1)	Ravageurs des denrées stockées

\* CILSS : Comité Permanent Inter-états de Lutte contre la Sècheresse au Sahel

\* CSP : Comité Sahélien des Pesticides

Toutefois, il convient de noter que dans la pratique, d'autres insecticides non appropriés sont encore couramment utilisés.

Néanmoins actuellement, aucun groupe parmi les organophosphorés, organochlorés, pyrèthrinoïdes ou encore fumigants, n'échappe à la résistance des insectes. La résistance des insectes aux pesticides de synthèse est l'un des principaux méfaits de l'application répétée des produits contre les ravageurs. Actuellement, près de 750 000 personnes contractent, chaque année, une maladie chronique telle que les cancers suite à une exposition à des pesticides. Plus de 20 000 décès accidentels et 3 millions d'empoisonnements liés aux pesticides sont annuellement recensés dans le monde<sup>60</sup>.

Face à la nuisance des insecticides de synthèses et à leur manque d'efficacité vis-à-vis des ravageurs il a été développé d'autres formes de lutttes contre les insectes tel que les plantes.

<sup>60</sup> PAN Africa (Pesticide Action Network), 2003. *Les pesticides au Sénégal*. 2e éd. Dr Abou Thiam & Dr Alassane Sarr,eds.

### ***II.1.3.2.) L'utilisation des huiles essentielles***

Les huiles essentielles des plantes font partie ces dernières années des voies les plus explorées dans la régulation des ravageurs. Leur application dans la protection des stocks a fait l'objet de nombreux travaux. Leur toxicité s'exprime de différentes manières : activités ovicide, larvicide, antinutritionnelle et inhalatoire<sup>61,62</sup>.

### ***II.1.3.3.) L'utilisation des plantes insecticides***

Un certain nombre de plantes insecticides (**tableau 7**) sont utilisés au Sénégal contre les ravageurs pour leurs effets répulsifs, de contact ou fumigant. Les molécules actives peuvent varier d'une famille à une autre et à l'intérieur d'une même famille la sensibilité peut différer pour un insecte donné d'un stade à un autre. Le tableau 5 indique quelques espèces employées en Afrique occidentale dans la lutte contre les insectes.

Le neem *Azadirachta indica* est sans doute la plante la plus étudiée pour ses propriétés antiappétantes, répulsives, toxiques et inhibiteur de la croissance des insectes. Plusieurs composés ont été mis en évidence dans l'activité du neem et les principaux sont des limonoïdes. L'azadirachtine en est le composé majoritaire ; la salanine, la nimbine et leurs analogues sont aussi significativement présents<sup>63</sup>.

Cependant, seuls l'azadirachtine A (Aza A) et le 3-thigloyazadirachtol (Aza B) ont une activité significative.

---

<sup>61</sup> Keita S.M. et al., **2000**. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.*, **36**, 355-364.

<sup>62</sup> Regnault-Roger C., **2002**. De nouveaux phyto-insecticides pour le troisième millénaire ? *In* : Philogène B.J.R, Regnault-Roger C. & Vincent C., coord. *Biopesticides d'origine végétale*. Paris : Lavoisier-Éditions Tec & Doc, 19-39.

<sup>63</sup> (Lale N.E.S. & Abdulrahman H.T., **1999**. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil obtained by different methods and neem powder for the management of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *J. Stored Prod. Res.*, **35**, 135-143.).

Nakanishi K. *J. Am. Soc.* 1975, 1975-1977

**Tableau 7 :** *Quelques plantes couramment utilisées dans les greniers paysans contre les insectes des stocks au Sénégal et en Afrique de l'Ouest.*

<b>Plantes</b>	<b>Famille De plantes</b>	<b>Partie utilisée De la plante</b>	<b>Denrées traitées</b>	<b>Références</b>
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	feuilles, graines	niébé	64
<i>Bascia senegalensis</i> (Pers.) Lam ex Poir	Capparaceae	feuilles, fruits	niébé	65
<i>Calotropis procera</i> AIT	Asclepiadaceae	feuilles	arachide	66
<i>Cassia occidentalis</i> L.	Caesalpinieaceae	feuilles, graines	niébé	64
<i>Senna occidentalis</i> L.	Leguminosae	feuilles	arachide	66
<i>Striga hermonthica</i> (Del.)	Scrophulariaceae	feuilles	niébé	67

<sup>64</sup> Seck D., **1993**. *Développement de méthodes alternatives de contrôle des principaux insectes ravageurs des denrées emmagasinées au Sénégal par l'utilisation de plantes indigènes*. Thèse de doctorat : Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).

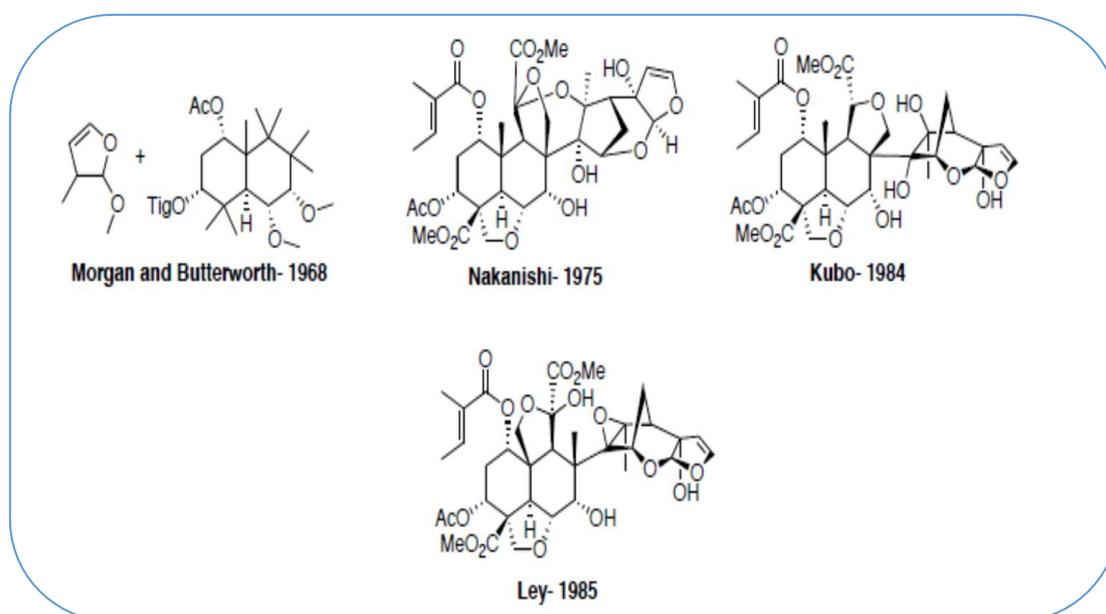
<sup>65</sup> Sanon A., **2005**. Combining *Boscia senegalensis* Lamarck (Capparaceae) leaves and augmentation and the larval parasitoid *Dinarmus basalis* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae) for bruchids control in stored cowpea. *J. Entomol.*, **2**(1), 40-45.

<sup>66</sup> Thiaw C., **2007**. Ovicid and adulticid effects of powders and extracts of *Calotropis procera* AIT. and of *Senna occidentalis* L. on *Caryedon serratus* (Ol.) destroyer of groundnut stocks. *J. Sci.*, **7**(3), 1-15.

<sup>67</sup> Kiendrebeogo M., Ouedraogo A.P. & Nacoulma O.G., **2006**. Activités insecticides de *Striga hermonthica* (Del.) Benth (Scrophulariaceae) sur *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera : Bruchidae). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **10**(1), 17-23.

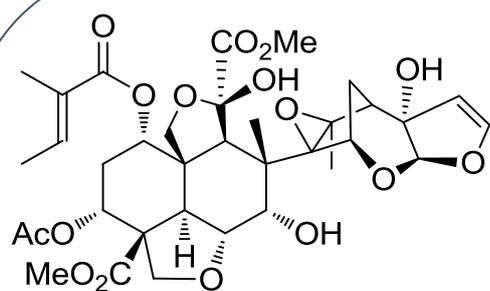
## II.2.) Le Neem : Chimie et Principe actifs.

Les extraits de graines de Neem renferment un mélange de plus de 168 composés constitués d'un groupe de sept substances proches incluant l'azadirachtine. Il s'agit de terpénoïdes (structures multi cycliques). L'azadirachtine-A est considéré très largement comme le principal composé à propriétés insecticides du Neem, même s'il a néanmoins été prouvé qu'il ne suffisait pas, à lui seul, pour expliquer les remarquables propriétés du Neem. Cependant depuis son isolation une série de structures ont été proposés par différents chercheurs. C'est au bout de 17 ans que l'équipe de *ley et al*<sup>68</sup> ont proposé la dernière structure ; non modifiée depuis lors.

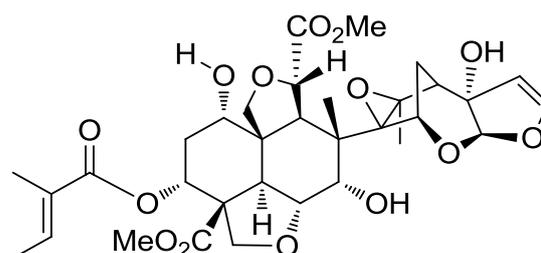


**Figure 13 :** les structures proposées depuis sa première isolation de 1968 par Morgan et al à 1985 par Ley et al.<sup>68</sup>

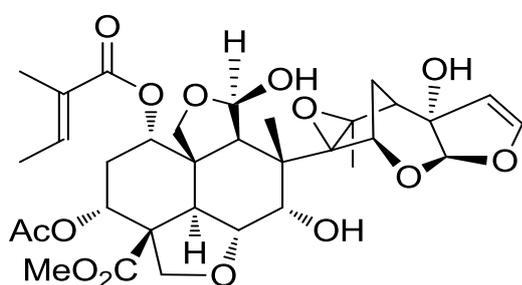
<sup>68</sup> *Nat. Prod. Rep.*, **1993**, 109-157.



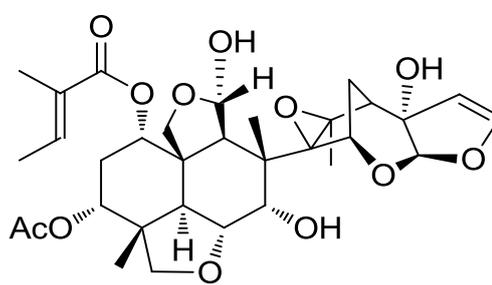
Azadirachtin - A  
(C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>O<sub>16</sub>)



Azadirachtin - B  
(C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>O<sub>14</sub>)



Azadirachtin - C  
(C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>O<sub>14</sub>)



Azadirachtin - H  
(C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>O<sub>12</sub>)

**Figure 14** : structures de limonoïdes isolés des graines de neem

L'azadirachtine est distribué dans toutes les parties du Neem mais les graines en sont la principale source. La teneur en azadirachtine dans les graines varie entre 0.1 et 4.8%, en fonction de l'origine géographique des échantillons. La teneur des feuilles est deux fois moindre que celles des fruits<sup>69</sup>.

### II.2.1.) Description de l'arbre

Le Neem est un arbre à feuillage persistant formant une cime arrondie ; en taille moyenne il atteint 8 à 15m de hauteur et peut dépasser 20 m dans des conditions favorables,

<sup>69</sup> Ermel K, Pahlich E, Schmutterer H. 1987. Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations and its dependence on temperature, relative humidity and light. *Proc. 3rd Neem Conf., Nairobi, Kenya*; 171-184.

avec un tronc court et droit d'un diamètre de 2,5 m. L'écorce d'épaisseur moyenne, gris foncée extérieurement, brun rougeâtre intérieurement est crevassée longitudinalement et obliquement. Cet arbre peut vivre jusqu'à 200 ans.<sup>70</sup> Le Neem est une des rares espèces à donner encore des résultats très correctes en couverture végétale sous l'isohyète 600 mm en Afrique tropicale sèche : il résiste à la sécheresse et accepte une température moyenne annuelle comprise entre 21 et 32°C. Il pousse sur des sols variés mais de préférence sur des sols légers et profonds ; au Sénégal nous le retrouvons même sur les sols latéritiques du Bandia (Sénégal).<sup>71</sup>

### ***II.2.2.) Caractéristique botanique du Neem***

Le Neem a été décrit en 1830 à partir du nom perse "*Azad-datkh-t-i-hindi*" par le botaniste français Antoine Laurent De JUSSIEU.<sup>72</sup> Les feuilles sont imparipennées. Le pétiole est glabre et long de 12 à 24 cm. Les folioles sont au nombre de 6 à 7 paires opposées un peu coriaces, longues de 6 à 8 cm et larges de 2 à 3 cm. Le limbe est denté, lancéolé, oblique, asymétrique, aigu au sommet et inégal à la base. Les inflorescences sont des panicules axillaires de fleurs nombreuses en petites cimes et à pédoncule court. Les fleurs sont odorantes, blanches et longues de 5 à 6 millimètres (mm). On distingue cinq petits sépales orbiculaires, 5 pétales oblongs libres imbriqués, 10 étamines en tube glabre long de 3 à 5 mm, des anthères sessiles ovales, 5 loges s'ouvrant par deux fentes longitudinales et un ovaire globuleux glabre avec 3 loges biovulées à placentation axile. Les fruits sont des drupes ellipsoïdes de couleur variable selon le stade de maturité, long de 1,5 à 2 cm, avec un endocarpe ligneux.<sup>33</sup>

### ***II.2.3.) Développement des fruits de Neem***

La fructification débute à l'âge de 4-5 ans et atteint le maximum de production vers 10 ans. Les arbres adultes peuvent fournir 30 à 50 Kg de fruits par an. Il est difficile d'estimer

---

<sup>70</sup> Petit J.L., Le Nim (Neem), l'arbre miracle : L'insecticide se fait désirer p 49-50.

<sup>71</sup> *Revue Bois et Forêts des tropiques* n° 217, 3<sup>ie</sup> trimestre 1998. pp 36.

<sup>72</sup> Ganaba S.,: A propos du Neem au Burkina Faso, Nécessité d'une maîtrise de son expansion, *Science et Technique* vol XXII n°1 ; *Revue Semestrielle de la Recherche au Burkina Faso, Série Sciences Naturelles*, 1996, pp. 66-74.

exactement le stade de développement des fruits du Neem sur la base de la forme, du volume ou de la couleur du péricarpe. Cependant selon *Sacande et al.*<sup>73</sup>, le développement des fruits du Neem peut être réparti en 3 phases principales :

**Phase 1** : Stade immature, âgés de moins cinq semaines ;

**Phase 2** : Moitié du cycle de développement du fruit, compris entre six à dix semaines ;

**Phase 3** : Stade de maturation des fruits, entre onze et quinze semaines : Les études faites par *Johnson et al 1996*<sup>41</sup> portant sur le développement des fruits de neem de six arbres (A-F) de Sri Lanka montrent que les premiers fruits mûr sont obtenus au plutôt 156 jours après le début de la formation des fleurs. La maturité complète des fruits est atteinte entre 193 et 203 jours. Toujours dans cette même étude la variation de la teneur en Azadirachtine-A dans les fruits a été déterminée durant toute la période de maturation [*Figure 11 (11a, 11b, et 11c)*]. Les résultats montrent que le maximum de la teneur d'Azadirachtine-A est obtenu quand les fruits sont verts (non mûr).



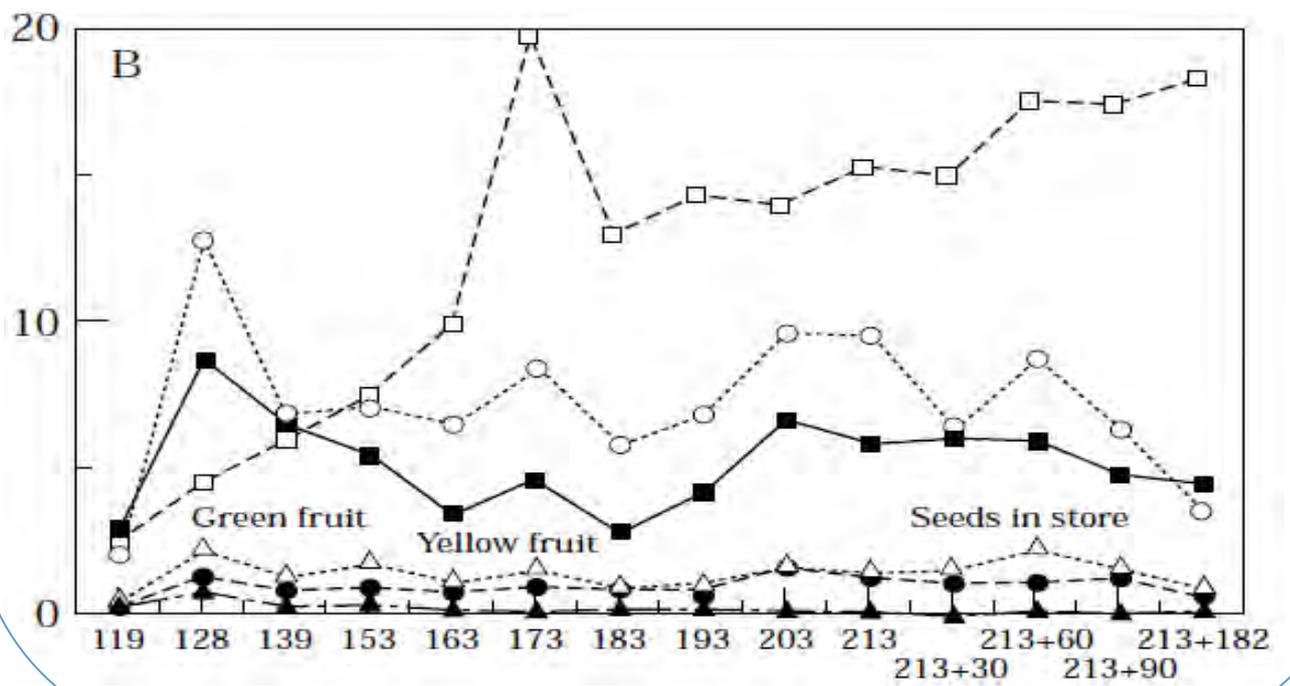
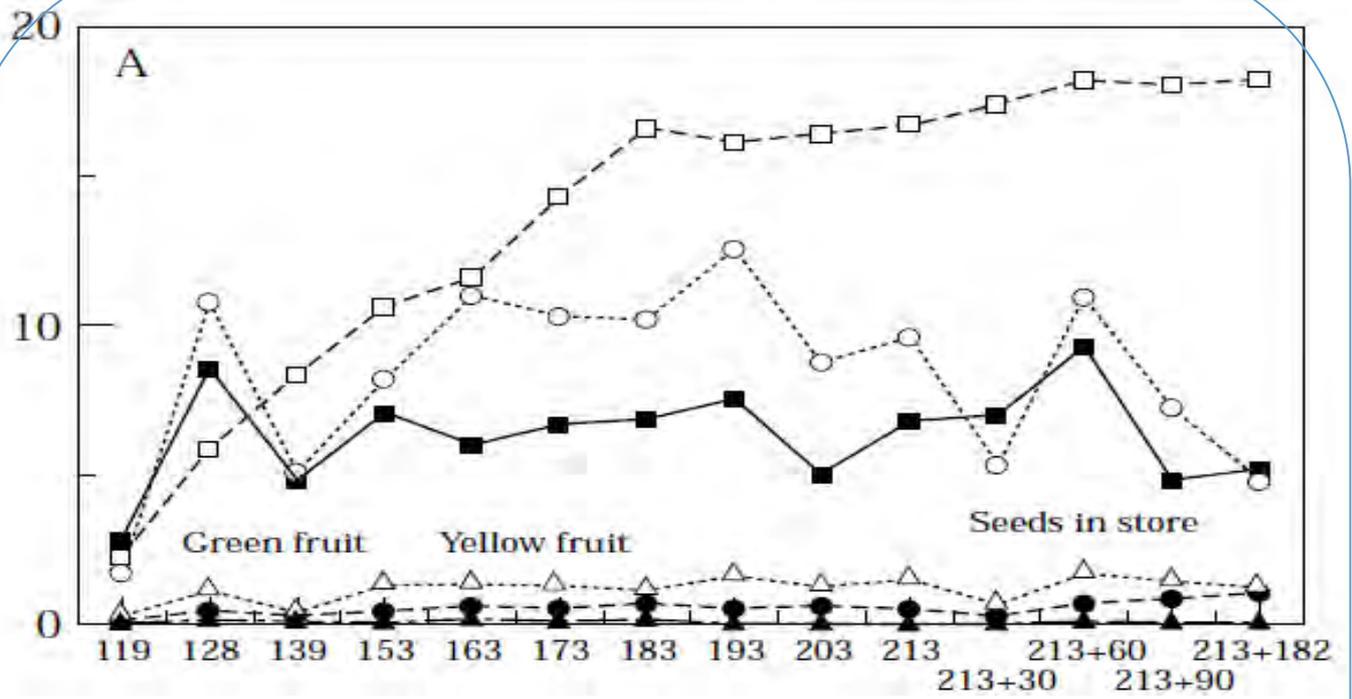
**Photo 3** : Fruits mûr



**Photo 4** : Fruits non mûr

---

<sup>73</sup> Sacande. M. and Groot. P.C., 1995: Proposai for a standard protocol for studies on Neem seed development (*Azadirachsa indica* A Juss.). P 7.



**Figure 15a :** *Suivi des fruits des arbres A et B*

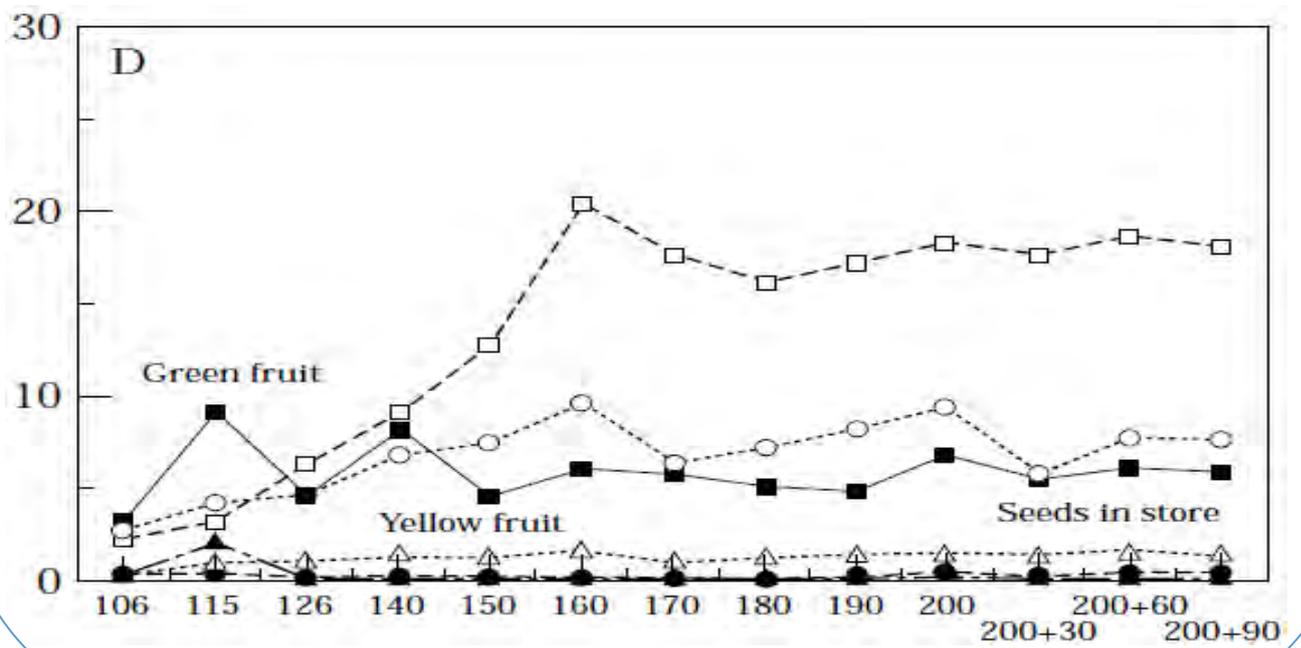
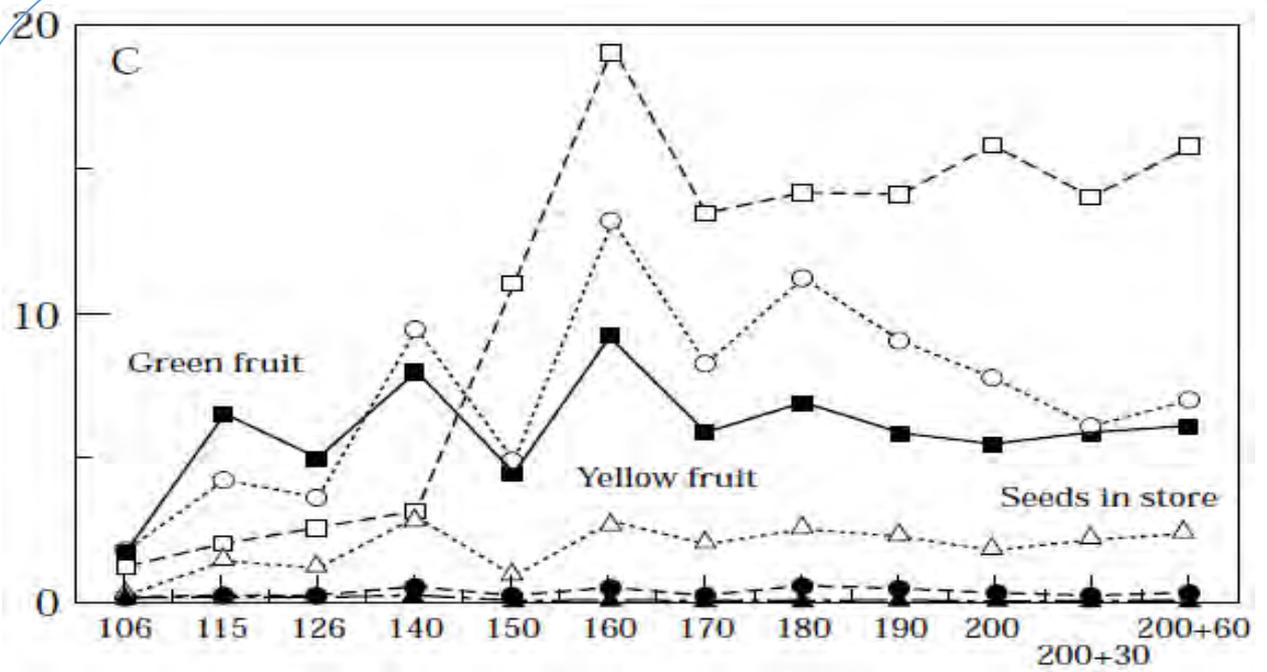


Figure 15b : Suivi des fruits des arbres C et D

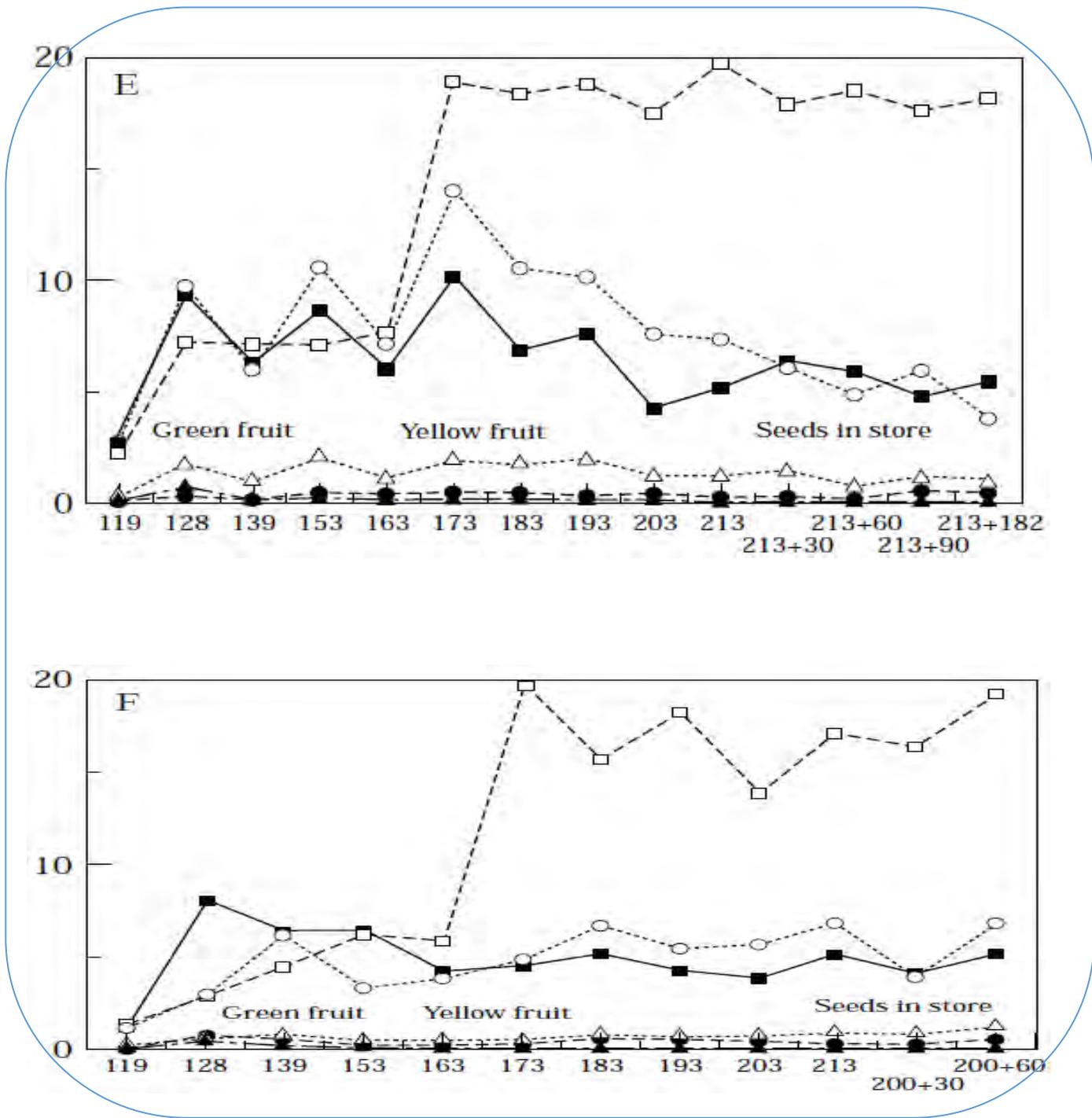


Figure 15c : Suivi des fruits des arbres E et F

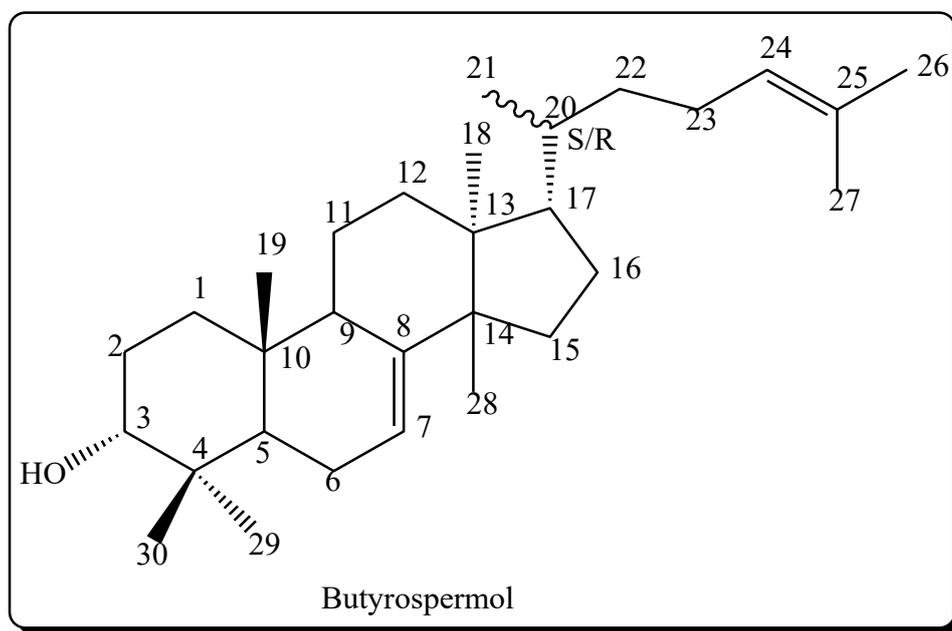
Figure 15 : teneur de cinq tritertpenoïdes et l'huile des fruits des six arbres (A-F) sélectionnés<sup>74</sup>

(---○---) Salannin; (—●—) Nimbin; (---△---) 3-Deacetylsalannin; (---▲---) 6-Deacetylsalannin; (—■—) Azadirachtin; (---□---) Oil.

<sup>74</sup> Johnson S., Morgan E. D., Peiris C. N., Development of the major Triterpenoids and Oil in the Fruit and Seeds of Neem (*Azadirachta indica*); *Annals of Botany*, 1996, 78, 383-388.

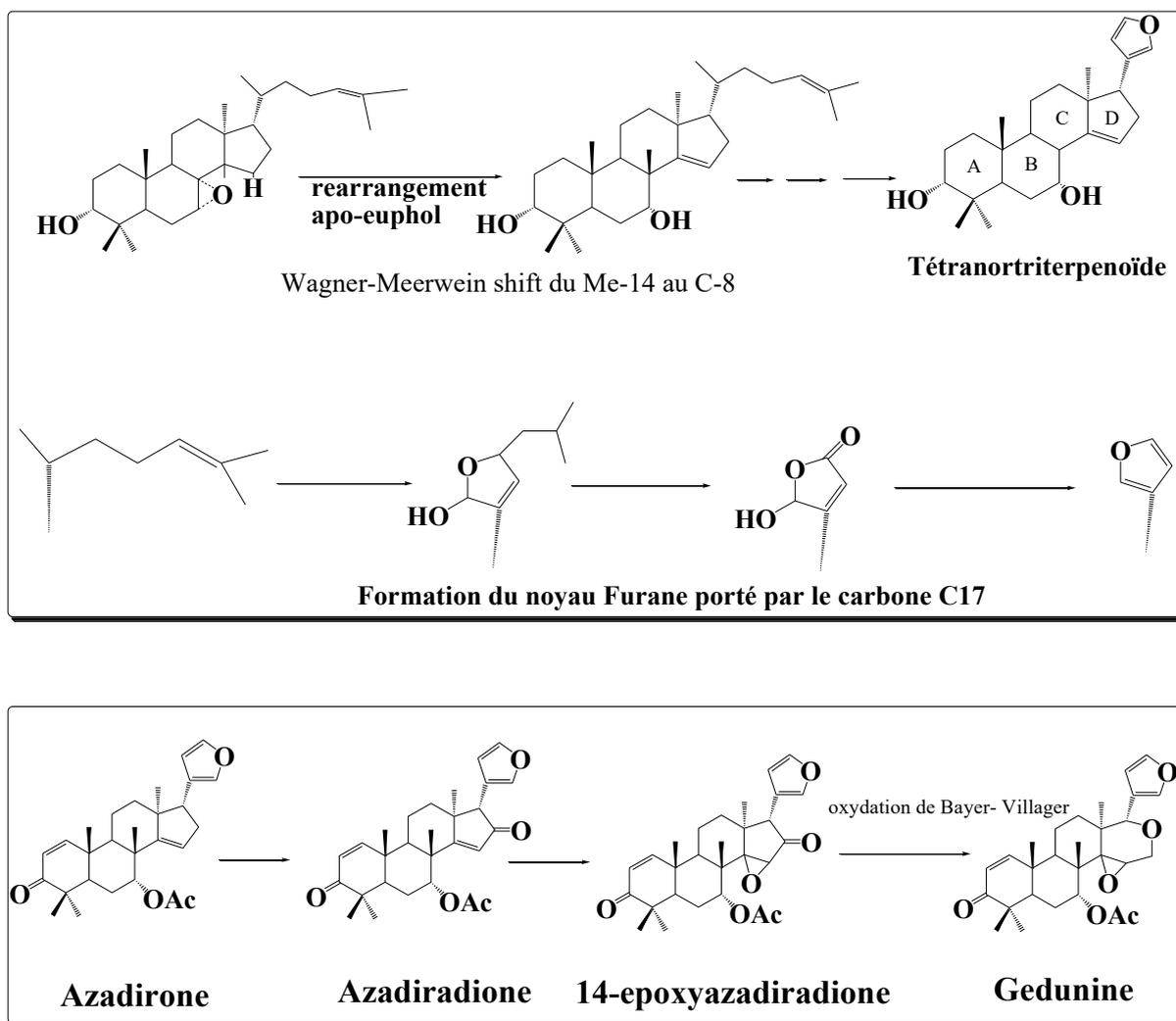
## II.2.4.) Formation des limonoïdes

### II.2.4.1.) Par biosynthèse



Les stéroïdes  $\Delta^7$ - *tirucallol* [H-20, C-20 (R)] et  $\Delta^7$ - *euphol* [H-20, C-20 (S)] sont considérés comme étant les précurseurs des limonoïdes.<sup>75</sup> Chez *Azadiracta indica* A. Juss, cette transformation donne naissance aux molécules telles que l'azadirone, l'azadiradione et le 14-epoxyazadione, nommées sous le terme général apo-euphol limonoïdes ou tétranortriterpénoïdes (**figure 16**).<sup>75</sup>

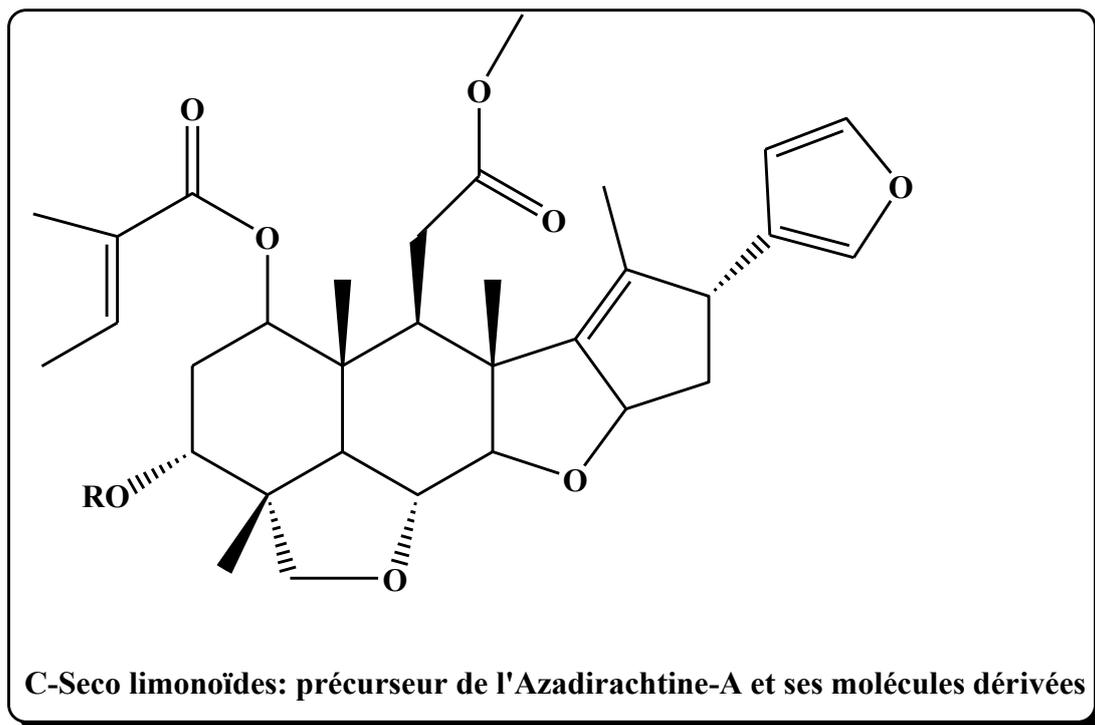
<sup>75</sup> Champagne D.E., Koul O., Isman M.B., Scudder G.G.E. et Neil Towers G.H. : Biological activity of limonoïdes the rutaes.; *Phytochemistry*, **1992**, 31: 377-394.



**Figure 16 :** Formation par la voie de biosynthèse de limonoïdes

Suite à la formation de ces simples tétranortriterpènes, une série d'oxydations et de réarrangements moléculaires vont donner : des D-*seco*-limonoïdes tels que la gedunine, suite à l'oxydation du cycle D en une lactone ; des C-*seco*-limonoïdes tels que la nimbine, la 6-désacétylnimbine et la salannine, suite à l'oxydation du cycle C en une lactole.<sup>46</sup> Puis de nouveaux réarrangements et de nouvelles oxydations de ses substances vont aboutir à la formation de C-*seco*-limonoïdes fortement oxydés dont l'azadirachtine et ses molécules dérivées (Azadirachtine - B,D,F,H,I,K).<sup>76</sup>

<sup>76</sup> Govindachari T.; Sandhya G.; et Ganeshraj S.P. Isolation of novel azadirachtins H and I by high performance liquid chromatography, *Chromatographia*, **1991**, 31: 303-305.



Les C-*seco*-limonoïdes ne se retrouvent que chez les espèces appartenant au genre *Azadirachta* et *Melia*.<sup>37</sup> Dans ces arbres, les C-*seco*-limonoïdes se retrouvent dans toutes les parties de l'arbre. Chez *Azadirachta indica* A.Juss, cette famille de molécules est présente en plus grande quantité dans les amandes des graines. L'Azadirachtine est le C-*seco*-limonoïdes qui se trouve en plus fortes proportions dans les amandes des graines de neem.<sup>77</sup>

<sup>77</sup> Jarvis A. P. Morgan E.D., et Edwards C. Rapid Separation of triterpenoids from neem seed extracts. *Phytochem. Anal.*, **1999**, 10: 39-43.

### II.2.5.) Méthodes d'obtention de l'Azadirachtine – A

De nos jours deux méthodes d'obtention de l'Aza-A sont connues : la *synthèse organique* et l'*extraction* des graines de neem.

#### II.2.5.1.) Synthèse organique de l'Azadirachtine – A

Cette partie de la revue bibliographique sur la synthèse de l'Azadirachtine-A n'est pas de faire une étude exhaustive sur les modes de synthèses organiques de l'Aza-A. Mais l'objectif est plutôt de montrer qu'à l'heure actuelle l'extraction reste la méthode d'obtention de l'Aza-A la plus efficace du fait des mauvais résultats obtenus par synthèse organique. Cependant deux méthodes sont citées comme références dans la synthèse organique de l'Aza-A (Murai et al ; Ley et al.).

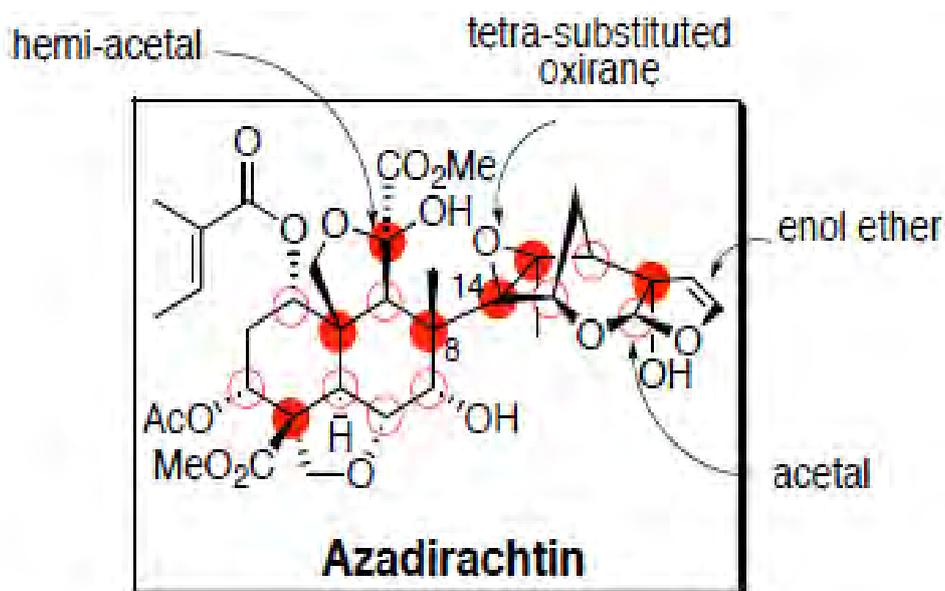
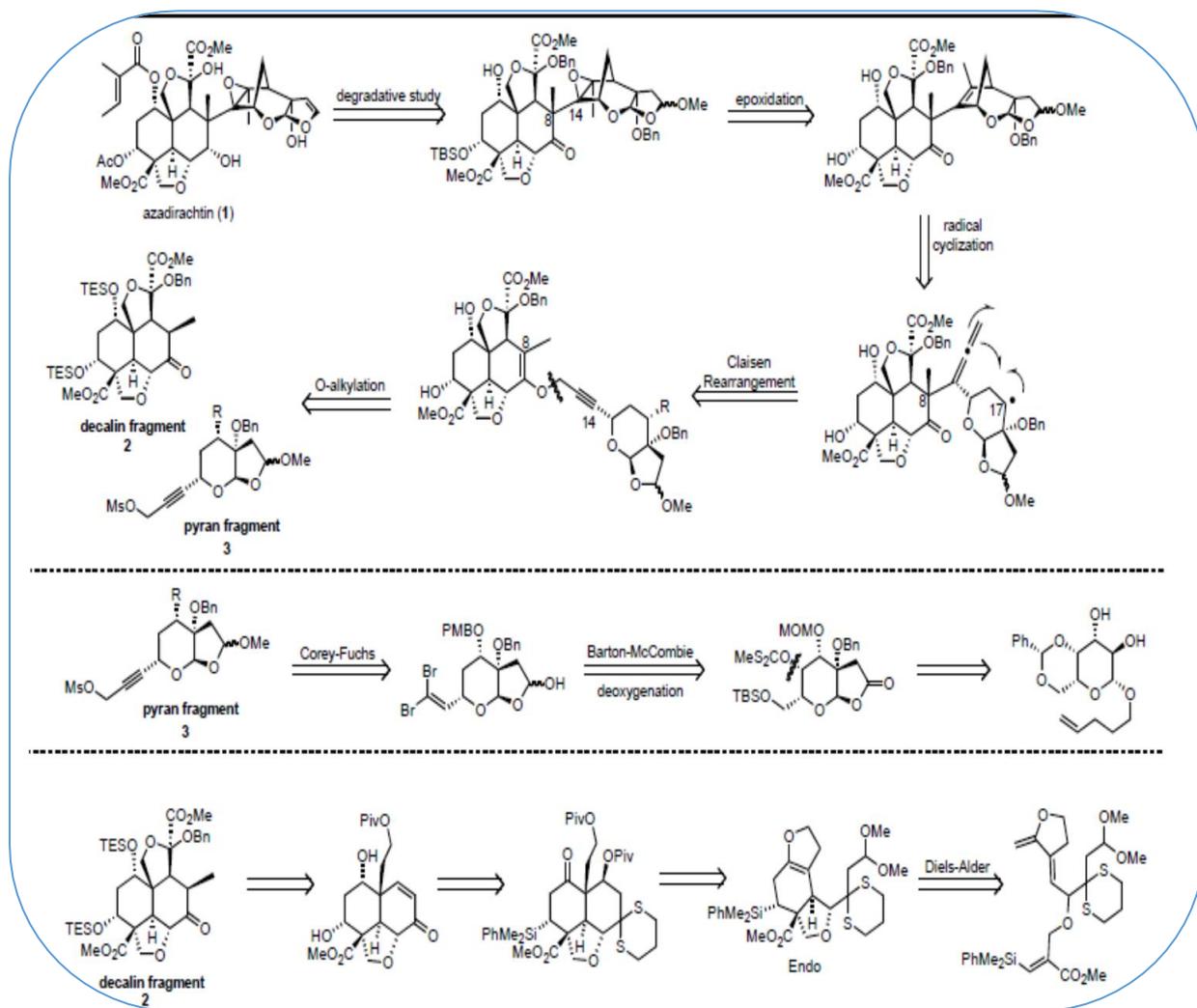


Figure 17 : Présentation chimique de la molécule d'Azadirachtine-A.

Depuis la détermination de sa structure complète par Ley et al. en 1985 la synthèse organique l'Aza-A reste un challenge pour les chimistes du fait de la complexité de sa structure.

### II.2.5.1.1.) Synthèse de Ley et al.<sup>78</sup>

Après 22 ans de travaux avec une équipe constituée de plus de 35 membres le groupe de *Ley et al.* a obtenu un rendement de synthèse de 0.00015%. La synthèse est faite en 71 étapes dont 48 séquences linéaires. Les principales réactions utilisées sont des Diels-Alder intramoléculaire, des réarrangements de Claisen intramoléculaire, et des cyclisations radicalaires intramoléculaires. Le schéma de rétro-synthèse proposé par cette équipe est donné dans la figure ci-dessous.



**Figure 18 :** rétro-synthèse des deux grands fragments (décaline et pyranne)

<sup>78</sup> White Group Literature Meeting (2007), The Azadirachtin Saga, *Angewandte Chemie International Edition* 46, 7629-7632.

### II.2.5.1.2.) Synthèse de Murai et al.<sup>78</sup>

Le schéma de synthèse est partie des deux grandes parties qui constituent la molécule d'Aza-A : le noyau décaline et le noyau pyranne. Le schéma de retro-synthèse est donné dans la figure ci-dessous.

Il a fallu 20 étapes pour la synthèse de la décaline dont une réduction, trois oxydations, neuf protections déprotections, une inversion avec un rendement de 4,6%. Le noyau pyranne est synthétisé en 21 étapes dont cinq réductions huit oxydations six protections déprotections avec un rendement de 25%.

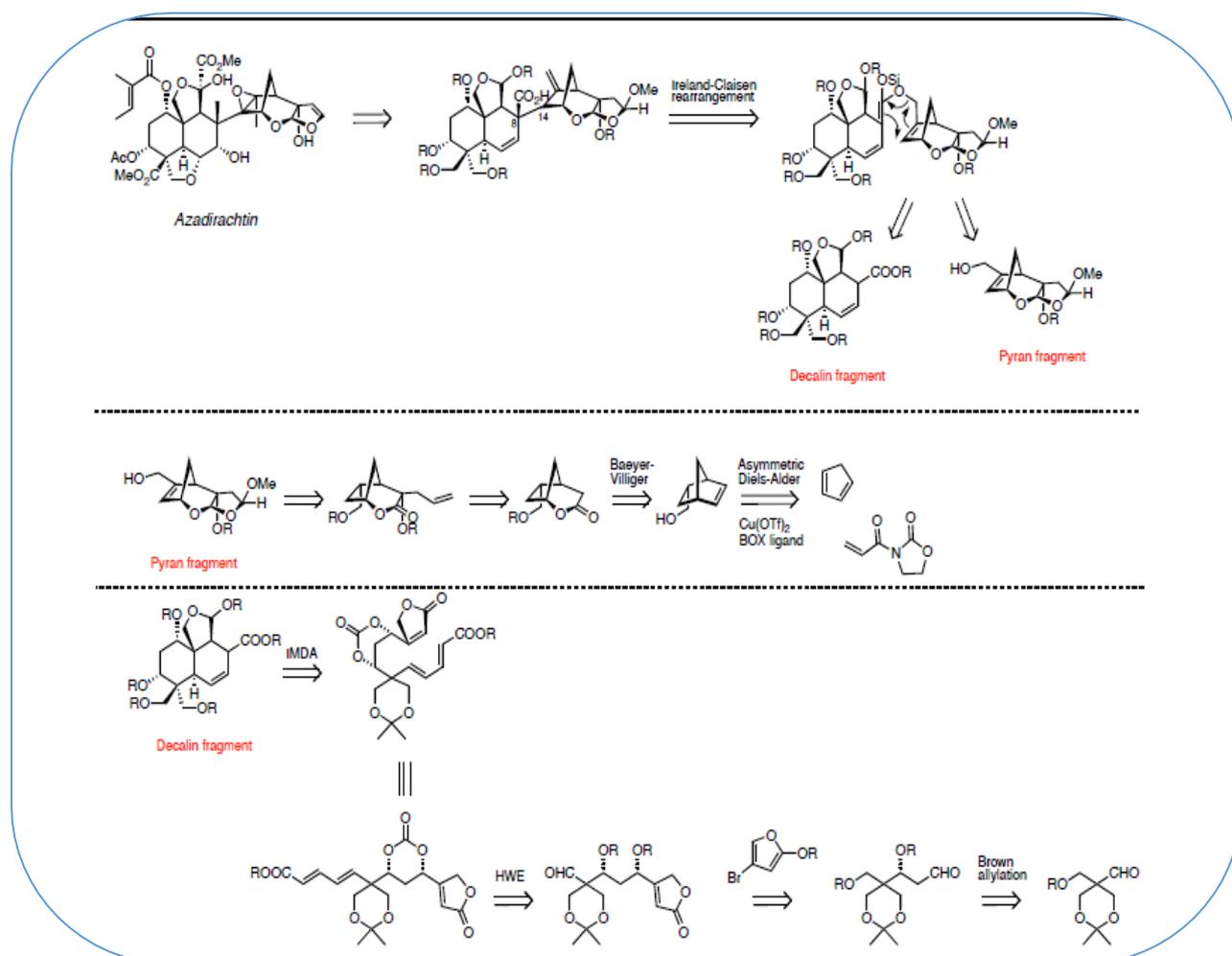
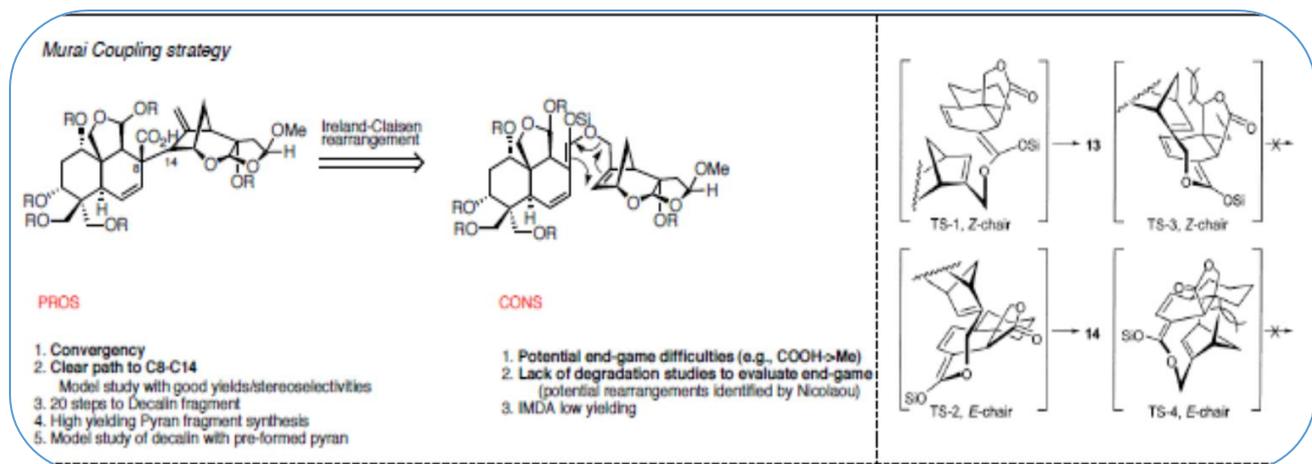


Figure 19 : rétro-synthèse des deux fragments (décaline et pyranne)



**Figure 20** : méthode de couplage des deux grands fragments (décaline et pyranne)

### **II.2.5.2.) Procédés d'extractions de l'azadirachtine à l'échelle du laboratoire et semi industrielle**

Pour obtenir l'azadirachtine technique (sous la forme de poudre) beaucoup de procédés d'extractions ont été mis au point à travers le monde surtout dans le sous-continent indien. Notre pays le Sénégal depuis un bon nombre d'années, à travers la Senchim, dépense des millions de nos francs dans l'achat en Inde de la poudre d'azadirachtine technique. Car jusque là, aucun procédé d'obtention de la poudre technique n'a été mis au point au Sénégal malgré les recherches intenses effectuées en ce sens.

Cependant cette étude n'a pas pour objet de décrire tous les procédés qui ont été mis sur pied. Seulement un rappel de quelques procédés trouvés dans la littérature nécessite d'être mentionné dans ce manuscrit. Et cela pour montrer l'originalité de notre procédé d'extraction et sa compétitivité par rapport aux autres procédés trouvés ailleurs. Nous passerons en revue ceux que nous jugeons essentiels pour illustrer nos résultats.

#### ***II.2.5.2.1.) Extraction de l'Azadirachtine des graines de Neem selon la méthode Yamasaki et al<sup>79</sup>.***

L'extraction portait sur 1Kg de graines. Tout d'abord, elles ont été extraites dans 2 l de n-hexane ; l'extraction a été répétée trois fois. Les phases organiques ont été regroupées et concentrées sous vide ; 181 g d'un solide de couleur orange ont été obtenu. Le tourteau délipidé a été extrait à son tour à trois reprises par 2 l de méthanol. Les extraits méthanoliques regroupés et concentrés sous-vide ont donné 78 g d'une tarte orange. Cette tarte orange est à nouveau dissoute dans 2 L de méthanol puis dilué petit à petit par 2 l d'eau distillée. Le mélange méthanol aqueux est d'abord extrait trois fois à volume égal avec du n-hexane puis avec du dichlorométhane à trois reprises à volume égal. L'évaporation sous vide des phases hexanique, méthanol aqueux, et de dichlorométhane a donné respectivement 11.4 g d'une huile jaune-marron, 44.6 g d'une tarte de couleur marron et 18.2 g d'un solide amorphe de couleur orange.

Avec cette méthode pour aboutir à la poudre d'azadirachtine il a fallu quatre séries d'extractions ce que nous jugeons assez long. Pour cette étude, nous faisons économie d'une étape. Et sans faire usage d'un solvant chloré qui sont très toxiques.

#### ***II.2.5.2.2.) Extraction de l'Azadirachtine des graines de Neem selon la méthode Sharma et al<sup>80</sup>***

Ils sont partis de 500 g de graines de neem qui sont extraites tout d'abord à quatre reprises avec 500 mL de n-hexane (4x500 mL) pour extraire l'huile. Le tourteau délipidé est ensuite repris quatre fois dans 500 mL de méthanol (4x500 mL). Les extraits méthanoliques sont ensuite combinés et concentrés au quart (1/4) du volume initial. Le concentrât est à son tour extrait avec 250 mL de n-hexane puis avec 250 mL 95% de méthanol aqueux pour extraire les traces d'huiles et les composés apolaires. L'extrait méthanolique après concentration sous

---

<sup>79</sup> Yamasaki R. B., Klocke J. A., Lee S. M., Stone G. A., Darlington M. V., (1986) Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, **356**, 220-226.

<sup>80</sup> Sharma V., Walia S., Kumar J., Nair M. G., Parmar B. S., (2003) An efficient method for the purification and characterization of nematocidal azadirachtins A, B, and H using MPLC and ESIMS, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3966-3972.

vide a été extrait avec 250 mL d'eau puis 250 mL d'acétate d'éthyl. La phase organique a été traitée avec 5 g de charbon actif, filtré et concentré sous vide pour obtenir un concentrât visqueux de 6 g. Le concentrât est puis solubilisé dans 10 mL d'acétate d'éthyl et précipité avec un excès d'hexane pour obtenir 5 g d'une poudre contenant 20 % en Azadirachtine A. La reprise de la précipitation a donné 2.6 g de produit avec une teneur en Azadirachtine A de 60 %.

La méthode *Sharma et al*, bien qu'ayant donné une bonne teneur en Azadirachtine A dans la poudre finale, reste assez longue avec 9 étapes. Ce qui rend son applicabilité à l'échelle industrielle pas évidente.

#### ***II.2.5.2.3.) Extraction de l'Azadirachtine des graines de Neem selon la méthode Dai et al<sup>81</sup>***

L'extraction est partie de 2 g d'amandes de graines de neem. La délipidation est effectuée par agitation pendant 12h dans 60 mL d'éther de pétrole. Le tourteau délipidé est ensuite extrait par agitation trois fois dans 20 mL de méthanol (3 x 20 mL) pendant 12h. Les extraits méthanoliques sont regroupés et évaporés sous vide. Le concentrât est de nouveau solubilisé dans un mélange de 20 mL MeOH / H<sub>2</sub>O (1 :1 v/v). Une solution (1.0 mL) 5 % de chlorure de sodium (NaCl) est additionnée au mélange. Pour extraire tous les composés apolaires du mélange ce dernier est extrait à nouveau six fois dans 20 mL d'éther de pétrole (6 x 20 mL). La phase aqueuse est reprise trois dans 20 mL de dichlorométhane (3 x 20 mL). Les phases chlororées sont regroupées, séchées au Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avant d'être évaporées sous vide. Un solide fin de couleur jaune est obtenu à l'issu de l'évaporation.

---

<sup>81</sup> Dai J., Yaylayan V. A., Raghavan G. S. V., Paré J. R., Liu Z., (2001) multivariate calibration for the determination of total Azadirachtin-Related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1169-1174.

## II.2.6.) Mode d'action de l'Azadirachtine-A

Les C-*seco*-limonoïdes sont considérés comme la classe des limonoïdes qui possède la plus forte activité insecticide.<sup>46</sup> Non seulement ces substances ont une bioactivité perturbant plusieurs aspects physiologiques des insectes, mais elles agissent sur plus de 300 espèces d'insectes appartenant à 15 familles différentes.<sup>82</sup> Les C-*seco*-limonoïdes, et notamment l'azadirachtine, possèdent trois modes d'action spécifiques contre les insectes. Tout d'abord, l'azadirachtine, dont la structure moléculaire est proche des ecdysones, hormones de mue chez l'insecte, inhibe la libération des ecdysones de la glande prothoracique. L'azadirachtine ne diminue pas seulement la vitesse de la formation de l'ecdysone, mais aussi celle de son métabolisme<sup>83</sup>, perturbant notamment l'activité de l'ecdysone 20-monooxygénase, stéroïde responsable de la conversion de l'ecdysone en 20-hydroxecdysone (voir structures sur la figure 21).<sup>84</sup> Ceci entraîne une réduction de la croissance des larves d'insecte caractérisée par une mue anormale ou retardée. De plus, l'azadirachtine retarde ou réduit le taux d'hormone juvénile du *Corpora allata*, ce qui cause de subtils changements dans la structure de la selle des larves d'insectes.<sup>85</sup> Les téguments sont alors rigides, en raison d'un taux anormalement bas de chitine dans les cellules. Ainsi, lors de la mue larvaire ou de la métamorphose, l'insecte ne parvient pas à déchirer facilement ses exuvies et peut mourir étouffé ou étranglé ou sortir handicapé. La perturbation du niveau d'hormone juvénile et de la production d'ecdystéroïde entraîne chez les adultes, une réduction de sa longévité et de sa fécondité.<sup>83</sup>

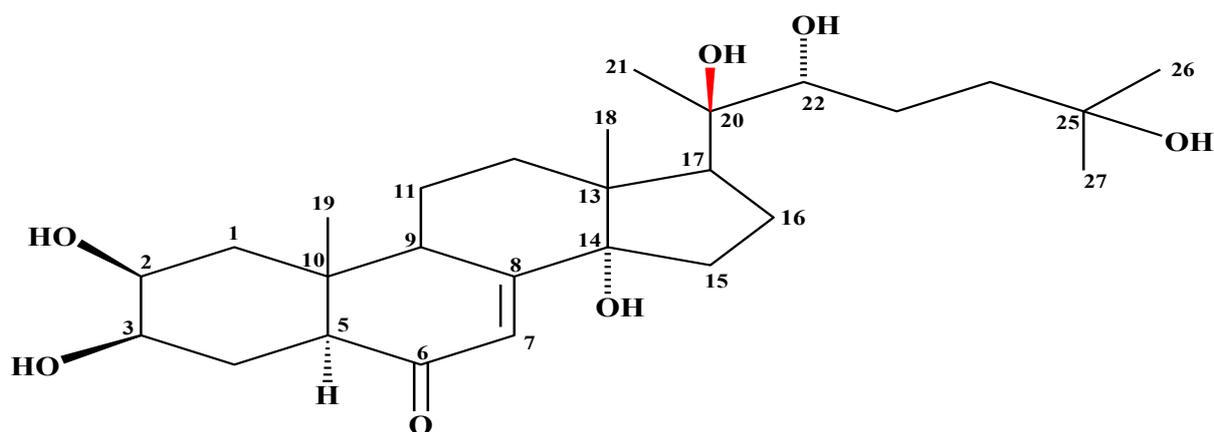
---

<sup>82</sup> Philogène .R ; Regnault-Roger C. ; Vincent C. **2002**. Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétales : promesses d'hier et d'aujourd'hui. *Dans Biopesticides*.

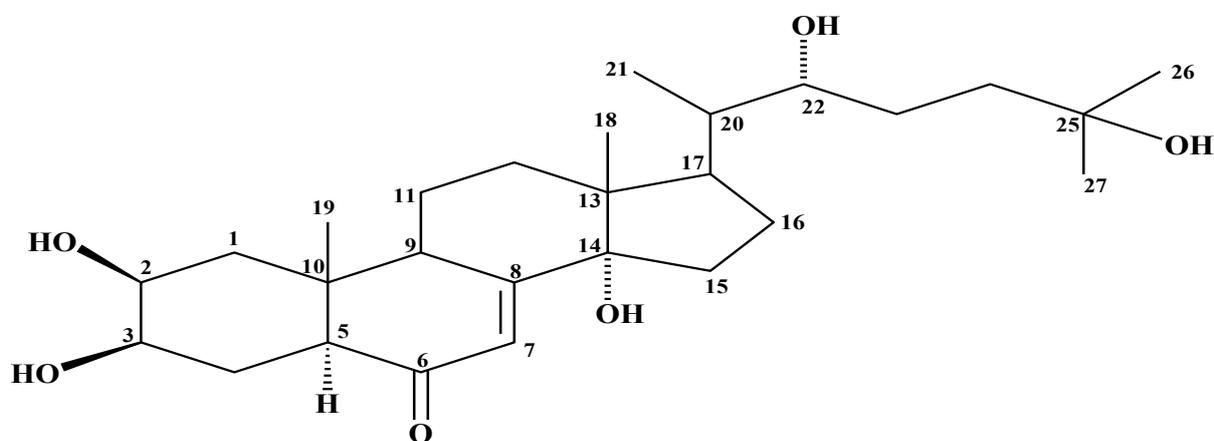
<sup>83</sup> Bidmon H.J., Käuser G., Möbius P., et Koolman J., **1987**. Effects of azadirachtin on blowfly larvae and pupae. Dans Natural pesticide from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. *Compte rendu*, 3e conference international sur le Nem, Nairobi, Kenya, 10-15 juillet **1986**. *Sous la direction* de H. Schmutterer et .R.S. Ascher. P 253-271.

<sup>84</sup> Mitchell M.J., Smith .L., Johnson S., et Morgan E.D., Effects of neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-Desecetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity. *Archives of insect Biochemistry and Physiology*, **1997**, 35: 199-209.

<sup>85</sup> Mordue (Luntz) A.J. Present concepts of the mode of action of azadiracchitin from nee. Dans *Neem: Today and in the new millenniul*. Sous la direction d'O. Koul et S. Wahab. Kluwer Academic Publishers; Netherlands; **2004**, P 229-242.



**20-hydroxyecdysone (C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>7</sub>)**



**ecdysone (C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>)**

**Figure 21** : structures de l'ecdysone et de la 20-hydroxyecdysone

Ensuite, l'azadirachtine stimule dans les chimiorécepteurs des cellules spécifiques qui agissent comme des agents de dissuasion et bloque l'arrivée des phagostimulants dans les cellules réceptrices, ce qui provoque chez l'insecte une réduction marquée de sa consommation.<sup>86</sup>

Enfin, ce limonoïde a des effets nuisibles directs sur la plupart des tissus de l'insecte, notamment sur les muscles, l'abdomen, et les cellules épithéliales des intestins.<sup>43</sup> Cependant, il faut noter que les autres C-*seco*-limonoïdes du Neem ont les mêmes modes d'action que l'azadirachtine.

<sup>86</sup> Aerts R. J., et ordue (Lunzt), A.J. ; Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids; *J. hem.Ecol.*, **1997**, 23: 2117-2132.

## II.2.7.) Relation structure - activité

Afin de confirmer le mécanisme d'action mais aussi de moduler l'activité de l'azadirachtine dans le cadre d'une utilisation comme bio-pesticide, des études de relation structure-activité ont été réalisées sur la molécule d'azadirachtine et 23 autres composés similaires par *Simmonds et al 1990*.<sup>87</sup>

Dans le but d'évaluer l'importance de chaque fragment de la molécule envers l'activité biologique, l'équipe de Simmonds a synthétisé une famille d'analogues de la molécule d'azadirachtine A (Aza A). Les tests ont été effectués sur les *larves lepidopterous*. Cette étude a révélé que le dihydroazadirachtine (composé 1) possède la plus grande activité insecticide suivie de l'azadirachtine (voir **Figure 22**).

Le cycle dihydrogénofurane est présent dans la plupart des composés isolés des graines de neem ; avec l'azadirachtine son hydrogénation (double liaison C-22,23) confère à la molécule une grande stabilité sans pour autant affecter l'activité insecticide de la molécule. En modifiant le substituant en C-1 du composé hydrogéné, comme les composés 2 et 3 (voir **Figure 22**), on note aucun changement sur l'activité comparé à la molécule simplement hydrogénée en C-22,23.<sup>88</sup>

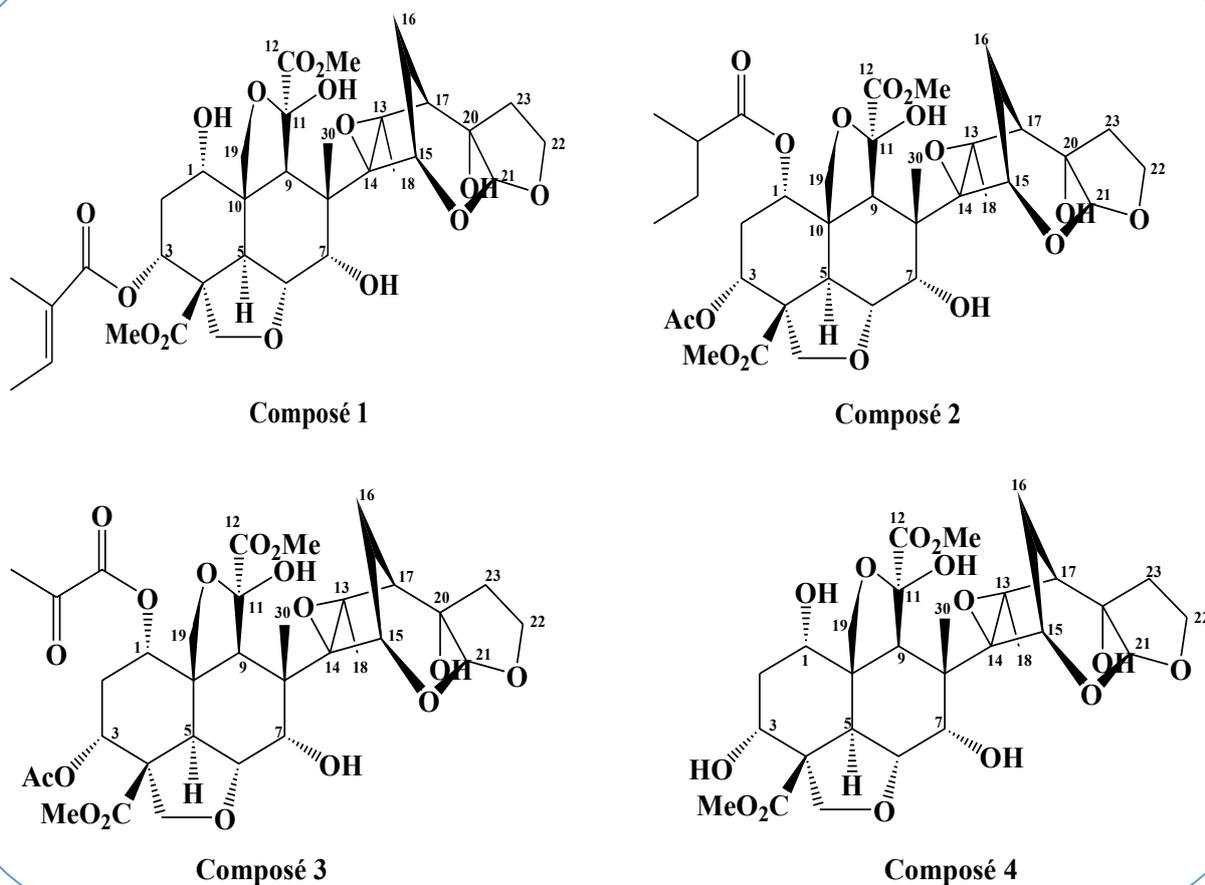
Si la mortalité causée par l'azadirachtine est dûe à son habilité d'interférer avec le contrôle neuroendocrine de la métamorphose, en agissant sur l'activité hormonal de l'ecdysone (**Figure 21**), alors leur similarité structurale (aza et ecdysone) pourrait être un facteur important dans ce processus. Selon *Rembol et al.*<sup>89</sup> les hydroxyls libres, des carbones C-1 et C-3 du composé 4 augmentent l'activité de la molécule. Toujours cette équipe a trouvé que sur l'*Epilachna varivestis*, l'activité d'inhibition de croissance de la molécule d'azadirachtine pourrait être augmentée en passant du dihydrofurane au tétrahydrofurane (par hydrogénation de la double liaison C-22,23).

---

<sup>87</sup> Simmonds, M. S. J. ; Blaney, W. M.; Ley S. V.; Anderson, J. C.; Toogood, P. L. *Entomol.exp.appl.* **1990**, 55, 169-181.

<sup>88</sup> Butterworth J. H, Morgan E. D; **1968**, Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, 23-24.

<sup>89</sup> Rembold H., Arnason J. T., Philogene B. J. R., & Morsand *ACS Symposium series, New York: 1989*, 387, 150-163



**Figure 22:** Différents analogues de la molécule d'azadirachtine.

### II.2.8.) Etude de la stabilité de la molécule d'Azadirachtine-A

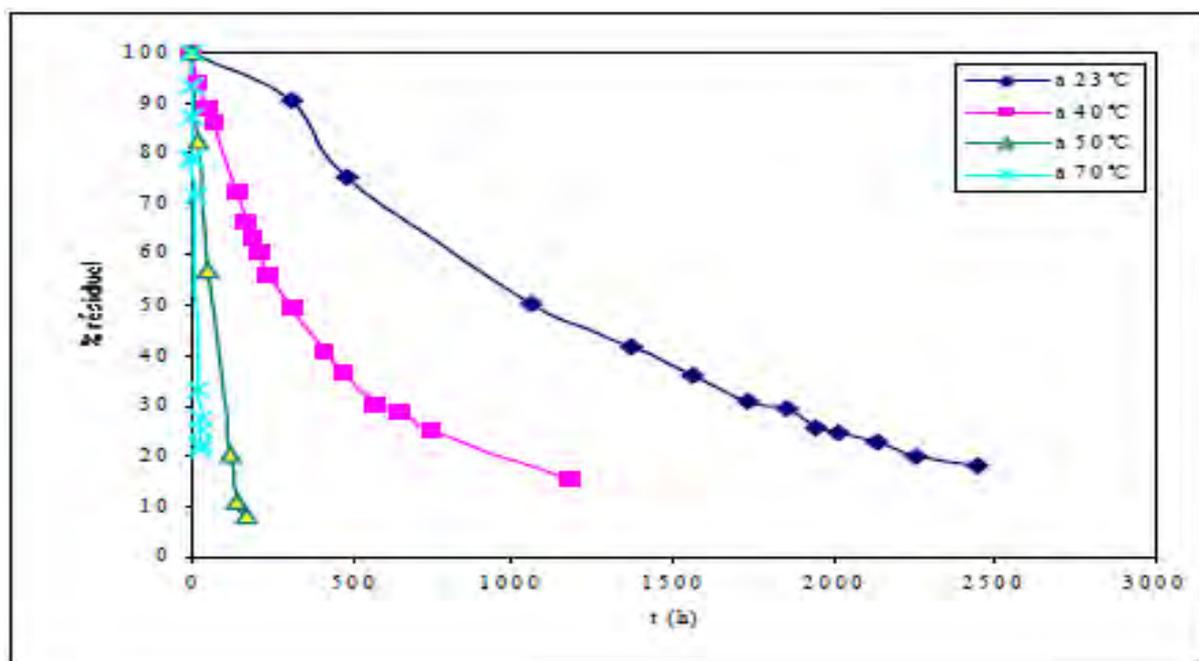
La maîtrise des conditions de stabilité de l'azadirachtine pourrait bien jouer un rôle déterminant dans la mise au point de méthodes d'extraction, de séparation et de formulation d'insecticides à base d'azadirachtine. Selon *Thejavathi et al 1995*, l'azadirachtine serait assez stable dans les solvants organiques à savoir : chloroforme, méthanol, éthanol, acétone, acétate d'éthyle.<sup>90</sup>

Les résultats des travaux de *Jarvis et al*<sup>91</sup> ont montré que l'azadirachtine est assez stable en solution de pH compris entre 4 et 6 et à température ambiante. Cependant, il est instable en

<sup>90</sup> Thejavathi R. ; Yakundi S. R. ; Ravindranath B. *Journal of Chromatography A*. **1995**, 70, 374-379.

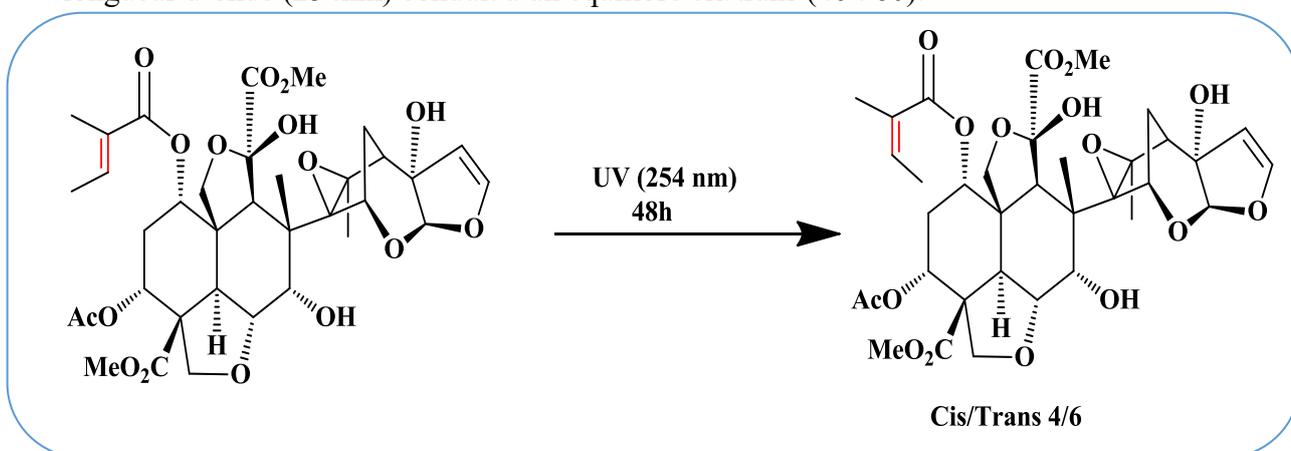
<sup>91</sup> Jarvis A. P., Johnson S. & Morgan E. D. Stability of the Natural Insecticide Azadirachtin in Aqueous and Organic Solvents *Pestic. Sci.*, **1998**, 53, 217-222.





**Figure 23 :** Courbes de disparition de l'azadirachtine-A à pH = 6 en fonction de la température de chauffage.<sup>50</sup>

L'azadirachtine-A solide exposé aux rayons UV (254 nm) ne donne qu'une seule photo produit ; dont sa seule différence structurale avec la molécule d'azadirachtine-A réside sur la configuration de la double liaison du 2-méthylbut-2-énoate qui passe de sa configuration initiale E en Z.<sup>93</sup> Selon Dureja *et al* cette isomérisation se fait via un mécanisme radicalaire. Le temps de demi-réaction d'isomérisation de la double liaison de la conformation E en Z est de 48 min sous UV à 254 nm. Une irradiation continue de la molécule sous cette même longueur d'onde (254nm) conduit à un équilibre cis/trans (40 : 60).<sup>92</sup>



<sup>93</sup> Dureja P. and Johnson S.; *Division of Agricultural Chemicals, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi 110 012, India; Research Communications 2000.*

### ***II.2.9.) Ecotoxicologie du Neem***

L'azadirachtine technique 12 %, administré par voie orale aux rats males et femelles aux doses 500, 1000 and 1500 mg /Kg/jour pendant 90 jours, n'a produit aucun signe de toxicité, de mortalité, de modification du poids du tissu, de la pathologie, du sérum et des paramètres sanguins. A des doses élevées, l'azadirachtine est bien toléré par les rats (males et femelles). Selon *Raizada et al.*<sup>94</sup> la dose de 1,500 mg / kg peut être utilisée en tant que dose de base pour la détermination de la dose sans effet observé. A l'état pur la dose de sécurité de l'azadirachtine est estimée à 15 mg/Kg bw/jour.

**Tableau 8 : résultats des tests d'ecotoxicologie du Neem**

Groupe	Traitement (mg / Kg pds corps)	Nombre de rats	Nombre de rats morts
I	Huile	10	0
II	Az 500	10	0
III	Az 1000	10	0
IV	Az 1500	10	0
V	Huile	10	0
VI	Az 500	10	0
VII	Az 1000	10	0
VIII	Az 1500	10	0

<sup>94</sup> Raizada R.B., Srivastava M.K., Kaushal R.A., Singh R.P.; Azadirachtin, a neem biopesticide suchronic toxicity assessment in rats, *Food and Chemical Toxicology* 39 (2001) 477-483.

## II.2.10.) Propriétés médicinales du neem

### II.2.10.1.) Composés de Neem comme agents potentiels pour la prévention du cancer et le traitement

Depuis de siècle les extraits du neem sont utilisés dans la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies du cancer. Les extraits de graines, feuilles, et fleurs de neem ont toujours montré des effets chimio préventive et anti tumorales dans différents types de cancers. Parmi les composants les plus bioactifs l'Azadirachtine et le nimbolide sont les plus étudiés<sup>95</sup>.

#### II.2.10.1.1.) Les composants de Neem inhibent la prolifération des cellules du cancer

La croissance des cellules cancéreuses et la prolifération incontrôlées sont l'une des caractéristiques fondamentales du cancer et jouent un rôle important dans le développement de la tumeur et les métastases du cancer<sup>96,97</sup>. Par conséquent, l'inhibition de la croissance des cellules tumorales est une caractéristique commune à de nombreux agents chimio-préventifs et thérapeutiques.

L'huile de graines de neem inhibe la croissance des cellules HeLa du cancer du col<sup>98</sup>, et l'extrait de feuilles montre des effets inhibiteurs de la prolifération dans les cellules cancéreuses de la prostate<sup>99,100</sup>.

---

<sup>95</sup> Hao F., Kumar S., Yadav N., Chandra D., Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1846, **2014**, 247–257.

<sup>96</sup> Hanahan D., Weinberg R.A., The hallmarks of cancer, *Cell* 100, **2000**, 57–70.

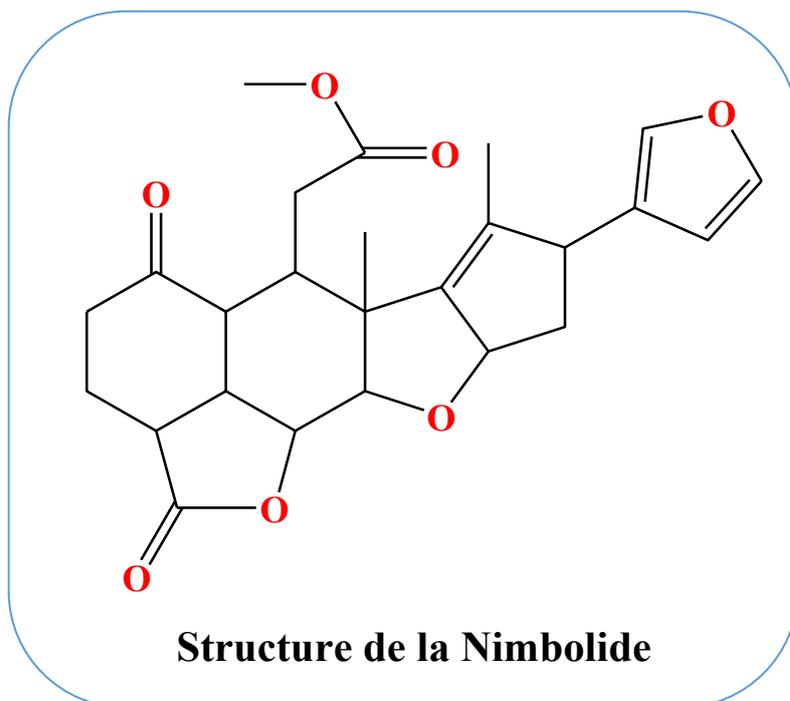
<sup>97</sup> Hanahan D., Weinberg R.A., Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144, **2011**, 646–674.

<sup>98</sup> Ricci F., Berardi V., Risuleo G., Differential cytotoxicity of MEX: a component of neem oil whose action is exerted at the cell membrane level, *Molecules* 14, **2008**, 122–132.

<sup>99</sup> Mahapatra S., Karnes R.J., Holmes M.W., Young C.Y., Cheville J.C., Kohli M., Klee E.W., Tindall D.J., Donkena K.V., Novel molecular targets of *Azadirachta indica* associated with inhibition of tumor growth in prostate cancer, *AAPS J.* 13, **2011**, 365–377.

<sup>100</sup> Gunadharini D.N., Elumalai P., Arunkumar R., Senthilkumar K., Arunakaran J., Induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells by ethanolic neem leaf extract, *J. Ethnopharmacol.* 134, **2011**, 644–650.

Par exemple, le traitement des cellules HeLa avec l'azadirachtine diminue les niveaux de cycline B et cycline D1, et induit l'expression de p21 CKI, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire G0 / G1<sup>101</sup>. L'Analyse de la distribution du cycle cellulaire dans des cellules de carcinome du côlon traitées avec la Nimbolide a révélé que ce composant actif du neem induit à l'arrêt G0 / G1 et G2 / M accompagné à la fois par des changements dans les cyclines CDK et CKI<sup>102,103</sup>.



Les extraits de neem suppriment la prolifération et la croissance des cellules tumorales en perturbant la progression du cycle cellulaire<sup>97</sup>.

---

<sup>101</sup> Priyadarsini R.V. , Murugan R.S. , Sripriya P. , Karunagaran D. , Nagini S. , The neem limonoids azadirachtin and nimbolide induce cell cycle arrest and mitochondriamediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells, *Free Radic. Res.* 44, **2010**, 624–634.

<sup>102</sup> Roy M.K. , Kobori M. , Takenaka M. , Nakahara K. , Shinmoto H. , Tsushida T. , Inhibition of colon cancer (HT - 29) cell proliferation by a triterpenoid isolated from *Azadirachta indica* is accompanied by cell cycle arrest and up-regulation of p21, *Planta Med.*, 72 , **2006**, 917–923.

<sup>103</sup> Babykutty S. , Priya P.S. , Nandini R.J. , Kumar M.A.S. , Nair M.S. , Srinivas P. , Gopala S. , Nimbolide retards tumor cell migration, invasion, and angiogenesis by downregulating MMP- 2/9 expression via inhibiting ERK1/2 and reducing DNA-binding activity of NF-kappaB in colon cancer cells, *Mol. Carcinog.*, 51, **2012**, 475–490.

### II.2.10.1.2.) Les effets des composants du neem sur la mort des cellules cancéreuses

Des extraits de graines et de feuilles de neem induisent l'apoptose dans différents types de cellules cancéreuses telles que la *leucémie*<sup>104,105</sup>, de la prostate<sup>106,107</sup>, du col<sup>95</sup>, du colon<sup>101</sup>, de l'estomac<sup>108</sup> et de la poitrine<sup>109</sup>. Ces résultats suggèrent un effet pro-apoptotique des extraits de neem sur un large éventail de types de cellules cancéreuses. De même, l'administration des composants individuels du neem induit également la mort des cellules cancéreuses. Par exemple, nimbolide induit une apoptose dans un cancer du sein<sup>103</sup>, le cancer de la prostate<sup>110</sup>, un hépatocarcinome<sup>111</sup>, le cancer du col<sup>95</sup>, le choriocarcinome<sup>105</sup>, le cancer du côlon<sup>97</sup>, le lymphome, la leucémie, et le mélanome<sup>96</sup>. Azadirachtine montre le même effet dans les cellules de cancer du col utérin<sup>95</sup>. Un nombre croissant de limonoïdes moins caractérisés qui ont récemment été isolés à partir de différentes parties de neem a également

---

<sup>104</sup> Kikuchi T. , Ishii K. , Noto T. , Takahashi A. , Tabata K. , Suzuki T. , Akihisa T. , Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* (neem), *J. Nat. Prod.* 74, **2011**, 866.

<sup>105</sup> Chitta K.S. , Khan A.N. , Ersing N. , Swaika A. , Masood A. , Paulus A. , Qadeer A. , Advani P. , Sher T. , Miller K.C. , Lee K. , Chanan-Khan A.A. , Neem leaf extract induces cell death by apoptosis and autophagy in B-chronic lymphocytic leukemia cells, *Leuk. Lymphoma* 55, **2014**, 652–661.

<sup>106</sup> Kumar S. , Suresh P.K. , Vijayababu M.R. , Arunkumar A. , Arunakaran J. , Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3), *J. Ethnopharmacol.* 105, **2006**, 246–250.

<sup>107</sup> Srivastava P. , Yadav N. , Lella R. , Schneider A., Jones A. , Marlowe T. , Lovett G. , O'Loughlin K. , Minderman H. , Gogada R. , Chandra D. , Neem oil limonoids induces p53-independent apoptosis and autophagy, *Carcinogenesis* 33, **2012**, 2199–2207.

<sup>108</sup> Manosroi A. , Kitdamrongtham W. , Ishii K. , Shinozaki T. , Tachi Y. , Takagi M. , Ebina K. , Zhang J. , Manosroi J. , Akihisa R. , Akihisa T. , Limonoids from *Azadirachta indica* var. *siamensis* extracts and their cytotoxic and melanogenesis-inhibitory activities, *Chem. Biodivers.* 11, **2014**, 505–531.

<sup>109</sup> Elumalai P. , Gunadharini D.N. , Senthilkumar K. , Banudevi S. , Arunkumar R. , Benson C.S. , Sharmila G. , Arunakaran J. , Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway, *Toxicol. Lett.* 215, **2012**, 131–142.

<sup>110</sup> Raja Singh P. , Arunkumar R. , Sivakamasundari V. , Sharmila G. , Elumalai P. , Suganthapriya E. , Brindha Mercy A. , Senthilkumar K. , Arunakaran J. , Anti-proliferative and apoptosis inducing effect of nimbolide by altering molecules involved in apoptosis and IGF signalling via PI3K/Akt in prostate cancer (PC-3) cell line, *Cell Biochem. Funct.* 32, **2014**, 217–228.

<sup>111</sup> Harish Kumar G. , Chandra Mohan K.V. , Jagannadha Rao A. , Nagini S. , Nimbolide a limonoid from *Azadirachta indica* inhibits proliferation and induces apoptosis of human choriocarcinoma (BeWo) cells, *Investig. New Drugs* 27, **2009**, 246–252.

présenté des effets pro-apoptotiques dans les cellules cancéreuses de leucémie et de l'estomac<sup>102</sup>. En accord avec les effets anti-prolifératifs de neem, ses potentiels proapoptotiques ne sont pas affectés par l'état hormono-dépendant dans le cancer de la prostate<sup>94</sup> et des cellules de cancer du sein<sup>103</sup>.

Les limonoids de l'huile de Neem favorisent la libération mitochondriale des facteurs induisant l'apoptose en plus du cytochrome c, et donc, induit également la mort cellulaire caspase-indépendante dans les cellules cancéreuses de la prostate<sup>103</sup>. L'autophagie est une autre forme de mort cellulaire programmée qui joue un rôle important dans la croissance cellulaire normale<sup>112</sup>.

Dans l'exploration des effets induisant l'apoptose du neem, une étude publiée récemment montre que l'un des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC) a montré une régression de la maladie après administration orale d'extrait de feuilles de neem<sup>99</sup>. Pour étudier le mécanisme de l'efficacité clinique, les auteurs ont étudié les effets d'extraits de feuilles de neem sur les cellules CLL primaires de 41 patients. Une diminution des cellules leucémiques sous multiples formes de mort cellulaire, comme le clivage de la PARP et les caspases, l'inhibition de Bcl-2 et l'expression de p53, la perte de la mitochondrie de la perméabilité membranaire, ainsi que les niveaux accrus LC3-II<sup>99</sup>.

Outre l'inhibition de prolifération des cellules cancéreuses, les composants du neem exercent des effets anticancéreux par induction de l'apoptose, ainsi que d'autres formes de mort cellulaire, y compris l'autophagie.

Les effets clés anti-cancéreux des composants du neem sur les cellules malignes sont : l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'induction de la mort cellulaire, la suppression de l'angiogenèse du cancer, la restauration de l'équilibre oxydo/réduction cellulaire (redox) et l'amélioration de la réponse immunitaire de l'hôte contre les cellules tumorales<sup>94</sup>.

---

<sup>112</sup> Gozuacik D. , Kimchi A. , Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, *Oncogene* 23, **2004**, 2891–2906.

### II.2.10.1.3.) Synthèse de nanoparticules d'argent antibactériens en utilisant une solution aqueuse de gomme de neem (*Azadirachta indica*)

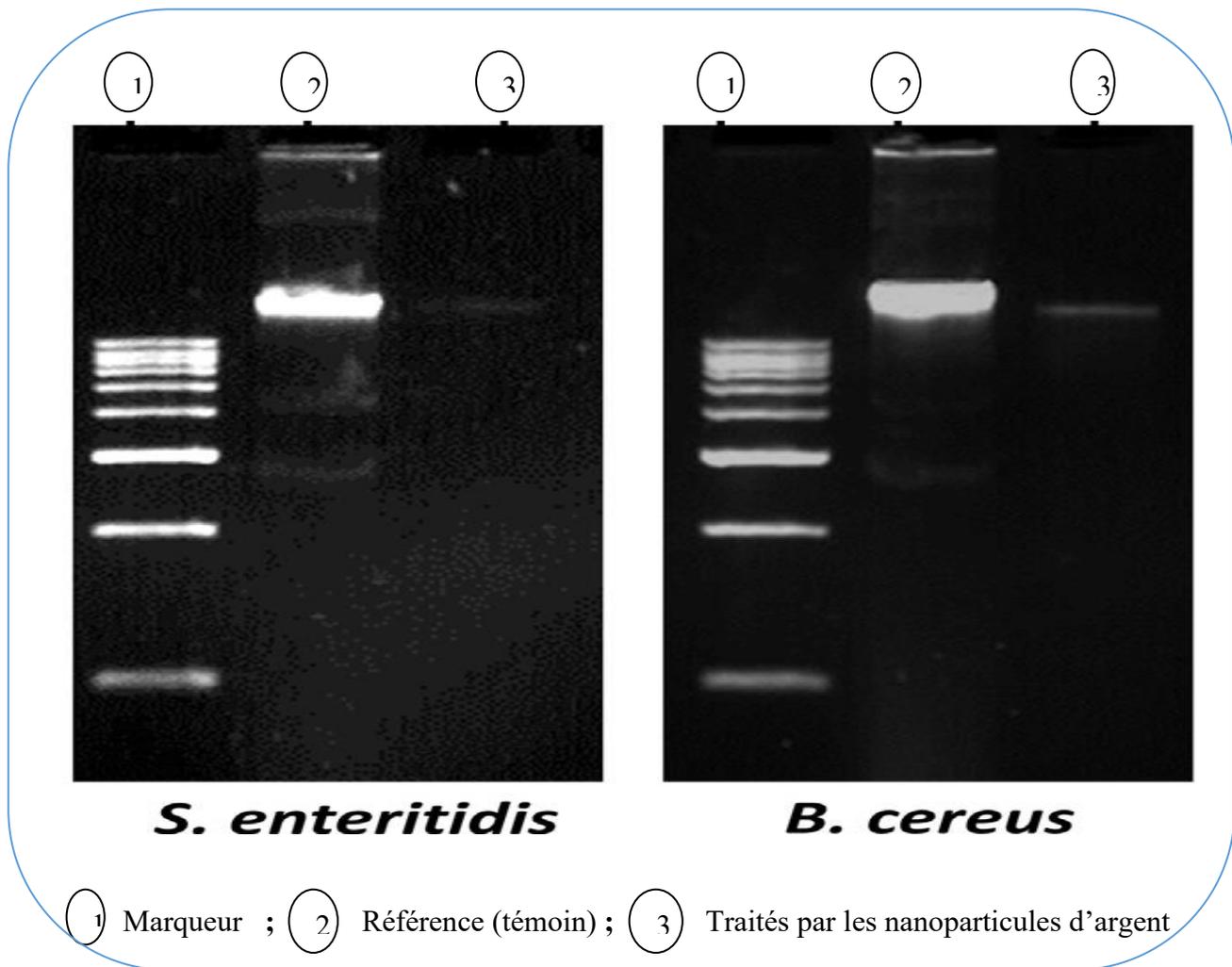
Une méthode simple pour la synthèse de nanoparticules d'argent en utilisant de la gomme de neem (*Azadirachta indica*) a été étudiée en 2014 pour la première fois par Velusamy et al<sup>113</sup>.

Le mélange dans un autoclave à 121 ° C d'une solution de nitrate d'argent et d'un extrait de gomme donne des nanoparticules d'argent après réduction du nitrate. Le spectre d'absorption UV-vis du mélange réactionnel biologiquement réduit, a montré le pic des plasmons de surface à 418 nm : pic caractéristique des nanoparticules d'argent.

L'interaction entre les biomolécules fonctionnelles présentes dans l'extrait de la gomme et les nanoparticules ont été identifiées par la transformée de Fourier spectroscopie infrarouge (FTIR). Le diamètre moyen des nanoparticules synthétisées a été trouvé < 30 nm, telle qu'il est révélé en analyse par microscopie électronique à transmission (MET) et microscopie à force atomique (AFM). L'analyse par diffraction des rayons X (XRD) a confirmé la structure cristalline cubique à faces centrées d'argent métallique. Les nanoparticules d'argent synthétisés présentent une activité antibactérienne contre des isolats cliniques de *Salmonella enteritidis* et de *Bacillus cereus*. En outre, l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent a été confirmée par la dégradation de l'ADN bactérien d'essai.

---

<sup>113</sup> Velusamy P., Das J., Pachaiappan R., Vaseeharan B., Pandian K., Greener approach for synthesis of antibacterial silver nano particles using aqueous solution of neem gum (*Azadirachta indica* L.), *Industrial Crops and Products*, 66, 2015, 103–109.



**Figure 24 :** L'analyse des lésions de l'ADN bactérien provoqué par les nanoparticules d'argent en utilisant une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.

#### II.2.10.1.4.) L'utilisation de l'huile de neem en cosmétique

L'huile de neem ne sèche pas et résiste mieux à la dégradation que la plupart des huiles végétales. Purifiée, elle est utilisée pour la préparation de produits cosmétiques (savon, shampooing, baumes et crèmes) et de nombreux produits de santé bucco-dentaire. Elle est également utilisée dans le vernis à ongles.

#### II.2.11.) Utilisation du tourteau de neem dans l'alimentation du bétail

Au cours des deux ou trois dernières décennies, la demande mondiale croissante en protéines supplémentaires pour l'alimentation de la population et du bétail a encouragé les études et l'exploitation de divers produits comestibles riches en protéines.

Cependant l'industrie de l'élevage accorde un intérêt significatif à l'utilisation des arbres et arbustes fourragers comme source de protéines et d'autres nutriments pour les non-ruminants dont les poulets, les chevaux entre autre.

Pour améliorer la productivité des animaux, un approvisionnement régulier d'alimentation à faibles coûts est essentiel<sup>114</sup>. Pour une production durable, il devient donc très impératif d'intensifier les efforts dans la recherche des alternatives moins chères, abondantes et disponibles localement qui a une valeur alimentaire peu ou pas à l'homme<sup>115</sup>.

Le tourteau de neem obtenu après délipidation est une ressource alternative potentielle ; selon ces auteurs le neem serait la seule espèce du genre *azadirachta* apte à être utilisé. Le tourteau de graines de Neem contenait 3,56% d'azote, 0,83% de phosphore et 0,77% de calcium. La protéine dans le gâteau est relativement équilibrée dans ses profils d'acides aminés et de minéraux. Cependant, l'utilisation du tourteau de neem comme aliment a suscité une certaine réticence en raison de la présence de triterpénoïdes amers et toxiques, principalement nimbin, nimbidin, azadirachtine et salanin<sup>116</sup>. Il a également été signalé que l'alimentation de ces ingrédients pourrait conférer un goût ou une odeur désagréable sur la viande<sup>117</sup>

Pour une utilisation sans risque de contamination de la viande du bétail une étude de détoxification a été faite pour réduire l'amertume du tourteau. Les techniques de l'extraction aux solvants organiques, lavage avec l'eau, le trempage alcalin entre autres ont été utilisées pour la détoxification du tourteau<sup>118,119,120</sup>.

---

<sup>114</sup> Sonaiya, E.B., The context and prospects for development of smallholder rural poultry production in Africa. Proc. Technical center for rural Agriculture and rural cooperation CTA. Sem. smallholder rural poultry production, *Vol. 1. Thessaloniki, Greece, 1990*, pp: 35-52.

<sup>115</sup> Odunsi, A.A., T.O. Akande, A.S. Yusuph and R.I. Salami, Comparative utilization of high inclusion rates of four agro-industrial by products in the diet of egg type chickens. *Arch. Zootec.*, **2002**, 51: 465-468.

<sup>116</sup> Paul, B.N., N. Haque and A.K. Garg, Effect of feeding neem seed kernel cake (*Azadirachta indica*) on rumen enzyme of buffalo. *Ind. Vet. J.*, **1996**, 73: 720-728.

<sup>117</sup> Clausen, S.L.M., A. Larsen Ploger and H. Sorensen, . Advances in the production and utilization of cruciferous crops. Junk publications, Netherlands, **1985**.

<sup>118</sup> Gowda, S.K., Sastry V.R. , Katiyar R.C. Study on the utilization of neem kernel on protein supplements for growing rabbits. *Indian Vet. J.*, **1998**, 75: 281-282.

<sup>119</sup> Uko, O.J., Kamalu T.N. Protein quality and toxicity of full-fat neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernel. *Arch. Zootechnol.*, **2006**, 55: 51-62.

<sup>120</sup> Bawa, G.S., Orunmuyi M., Agbaji A.S., Ladan Z., Okekeifi U.O. Effect of different methods of processing neem (*Azadirachta indica*) seed on the performance of young rabbits. *Pak. J. Nutr.*, **2007**, 6: 212 - 216.

### II.2.11.1.) Le tourteau de neem aliment de poulet

L'étude se port sur deux lot de tourteau de graines de neem : le **lot 1** ses graines ont été lavées à l'eau avant d'extraire l'huile (GLE : Graines Lavées à l'Eau), le **lot 2** ses graines ont été extraites directement (GNLE : Graines Non Lavées à l'Eau). Les constituants des tourteaux des deux lots sont donnés dans le tableau ci-dessous. Pour chaque lot deux régimes constitués de 10 % et 20 % de tourteau ont été préparés.

**Tableau 9** : composition des tourteaux des graines lavées et graines non lavées

Constituants (%)	Gaines lavées à l'eau	Graines non lavées
Matière sèche	89.74	89.26
Protéine brut	17.48	14.24
Fibre brut	19.59	17.26
Azote extrait	38.73	45.69
Energie brute (Kcal/Kg)	3148	3252

Après traitement les résultats donnés dans le tableau ci-dessous portants sur le gain en poids corporel et la prise alimentaire ont été trouvés.

**Tableau 10**: résultats portants sur le gain en poids corporel et la prise alimentaire

Paramètres	GLE (%)		GNLE (%)	
	10	20	10	20
Gain poids corporel (g/b/d)	7.66	7.35	7.03	6.83
Prise alimentaire (g)	44.8	42.5	42.6	41.4
Coût des aliments / Kg	40.6	40.2	40.4	40.0

Le résultat des caractéristiques de la carcasse et des organes (tableau ci-dessous) a montré qu'avec le régime de 20% GLE les parties arrière, pilons et les cuisses étaient

significativement plus grande comparé au traitement avec GNLE. La partie pectorale a notamment été plus faible dans avec les GNLE en particulier au niveau de 20 %. Les indices de qualité de carcasse, pour les coquelets nourris avec des aliments à base de tourteau de graines non lavées, ont enregistré des valeurs faibles dans presque tous les paramètres mesurés par rapport à celles sur les régimes de graines traités. Les parties de la cuisse, pilons, pectoral et arrière ont été particulièrement grand dans le groupe de traitement GLE, ce qui signifie que le trempage des graines améliore le pourcentage de dressage des coquerets expérimentaux et sera une meilleure technique de détoxification des graines de neem. Aucun des organes (poumon, rein, cœur, rate, foie, pro ventricule et gésier) a montré des différences significatives à travers les traitements. Tous les indices hématologiques mesurés dans cette étude (volume cellulaire, Hémoglobine et indices érythrocytes) sont similaires dans les traitements<sup>121</sup>.

Le tourteau des graines trempées renferme une teneur en protéine brut plus élevées. Selon *Nath et al*<sup>122</sup> le trempage des graines améliore la teneur en protéines brutes et la sapidité du gâteau. La légère baisse de la teneur en énergie brute obtenue avec les graines lavées est probablement due à la perte d'une partie soluble de la graine dans l'eau pendant le trempage. Il a été noté avec le tourteau des graines non lavées une odeur piquante qui a réduit la prise alimentaire et affecté la croissance<sup>123</sup>. L'odeur désagréable du soufre due à la présence de certains alcaloïdes dans la graine serait à l'origine de la mauvaise prise alimentaire<sup>124</sup>.

Le tourteau issu de ces graines améliore le pourcentage de dressage des coquelets expérimentaux. Les valeurs hématologiques comparées celle publiées par *Mitruka et al*<sup>125</sup> restaient toutes dans les normes.

---

<sup>121</sup> Odunsi A.A., Adegbile S.A., Akande T.O., Olayeni T.B. Neem (*Azadirachta indica*) Seed Cake in the Diets of Cockerel Chickens. *International Journal of Poultry Science*. **2009**, 8 (1): 47-51

<sup>122</sup> Nath, K., Rajagopal S., Garge A.K. Water washed neem (*Azadirachta indica*) seed kernel in cattle feed. *J. Agric. Sci.*, **1983**, 101: 323-326.

<sup>123</sup> Nath, K.S., Bedi P.S., Vijjan V.K., Ranjhan S.K. Nutritional study with neem seed cake. *Indian Ann. Rep. Anim. Nutr. Div. IVRI, Izatnager India* **1974**.

<sup>124</sup> Elangovan, A.V., Verma S.V.S., Sastry V.R., Singh S. Laying performance of Japanese quail fed graded levels of neem (*Azadirachta indica*) meal incorporated diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **2000**, 88: 113-120.

<sup>125</sup> Mitruka, B.M., Rawnsley H.M. Chemical, Biochemical and Hematological reference values in Normal Experimental animals. *Masson Pub. USA Inc. New York*, **1977**, 86-87.

Les résultats des travaux de (Odunsi *et al.* 2009) sur l'inclusion du tourteau de neem dans l'alimentation des poulets montrent que le tourteau de neem peut remplacer en partie la farine de soja.

**Tableau 11** : indices hématologiques de coquelets nourris à base de tourteaux de graines neem traitées et non traitées.

Paramètres	GLE (%)		GNLE (%)	
	10	20	10	20
Hémoglobine g/dl	8.4	8.3	8.65	8.55
Volume cellulaire (%)	25.3	25.0	26.0	25.8
Globule Rouge g/dl	4.2	4.15	4.28	4.35
neutrophiles	51.7	52.8	51.8	49.3
lymphocytes	40.3	42.5	42.0	42.5
éosinophiles	5.00	3.00	5.00	5.50
Monocytes	2.50	1.75	1.25	2.75

**Tableau 12** : Les caractéristiques de carcasse et des organes de coquelets nourris à base de tourteaux de graines neem traitées et non traitées.

Paramètres	GLE (%)		GNLE (%)	
	10	20	10	20
<b>carcasse (%)</b>				
tête	10.3	10.8	10.8	10.2
Cou	11.9	11.4	8.65	10.7
Jarret	11.0	12.8	11.2	11.9
Arrière	20.6	31.7	24.8	22.4
Aile	18.4	21.9	18.1	16.7
pilon	21.3	23.5	18.2	15.3
Cuisse	18.3	20.8	15.3	15.9
<b>Organe (%)</b>				
Poumon	1.45	1.77	1.37	1.31

rein	2.16	2.20	1.96	1.97
cœur	1.24	1.37	0.79	1.15
rate	0.53	0.39	0.40	0.39
foie	5.28	7.20	6.07	6.16
pro ventricule	1.23	1.44	0.97	1.42
Gésier	12.6	14.1	<b>II.2</b>	12.4

### **II.2.12.) L'utilisation du tourteau de neem comme fertilisant : Engrais**

Le neem a démontré un potentiel considérable en tant qu'engrais. Le tourteau de neem est largement utilisé pour fertiliser les cultures de rente, notamment la canne à sucre et les légumes. Intégré dans le sol, il protège les racines des plantes des nématodes et des fourmis blanches, probablement en raison de ses limonoïdes résiduels. Ses feuilles vertes et ses brindilles peuvent être malaxées et intégrées dans les rizières inondées, avant que les plants de riz soient transplantés. Les résidus des graines pressées s'utilisent dans l'aménagement du sol. Les agriculteurs, en Inde, utilisent la pâte de neem (le résidu laissé après l'extraction de l'huile des graines) comme un engrais organique et un amendement des sols. Il est censé améliorer l'efficacité des engrais azotés, en réduisant le taux de nitrification et les ravageurs du sol, y compris par l'inhibition des nématodes, des champignons et des insectes. Les feuilles et brindilles d'*A. indica* sont utilisés comme paillis et engrais vert.

### **II.2.13.) Le neem source de biocarburant**

#### **II.2.13.1.) Production de biodiésel à base d'huile de neem**

##### **II.2.13.1.1.) Les raisons du remplacement des carburants dérivés du pétrole**

Dans le monde moderne, la demande de sources d'énergie non renouvelables augmente de jour en jour en raison de la modernisation et mécanisation. La demande d'électricité et l'énorme augmentation du nombre d'automobiles a entraîné une plus grande

demande pour les produits pétroliers. La demande croissante pour les carburants à base de pétrole a conduit à des crises du pétrole dans les derniers temps.

Le diesel de pétrole et de l'essence se composent de mélanges de centaines de différents produits chimiques de différentes chaînes hydrocarbonées, bon nombre d'entre eux sont dangereux et toxiques. Le monoxyde de carbone (CO : produit lorsque la combustion), les oxydes d'azote (NO et NO<sub>2</sub> : produits lorsque la combustion à des températures très élevées), les oxydes de soufre (produit lorsque le soufre élémentaire est présent dans le carburant)<sup>126</sup>. A une concentration atmosphérique supérieure à 5 ppm le SO<sub>2</sub> devient toxique à l'homme et à certaines plantes<sup>127</sup>.

Donc, il est temps de chercher ses carburants de remplacement. Il y a plusieurs sources alternatives de carburant comme les huiles végétales, le biogaz, la biomasse, les alcools primaires qui sont tous renouvelables dans la nature. Parmi ces carburants, les huiles végétales semblent avoir une importance exceptionnelle car ils sont renouvelables et largement disponibles, biodégradable, non toxique et respectueux de l'environnement<sup>128</sup>.

Le biodiésel peut dans l'avenir apporter une contribution importante dans la lutte contre le réchauffement climatique due en partie par l'émission des cités précédemment. La transesterification est la méthode la plus connue et la plus efficace dans la production de biodiésel avec les huiles végétales<sup>129</sup>.

#### **II.2.13.1.2.) L'huile de neem une source alternative**

L'huile de neem a un poids moléculaire, une viscosité, et une densité plus élevée, que le carburant diesel. Elle est généralement claire au brun foncé, amer et a une odeur forte qui est une combinaison des odeurs de l'arachide et de l'ail<sup>130</sup>. Elle contient essentiellement

---

<sup>126</sup> Radha K. V. , Manikandan G., Novel Production Of Biofuels From Neem Oil, *Department of chemical Engineering*, Anna University, Chennai, India (2011).

<sup>127</sup> Greenwood N. N. , *Chemistry of the elements*, vol. 2, Butterworth Heinemann, Sulfur

<sup>128</sup> Ali M. H., Mashud M. , Rubel M. R. , Ahmad R. H., Biodiesel from Neem oil as an alternative fuel for Diesel engine, *Procedia Engineering* 56 ( 2013 ) 625 – 630.

<sup>129</sup> Ma F.; Hanne M.A. Biodiesel production, a review *Bioresource Technology*, (70) 1999 ; 1-15.

<sup>130</sup> Fazal M. A., Haseeb A.S.M.A. and Masjuki H.H.; Biodiesel feasibility study: An evaluation of material compatibility; performance; emission and engine durability, *Renew. sustain.Engy Reviews*, Vol.15,2, (2011) 1314-1324.

quatre acides gras saturés, dont deux sont l'acide palmitique et deux l'acide stéarique. Elle contient également des acides gras polyinsaturés tels que l'acide oléique et l'acide linoléique<sup>131</sup>.

Les fruits de neem sont constitués de 30 à 40 % d'huile. La fabrication de biodiésel à partir de l'huile de neem a été réalisée par l'équipe d'Ali *et al.* 2013.

#### **II.2.13.1.3.) Méthode de production du biodiésel (Ali *et al.* 2013)**

Le procédé utilisé est basé sur la transestérification pour obtenir des mono esters d'alkyls. L'optimisation pour obtenir un bon rendement de biodiésel a été réalisée à différentes températures et différents ratios molaire huile de neem et méthanol. La transestérification est catalysée par un catalyseur alcalin (KOH ou NaOH).

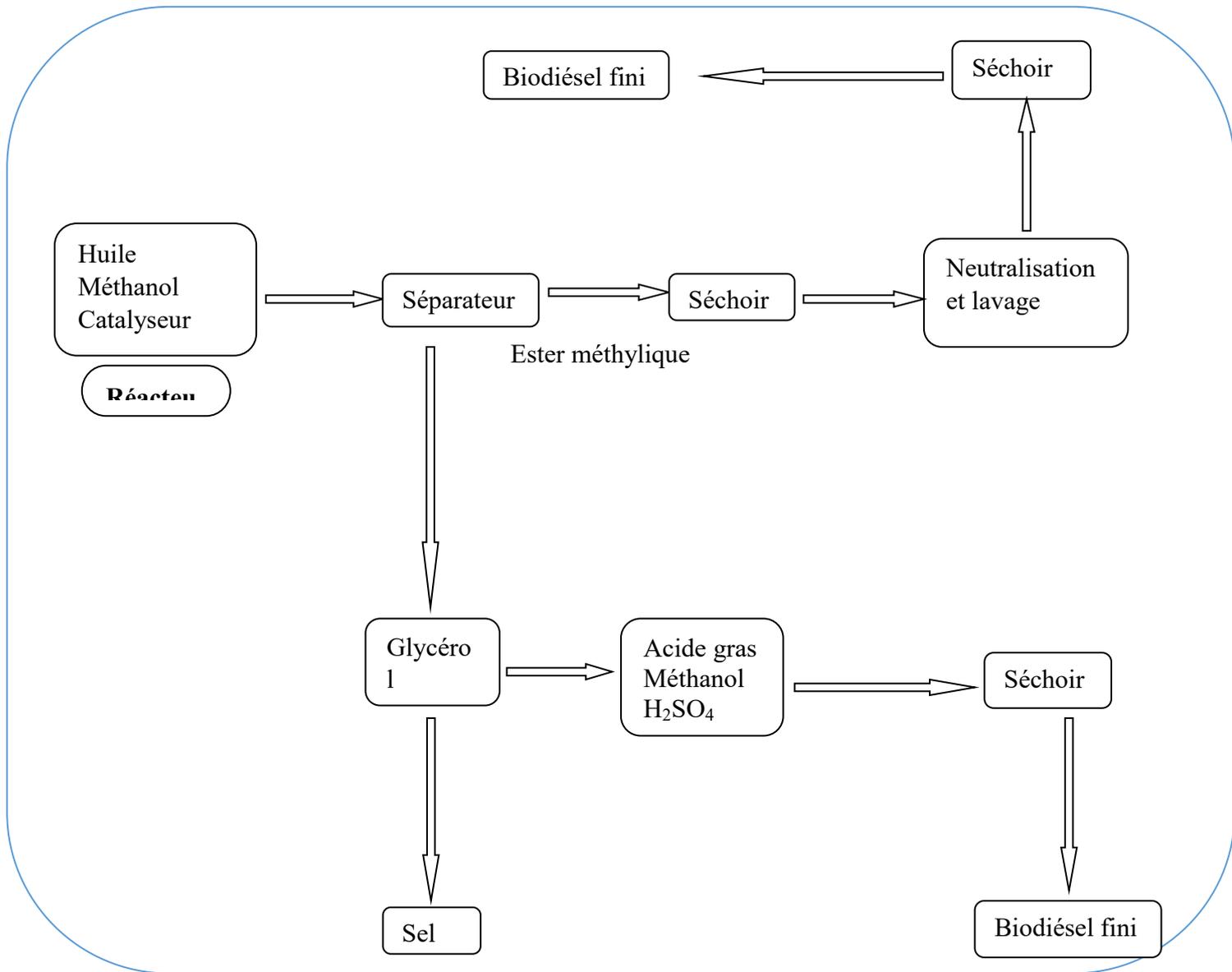
La formation d'esters méthyliques par transestérification d'huile végétale nécessite une composition massique de 15% de méthanol et 5% d'hydroxyde de sodium. Au plan moléculaire, pour produire des esters méthyliques, une mole de glycéride réagit avec trois moles de méthanol en présence d'un catalyseur (KOH ou NaOH). La température est maintenue entre 55 et 65 ° C dans la plupart des cas (en dessous du point d'ébullition normal du méthanol) ; ainsi le réacteur n'a pas besoin d'être mis sous pression<sup>132,133</sup>.

---

<sup>131</sup> Muthu, V. SathyaSelvabala, T. K. Varathachary, D. Kirupha Selvaraj, J. Nandagopal and S. Subramanian synthesis of biodiesel from neem oil using sulfated zirconia via tranesterification.

<sup>132</sup> Jon H. Van Gerpen, Charles L. Peterson, Carrol E. Goering, Biodiesel: An Alternative Fuel for Compression Ignition Engines, for presentation at the 2007 Agricultural Equipment Technology Conference Louisville, Kentucky, USA 11-14 February 2007.

<sup>133</sup> Van Gerpen, J., Biodiesel processing and production. *Fuel processing Technology* 86, 2005, 1097-1107.



**Figure 25 :** Schéma de préparation de biodiésel



**Photo 5** : les différentes phases après la réaction

**Tableau 13** : Les propriétés observées

Propriétés	Huile de neem	Huile de neem (standard)	Biodiésel	Diésel
Densité	0.878	0.778	0.61	0.84
La viscosité cinétique 35 °C de l'huile	24.14	21.38	5.96	4.0
Valeur calorifique (MJ/KG)	26.65	-	38.15	45

La viscosité un facteur essentiel dans la préparation de carburant, sa réduction de 24.14 à 5.96 fait de du biodiésel comme carburant diésel. Cette viscosité obéit aux normes ASTM D6751-02 fixées entre 1.90 et 6.0. Le taux de conversion est de 95 %.

Le Sénégal pays où le neem occupe bonne place dans sa végétation ; l'extraction de l'huile des graines et sa transesterification contribueront à une baisse importante du fardeau des importations de pétrole brut.

## **Partie Expérimentale :**

### *Chapitre 3 :*

- ❖ *Rappels des techniques d'extraction et d'analyses*
- ❖ *Collecte des graines de Neem (*Azadirachta indica*)*

### **III.1.) Rappels des techniques d'extraction et d'analyse**

#### **III.1.1.) Les techniques d'extraction**

L'opération d'extraction consiste à transférer, de façon aussi sélective que possible, une espèce chimique d'une phase à une autre<sup>134</sup>. Une extraction efficace doit être précédée par une bonne revue bibliographique sur la polarité du composé à extraire. Ainsi le choix du solvant d'extraction devient plus facile.

Dans cette étude deux techniques d'extraction ont été les plus utilisées : l'extraction solide/liquide et liquide/liquide. L'extraction au CO<sub>2</sub> super critique a fait l'objet de quelques tests d'extraction de l'Aza-A.

##### **III.1.1.1.) L'extraction solide/liquide**

Il s'agit d'extraire un composé contenu dans un mélange solide par un liquide dans lequel il est soluble. Cette opération est assez souvent effectuée par agitation ou au Soxhlet pour palier à certains problèmes liés à la diffusion du solvant d'extraction dans la matrice solide.

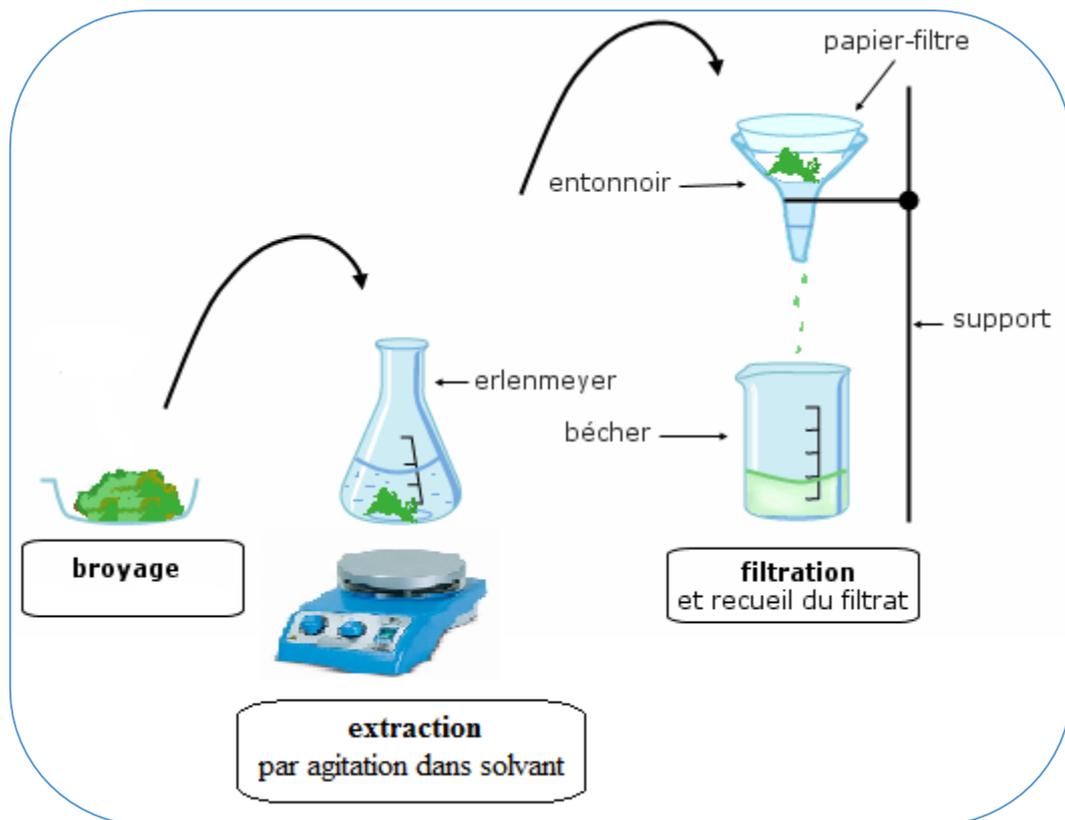
###### **III.1.1.1.1.) L'Extraction par agitation**

Cette technique est l'une des plus simples utilisées dans la chimie extractive à l'échelle du laboratoire. Le dispositif de son montage est constitué d'un appareil très accessible.

La matrice solide à extraire est mise dans un erlenmeyer avec le solvant d'extraction ; un barreau émanté est plongé dans le mélange. L'erlenmeyer est déposé sur une plaque agitateur magnétique la vitesse d'agitation est fixée à l'aide du bouton de réglage qui dispose la plaque.

---

<sup>134</sup> Blanchard-Desce M., Fosset B., Guyot F., Jullien L., Palacin S. Chimie Organique Expérimentale. *Hermann* 1987, 32-42.



**Figure 26 :** Montage de l'extraction par agitation

### III.1.1.1.2.) L'Extraction au soxhlet

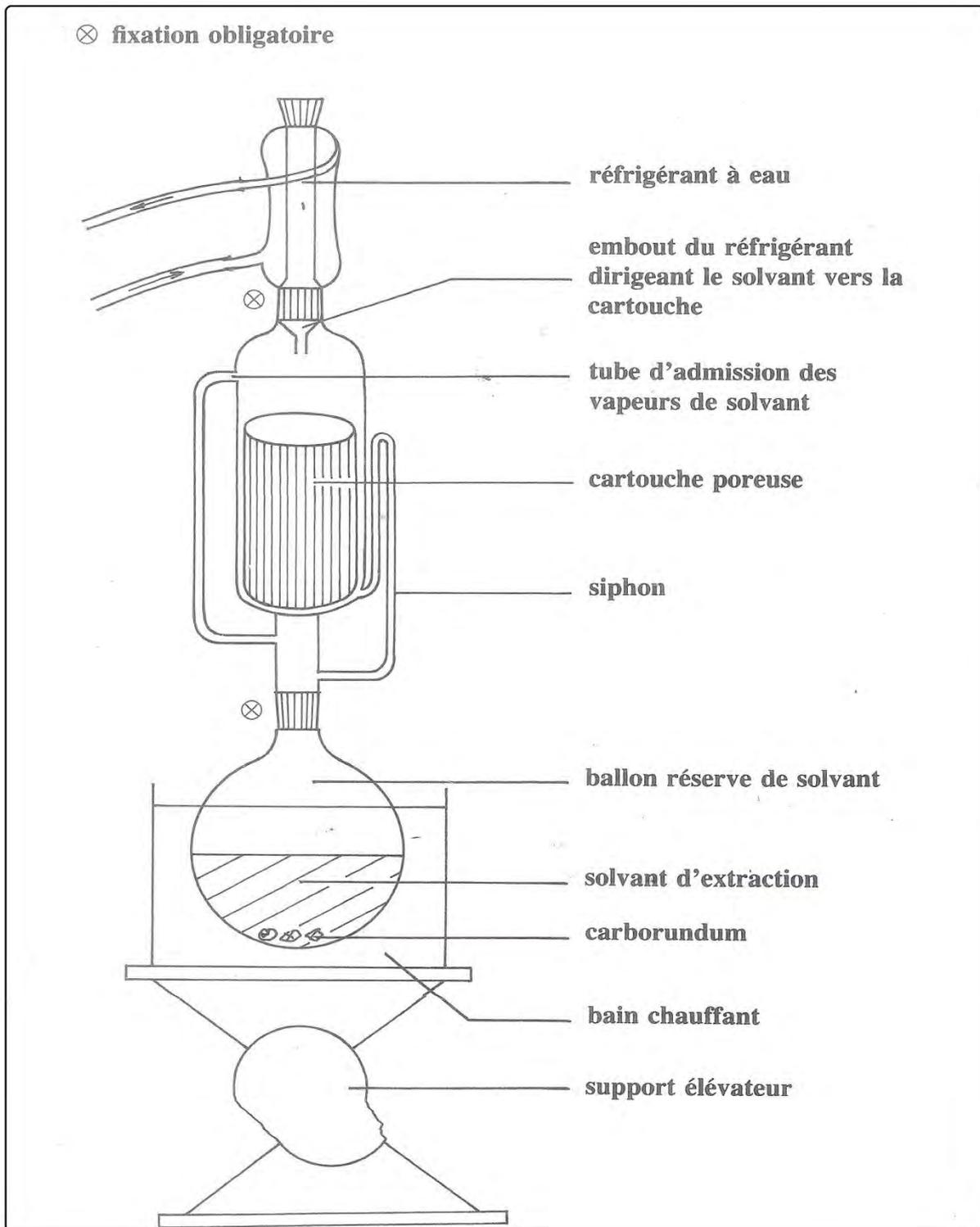
A l'échelle du laboratoire, dans le cadre de cette étude, la délipidation des broyats des amandes de fruits de neem a été toujours fait au soxhlet.

#### III.1.1.1.2.1.) Description du montage de l'extraction au soxhlet

Le dispositif du montage est constitué de trois parties :

- ❖ Le soxhlet qui donne son nom à la technique d'extraction. Un siphon permet l'évacuation de la solution de la partie contenant la cartouche vers le ballon,
- ❖ Un ballon réserve de solvant,
- ❖ Un réfrigérant permettant la condensation des vapeurs de solvants.

L'avantage de cette technique est que le solide est toujours en contact avec du solvant pur ; ce qui entraîne une extraction continue et efficace des composés du produits solide



**Figure 27 :** *dispositif du montage du soxhlet*

### III.1.1.2.) l'extraction par fluide liquide et supercritique

Les industries extractives utilisent actuellement le dioxyde de carbone sous ses deux états, liquide et supercritique. A son état supercritique de le CO<sub>2</sub> a une densité voisine de celle

des liquides et ses qualités dissolvantes sont plus ou moins sélectives, selon la température, la pression et la nature des solutés<sup>135</sup>.

Son prix de revient, sa facilité d'approvisionnement, sa pureté, son innocuité pour les produits à extraire font du CO<sub>2</sub> un solvant d'avenir.

### III.1.1.2.1.) Description de la technique

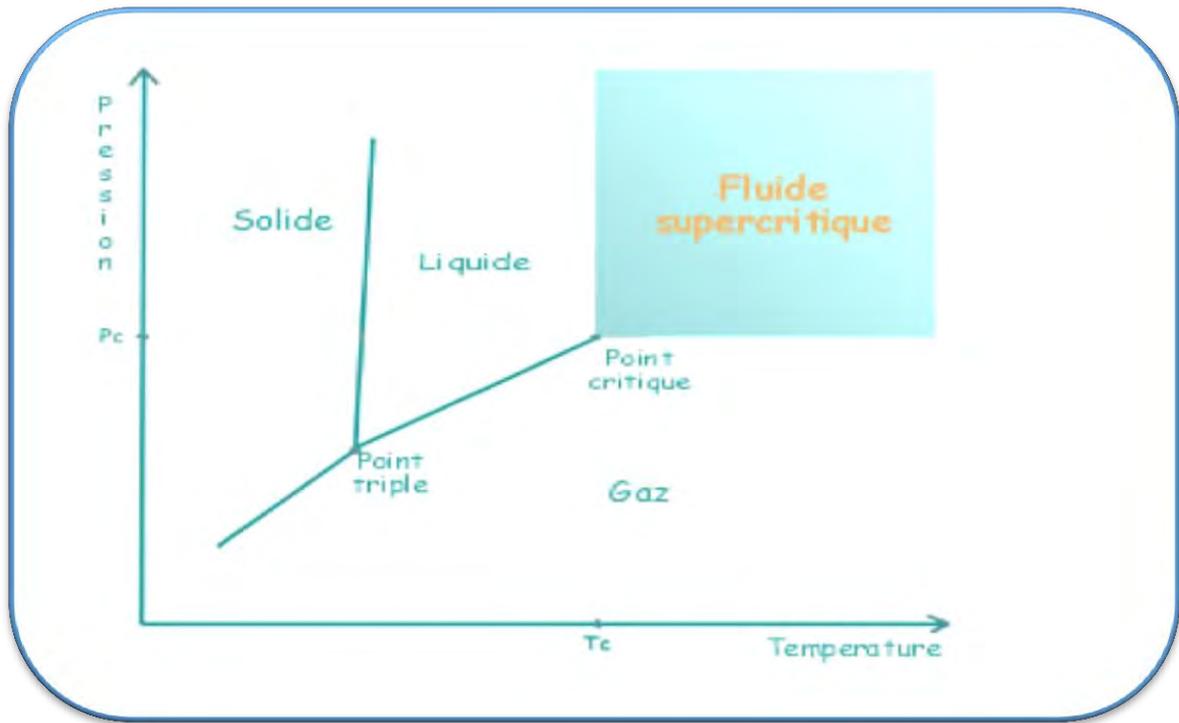
La technologie des fluides supercritiques est complémentaire des techniques classiques telles la distillation vapeur. Elle est actuellement une source d'innovation pour de nouveaux produits dans différents secteurs d'activités : industrie agro-alimentaire, pharmacie, santé, etc. Le CO<sub>2</sub> est le gaz le plus utilisé car ses conditions supercritiques (31°C – 74 bars) sont plus faciles à atteindre.<sup>136</sup> Des co-solvants comme l'eau ou les alcools sont utilisés pour extraire des molécules assez polaires.

Ainsi, lorsque l'on porte un composé (liquide ou gazeux) dans des conditions de pression et de températures particulières, il cessera d'être liquide ou gazeux pour se trouver à la fois à l'état liquide et gazeux, l'équilibre entre ces deux états se faisant de manière continue. Le fluide supercritique présente alors des propriétés solvantes tout à fait remarquables.

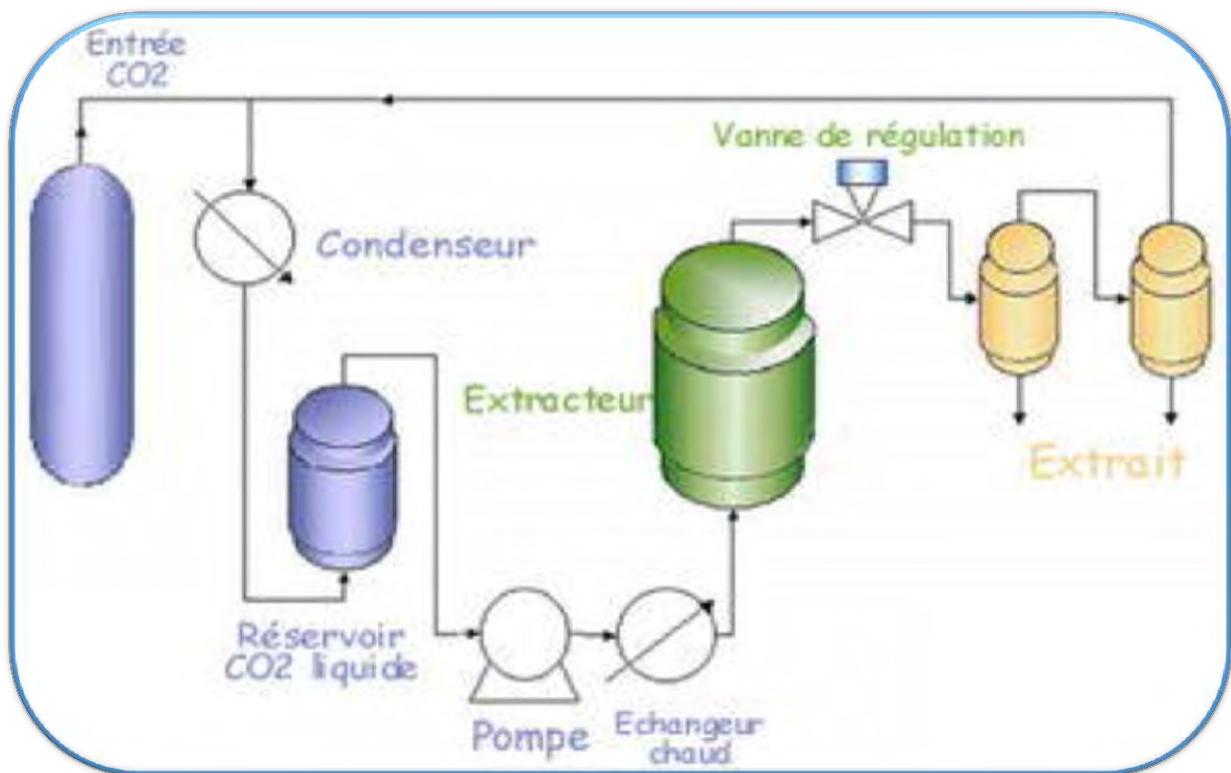
---

<sup>135</sup> Sall S. N. contribution à la caractérisation de quelques structures chimiques des extraits d'huiles essentielles de l' *Herria Insignis* du Sénégal. Mémoire de Diplôme d'Etude Approfondies (D.E.A), Faculté des Sciences et Technique, Université Cheikh Anta Diop Dakar-Sénégal. **1997**.

<sup>136</sup> <http://wikini.supercriticalfluid.org>, Pizarro K., Fluides supercritiques, *Jitec* n° 137 mars **2010**.



**Figure 28 :** *Diagramme schématisique des trois états d'un composé.*



**Figure 29 :** *Représentation schématisique d'une chaîne d'extraction par fluide supercritique*

Fonctionnement globale du système :

- ❖ Le CO<sub>2</sub> est condensé et gardé dans un réservoir (CO<sub>2</sub> liquide),
- ❖ Le CO<sub>2</sub> est comprimé et chauffé via un autoclave au-delà de son point critique (74 Bars et 31°C),
- ❖ Au-delà du point critique, le CO<sub>2</sub> passe en phase supercritique et acquiert alors des propriétés de solvant lui permettant d'extraire le composé de la matrice solide,
- ❖ La température et la pression sont abaissées de sorte que le CO<sub>2</sub> repasse à l'état gazeux, libérant ainsi le composé.

### **III.1.1.3.) L'extraction liquide/liquide**

Elle consiste à transférer un soluté d'une phase liquide vers une autre phase liquide non miscible. Il s'agit de l'une des opérations les plus fréquemment réalisées en chimie organique. Les deux facteurs mis en jeu dans cette opération sont : la non miscibilité entre les deux solvants utilisés et la solubilité du soluté vis-à-vis de ces deux solvants.

#### **III.1.1.3.1.) description de la technique**

Verser la phase contenant le soluté à extraire dans l'ampoule à décanter, ajouter le solvant d'extraction. Boucher correctement, renverser l'ampoule pour avoir le robinet en l'air tout en tenant le bouchon, agiter doucement, ouvrir le robinet pour libérer les vapeurs du solvant d'extraction. Fermer le robinet, redresser l'ampoule et la placer sur son support, laisser apparaître une séparation entre la phase liquide de départ et celle du solvant d'extraction. Recueillir la phase constituée par le solvant d'extraction. Reprendre une extraction avec la phase de départ qui contient encore une partie du composé à extraire qui sera ainsi extrait une deuxième fois, ainsi de suite.

Le dispositif est constitué d'un seul appareil : l'ampoule à décanter.

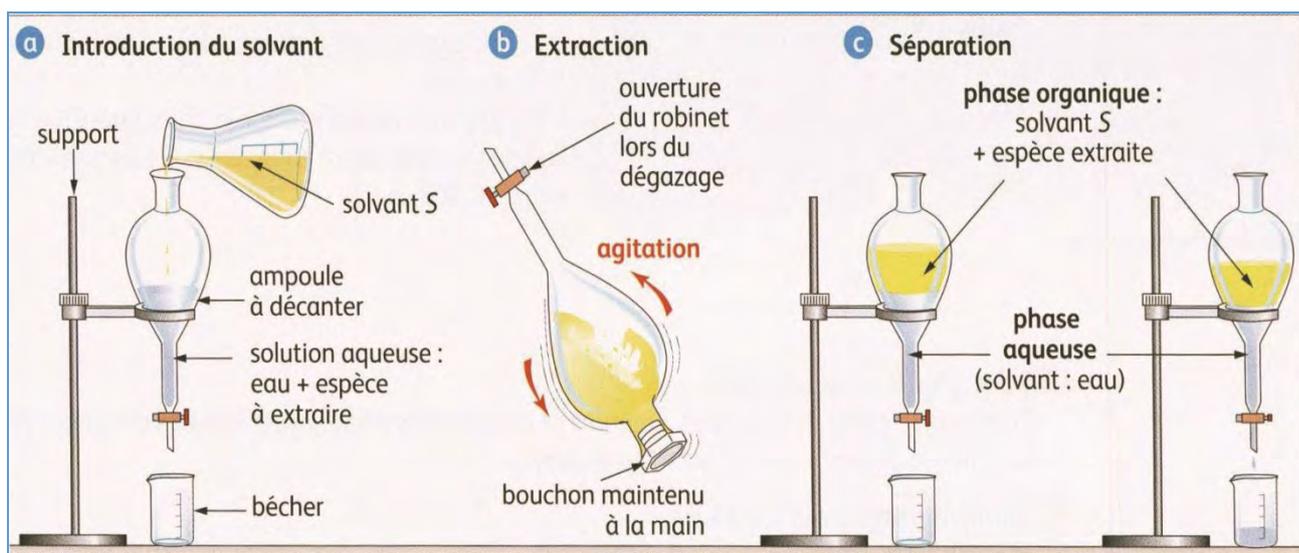


Figure 30 : les étapes d'une extraction liquide/liquide

### III.1.2.) Les techniques d'analyses

Dans nos travaux les deux principales techniques d'analyses utilisées sont la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

#### III.1.2.1.) La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN permet d'étudier le rayonnement absorbé par les noyaux des atomes, d'où le terme **Nucléaire**. En 1938, *Isidor Isaac Rabi* montre que le noyau atomique peut absorber un rayonnement électromagnétique (une seule fréquence), d'où le terme **Résonance**, en présence d'un fort champ magnétique, d'où le terme **Magnétique**<sup>137</sup>.

Le premier spectre RMN a été obtenu en 1946 par *Félix Bloch* et *Edward Purcell*. Il s'agissait d'un spectre de l'eau. *Bloch* et *Purcell* ont obtenu le prix Nobel de Physique en 1953 pour cette découverte<sup>138</sup>.

<sup>137</sup> Kellogg J. M., Rabi I. I., Ramsey N. F., and Zacharias, J. R. *phys. Rev.* **1939**, 56, 738.

<sup>138</sup> <http://www.magnetic-resonance.org/ch/20-02.html> 27 juillet 2016.

Aujourd'hui, les applications de la RMN sont immenses et concernent de nombreux domaines de la physique, la chimie, la biologie et également l'imagerie médicale (l'Imagerie par résonance magnétique ou IRM).

### III.1.2.1.1.) Principe de la RMN

La résonance magnétique nucléaire fait partie des techniques dites de spectroscopie, c'est-à-dire des techniques qui étudient le rayonnement électromagnétique absorbé par la matière.

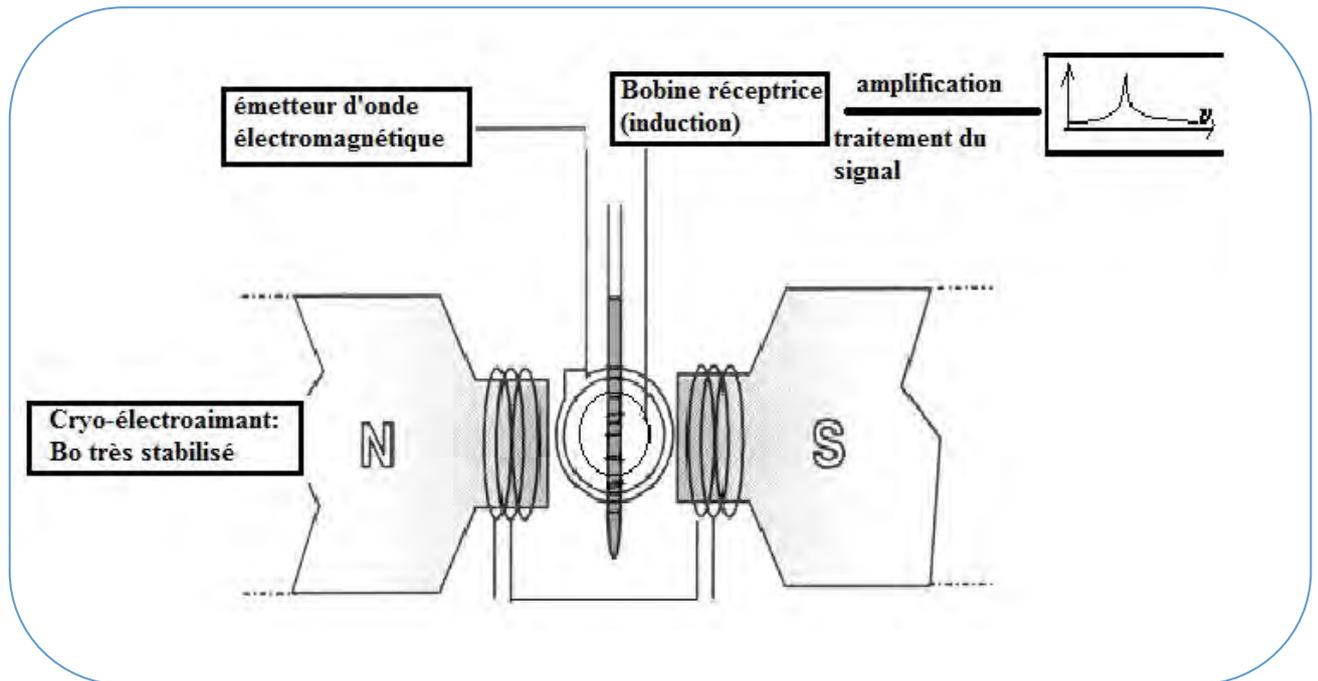
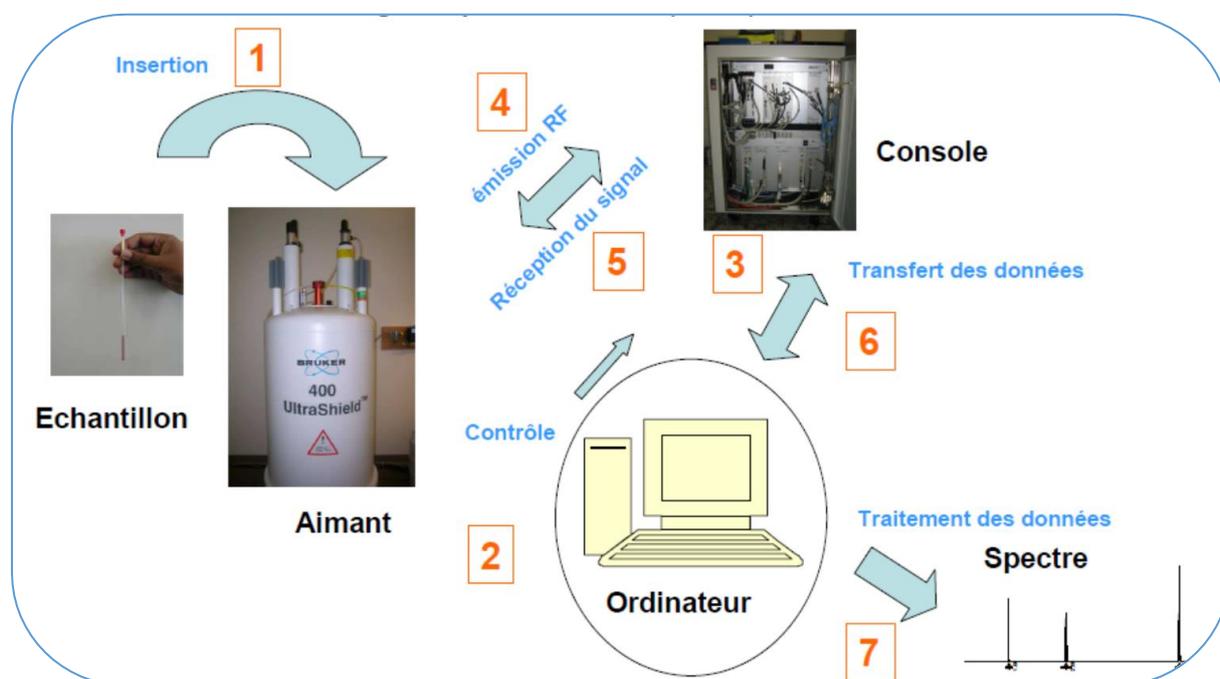


Figure 31 : Schéma de principe de la RMN

### III.1.2.1.2.) Description de la technique de la RMN

- ❖ Les échantillons à étudier sont dissous dans un solvant et introduit dans des tubes spéciaux,
- ❖ Le tube est introduit dans le spectromètre et arrive dans la sonde de mesure,
- ❖ L'opérateur introduit les commandes pour manipuler l'aimantation du noyau choisi,
- ❖ Ces commandes sont transmises à la console qui envoie le rayonnement dans la sonde de mesure,

- ❖ Le signal émis par les noyaux passe dans la sonde et le console et est récupéré par l'ordinateur
- ❖ Les données brutes sont traitées par l'ordinateur,
- ❖ Les spectres résultants sont prêts à être analysés par l'opérateur.



**Figure 32 : procédure d'analyse**

La RMN est un outil puissant pour l'analyse de structure. Aujourd'hui elle est indispensable dans les laboratoires et industries chimiques. C'est la seule technique avec la diffraction des rayons X permettant de prouver avec quasi certitude la structure d'une molécule.

### III.1.2.2.) La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

La CLHP correspond à une évolution de la chromatographie sur colonne. Pour améliorer les performances de celle-ci (en particulier l'efficacité de la résolution), il faut diminuer la taille des particules utilisées pour constituer la phase stationnaire ; mais plus les grains sont petits, plus la durée de l'éluion est grande. Il faut donc utiliser des pompes très **performantes** pour maintenir un débit d'éluant suffisant et constant à travers la colonne. Des

pressions de plusieurs centaines de bars sont nécessaires pour assurer des débits raisonnables avec les nouveaux supports dont la taille des particules est comprise entre 3 et 10  $\mu\text{m}$ .

#### **III.1.2.2.1.) Principe de la CLHP**

La CHLP est une technique analytique très générale d'emploi. Elle permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

#### **III.1.2.2.2.) Description de la technique CLHP**

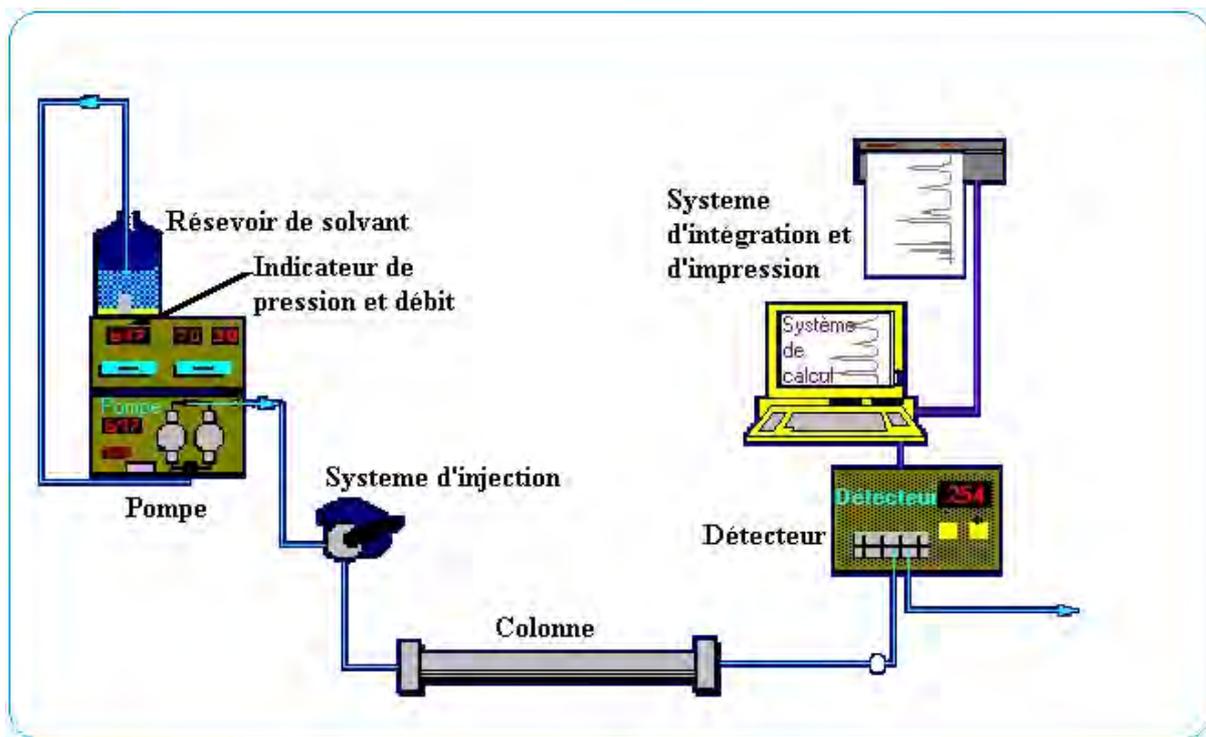
Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution. Le mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.



**Figure 33** : schéma de principe d'une chaîne CLHP

### III.2.) La collecte des fruits de Neem

#### III.2.1.) Collecte dans la région de Dakar

La collecte des fruits a été effectuée dans le campus universitaire. Dans cette région tous les fruits ont été cueillis des arbres. Nous avons constaté que, pendant toute la période de collecte, les fruits tombés par terre sont dépourvus de leurs graines. Dans la capitale certains oiseaux se nourrissent de graines de neem. La période de fructification s'étend de fin septembre à début décembre. Les échantillons ont été répartis comme indiqués dans le tableau ci-dessous. Deux modes de séchages ont été effectués : au soleil et à l'ombre.

**Tableau 14** : échantillons de fruits collectés à Dakar

Mode de séchage	Masses fruits frais	Masse fruits secs	Masses amandes
A l'ombre	25 Kg	6.7 Kg	700 g
Au soleil	12 Kg	3.1 Kg	450 g



**Photo 5 :** enveloppes de conserves des amandes de fruits de neem

### III.2.2.) Collecte dans la région de Thiès

Dans cette région la Commune de Tivaoune a été retenue comme site de collecte des fruits de neem. Ce choix a été principalement motivé par la présence des jeunes des écoles coraniques qui pouvaient en un délai record nous collecter une quantité suffisante de graines pour nous permettre de passer de l'échelle du laboratoire à l'échelle semi industrielle (pilote).

200 Kg de fruits cueillis frais (non mûr) et 5 Kg de fruits mûrs ramassés par terre ont été collectés à Tivaoune. La collecte et le transport des graines à Dakar nous avaient revenus à 32 000 F CFA.

Sur une toile étalée sur le perron de la véranda du Professeur *Gallédou* (**photo 6**) nous avons séché les fruits frais destinés à l'extraction semi-industrielle. Les fruits mûrs et secs ont été directement décortiqués pour garder les amandes dans des enveloppes en papier.



**Photo 6:** *phase de séchage des fruits (échelle pilote)*

Pour l'extraction à l'échelle du laboratoire nous avons constitués trois échantillons : un premier constitué de fruits non mûrs (**Fnm**), un deuxième de fruits mûrs cueillis (**Fmc**) et un troisième de fruits mûrs ramassés par terre (**Fmr**).

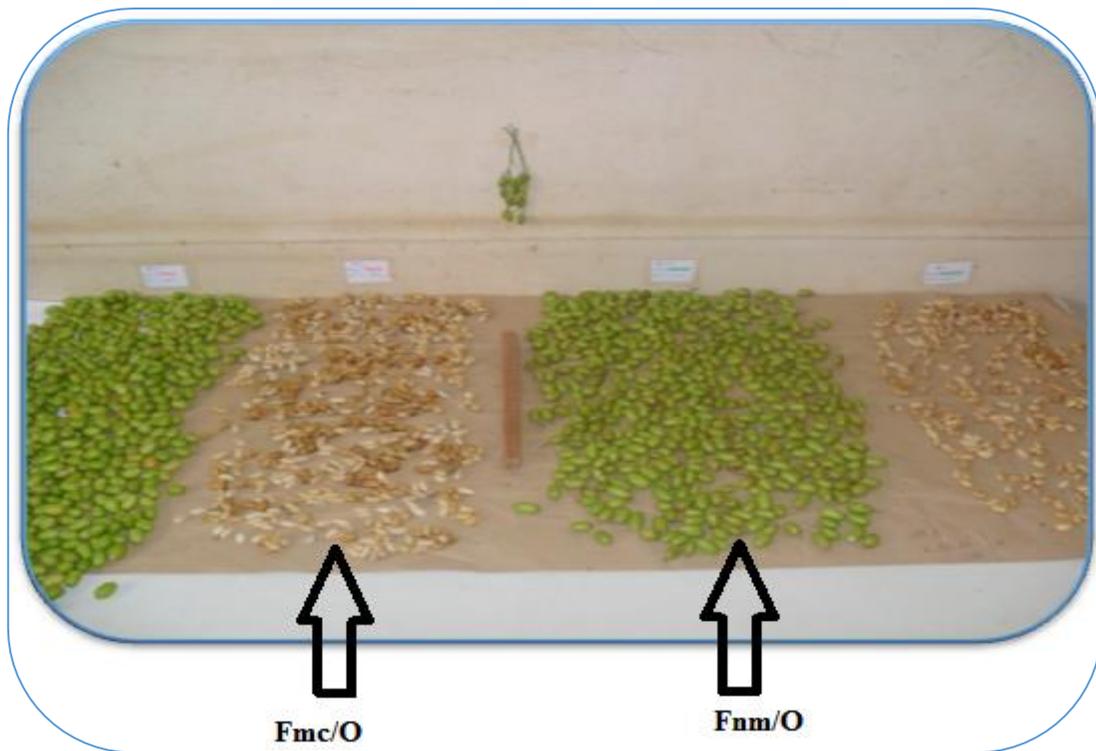
Les échantillons des fruits non mûrs (**Fnm**) et fruits mûrs cueillis (**Fmc**) ont été répartis chacun en deux sous échantillons pour le séchage à l'ombre et au soleil.

**Fnm/O** : fruits non mûrs séchés à l'ombre,

**Fnm/S** : fruits non mûrs séchés au soleil,

**Fmc/O** : fruits mûrs cueillis séchés à l'ombre,

**Fmc/S** : fruits mûrs cueillis séchés au soleil.



**Photo 7 :** *phase de séchage des fruits (échelle Labo.)*

Le décortiquage des fruits secs est assuré par des femmes de la gueule tapée. Une étape qui nécessite dans le futur de trouver une machine décortiqueuse pour assurer une bonne pureté des amandes une fois sorties de la coque qui servait de protection.



**Photo 8 :** *Amandes de fruits de neem*

### III.2.3.) Collecte dans la région de Louga

La commune de Ndande située à une quarantaine de kilomètre de Louga a été choisie comme site de collecte.

40 Kg de fruits de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) essentiellement non mûrs (**Fnm**) ont été cueillis dans la Commune de Ndande. Ce lot destiné à l'extraction sur pilote a été séché à l'ombre d'un manguier au domicile du *Professeur Gallédou*. 9 Kg de fruits secs ont été récupérés après séchage. Le décorticage donne 1 Kg d'amandes de neem gardé dans des enveloppes en papier. 9 000 F CFA ont été payés pour le décorticage aux femmes de la guéule tapées. Un lot de fruits mûrs ramassés par terre a été aussi collecté dans cette commune.

#### **III.2.4.) Collecte dans la région de Diourbel**

Deux sites ont été retenus pour cette région à savoir Diourbel Commune et la Commune de Touba.

##### **III.2.4.1.) Collecte dans la commune de Diourbel**

Dans ce site tous les fruits collectés étaient destinés à l'extraction à l'échelle du laboratoire. La collecte s'est effectuée au quartier Chiek Ibra Ouest de la ville. 130 g de fruits mûrs cueillis (**Fmc**) et 742 g de fruits non mûrs (**Fnm**) ont été collectés. Au Novembre, les arbres étaient en grande majorité en période de floraison. Ce qui justifie cette faible masse de graines obtenues dans cette région au centre ouest du Sénégal.



**Photo 9** : arbre de neem en période de floraison (photo prise à Diourbel le 26 Novembre)

**Tableau 15** : Suivi des échantillons de la commune de Diourbel

Noms/Masses	Fmc (DL)	Fnm (DL)
Masse F (g)	130	742
Masse S (g)	82.2	195.2
Masses amandes (g)	38.4525	41.8520
Masse S/ Masse F	0.6323	0.2631
Masses amandes/ Masse S	0.4678	0.2144
Masses amandes/ Masse F	0.2958	0.0564

### III.2.4.2.) collecte dans la commune de Touba

Dans la même période nous avons effectué à Touba, situé à 42 Km de Diourbel, 223g de fruits mûrs cueillis (**Fmc**) et 955 g de fruits non mûrs (**Fnm**).

**Tableau 16** : *Suivi des échantillons de la commune de Touba*

Noms/ Masse	Fmc (Touba)	Fnm (Touba)
Masse F(g)	223	955
Masse S (g)	150.5	254.6
Masse amandes (g)	72.7230	55.8738
Masse S/ Masse F	0.6749	0.2666
Masses amandes/ Masse S	0.4832	0.2194
Masses amandes/ Masse F	0.3261	0.0585

### III.2.5.) Collecte dans la région de Matam

Dans cette région le village de Nabadji Cyvol a été retenu comme site de collecte. 03 Kg de fruits verts ont été cueillis dans ce village. Arrivé à Dakar, nous avons constaté la maturation de quelques fruits qui ont été triés et pesés (200 g).

Les fruits verts (non mûrs) ont été scindés en deux échantillons de 1.4 Kg l'un séché au soleil (**Fnm/S**) et l'autre à l'ombre (**Fnm/O**).

L'échantillon de fruits qui a mûris lors du voyage a été séché à l'ombre (**Fmc/O**). Il avait donné 30.20 g d'amandes après décorticage.

**Tableau 17** : suivi échantillons des fruits de la Commune de Nabadji Civol

Nom du lot	Fnm/S	Fnm/O
Masse fruits frais (Kg)	1.4	1.4
Masse fruits secs (g)	258.15	417.62
Masse amandes (g)	50.8749	44.3800

### III.2.6.) Collecte dans la Région de Tambacounda

Backel l'un des Départements de la région a été choisi pour la collecte. 09 Kg de fruits mûrs ramassés (**Fmr**) ont été collectés. Une masse de 3.6 Kg d'amande a été obtenue après décorticage.

Dans cette région nous avons un raté la période de fructification des arbres d'où l'absence d'échantillons de fruits non mûrs.

### III.2.7.) Collecte dans la région de Kaolack

Kayemor est une commune située dans le Département le Nioro du Rip a été le site de collecte pour la région de Kaolack. Dans ce village 1.5 Kg de fruits ramassés par terre (**Fmr**) ont été collectés. Après décorticage 700 g d'amandes ont été obtenues.

## *Chapitre 4 :*

*Extraction et dosage de la teneur en Azadirachtine-A (Aza-A) dans les fruits de neem des régions de collectes.*

#### IV.1.) Procédure d'extractions

Deux procédures d'extraction sont couramment utilisées pour extraire l'Azadirachtine-A (Aza-A) des amandes des fruits de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) : l'une consiste à procéder par polarité croissante et l'autre par polarité décroissante.

- ❖ La procédure d'extraction par polarité décroissante consiste à extraire l'aza-A par un solvant ou mélange de solvants polaires et de laver l'huile résultante dans un hydrocarbure.
- ❖ La procédure d'extraction par polarité croissante consiste à délipider le broyat des amandes avec un hydrocarbure puis extraire le tourteau par un solvant polaire ou un mélange de solvants polaires. Dans notre étude, c'est cette procédure d'extraction par polarité croissante qui a été adoptée.

##### IV.1.1.) Broyage des amandes

Afin d'homogénéiser la taille des particules et de faciliter les extractions solide/liquide les amandes des fruits de neem sont broyées avec un mixeur (PHILIPS, HR2875/AM, 220-230 V, 50-60 Hz, 400W).

##### IV.1.2. Détermination de la teneur en huiles dans les fruits de neem

Le broyat est introduit dans une cartouche cellulosique (30 x 100mm, code 19354, *Fisher Bioblock*), laquelle est introduite dans un extracteur de type soxhlet, équipé à sa base d'un ballon de 250 ml dans lequel on met 200 ml d'éther de pétrole. La durée de l'extraction est de 3 heures au minimum, durée considérée comme suffisante pour épuiser les amandes de son contenu en huile.

La teneur en huile est déterminée par la formule suivante :

$$\bar{\delta} = \frac{M_h}{M_a} \times 100$$

$\bar{\delta}$  : teneur en huile dans les amandes

$M_h$  : masse d'huile de l'échantillon (g)

$M_a$  : masse amandes broyées (g)

### IV.1.3.) L'extraction de l'Aza-A

#### IV.1.3.1.) Extraction de l'Aza-A dans l'huile de neem

Pour extraire l'Aza-A de l'huile, la méthode développée par *Kumar*<sup>139</sup> a été utilisée.

8 g d'huile ( $M_h$ ) sont dilués dans 10 mL de n-hexane. Le mélange est extrait trois fois avec un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O dans un rapport 45 : 55. Les fractions hydro-alcoolique sont regroupées et concentrées à l'évaporateur rotatif à température  $T < 35^\circ\text{C}$ . La phase aqueuse résultante est introduite dans une ampoule à décanter et est extraite avec du MTBE. L'extraction est répétée trois fois pour épuiser le concentré de son contenu en Aza-A. A chaque extraction, un volume double de MTBE a été utilisé. Les phases étherées sont regroupées et séchées sur MgSO<sub>4</sub>. L'extrait d'azadirachtine technique est obtenu en évaporant à sec le MTBE. 36 mg ( $M_{\text{azatech}}$ ) d'extrait d'azadirachtine technique sont obtenus après précipitations de l'extrait (pâteux) initialement obtenu en évaporant à sec le MTBE.

Le rendement d'extraction est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Rext.} = 100x \frac{M_{\text{azatech}}}{M_h}$$

$R_{\text{ext}}$  : Rendement d'extraction de l'azadirachtine technique

$M_{\text{azatech}}$  : Masse d'azadirachtine technique extraite

$M_h$  : Masse huile de départ ayant subie l'extraction

#### IV.1.3.2.) Extraction de l'Aza-A dans le tourteau

L'extraction est effectuée dans un erlenmeyer (ou bécher) dans lequel est plongé un barreau aimanté agité à la vitesse de 500 tr/min par un agitateur magnétique (*BIOBLOCK AM 300* ou *Fischer Scientific*).

---

<sup>139</sup> Kumar J., Parmar B. S. J. *Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2137-2143



**Photo 10** : *Montage extraction solide/liquide*



**Photo 11** : *Extraction liquide- liquide au MTBE du concentrat*

Une masse  $M_t$  de tourteau (résidu de l'extraction solide/liquide au soxhlet) est extraite avec un volume  $V_s$  ( $V_s = 6 \times M_t$ ) d'une solution aqueuse de méthanol à 45 %.

Afin d'extraire la totalité de l'Aza-A du tourteau, la suspension est agitée pendant 3 heures, puis filtrée sur fritté. Le filtrat est concentré sous vide à  $T < 40\text{ °C}$  à l'évaporateur rotatif.

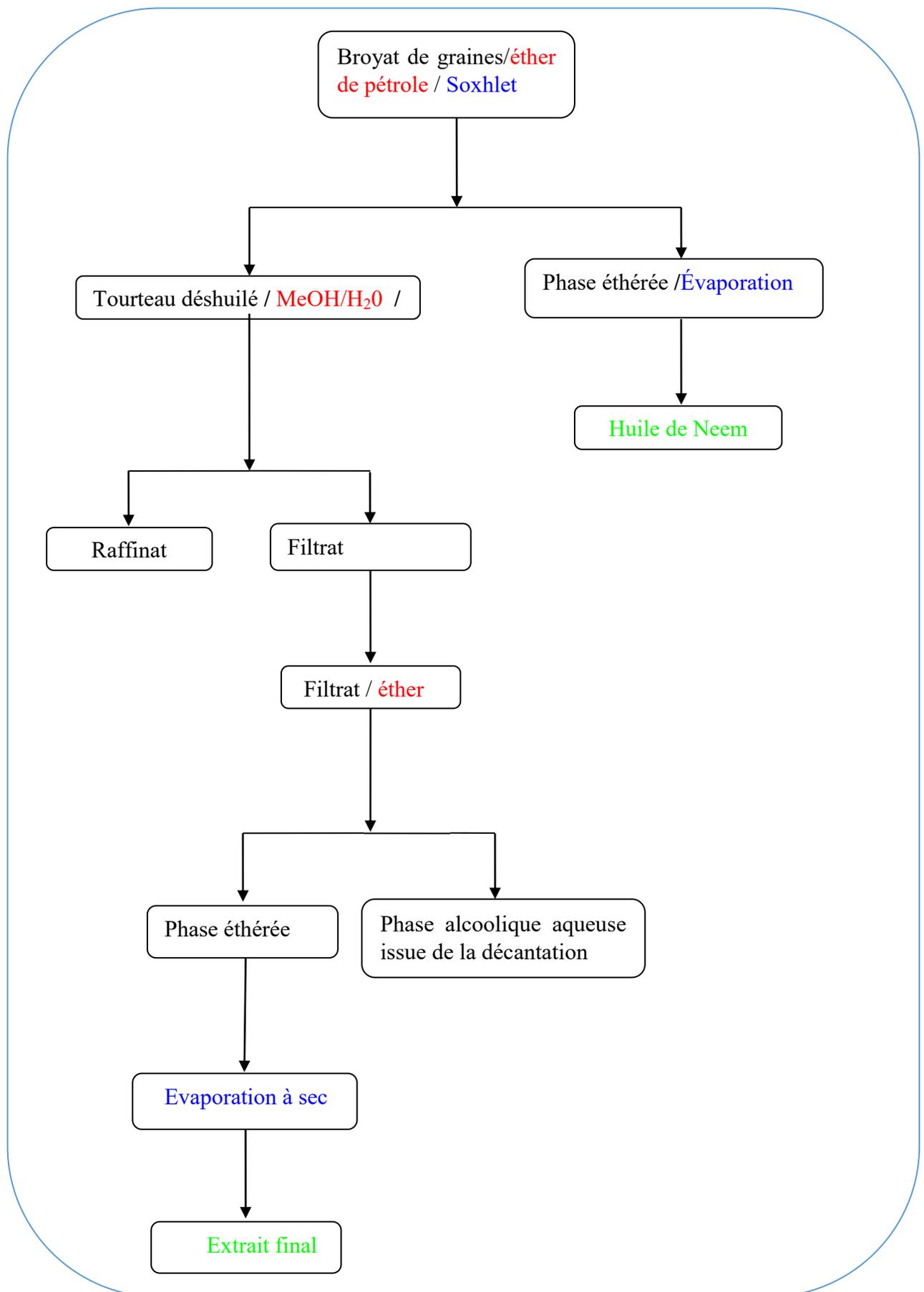
Le concentrat ainsi obtenu de volume  $V_c$  est extrait trois fois avec un volume  $V$  ( $V = 2 V_c$ ) double de MTBE. Les phases étherées sont regroupées et séchées sur  $MgSO_4$ . Des rendements allant de 0.1 à 0.9 % sont obtenus selon la maturité et le mode de séchage des fruits extraits.

$$R_{ext.} = 100x \frac{M_{azatech}}{M_a}$$

$R_{ext.}$  : Rendement d'extraction de l'azadirachtine technique,

$M_{azatech}$  : Masse d'azadirachtine technique extraite,

$M_a$  : Masse amandes broyées.



**Figure 34 :** Schéma du procédé d'extraction

## IV.2.) Dosage de l'Aza-A

### IV.2.1.) Préparation de l'étalon d'Aza-A

L'étalon est préparé en deux étapes de purifications successives de l'extrait technique : la première par chromatographie flash automatisé (biotage) et la seconde par, CLHP préparatrice.

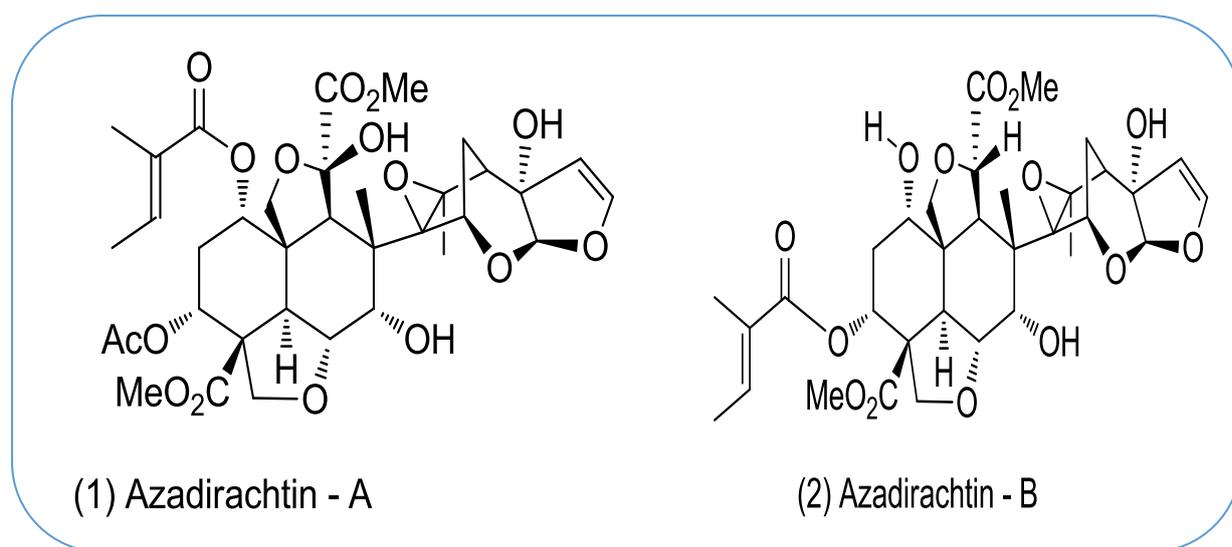
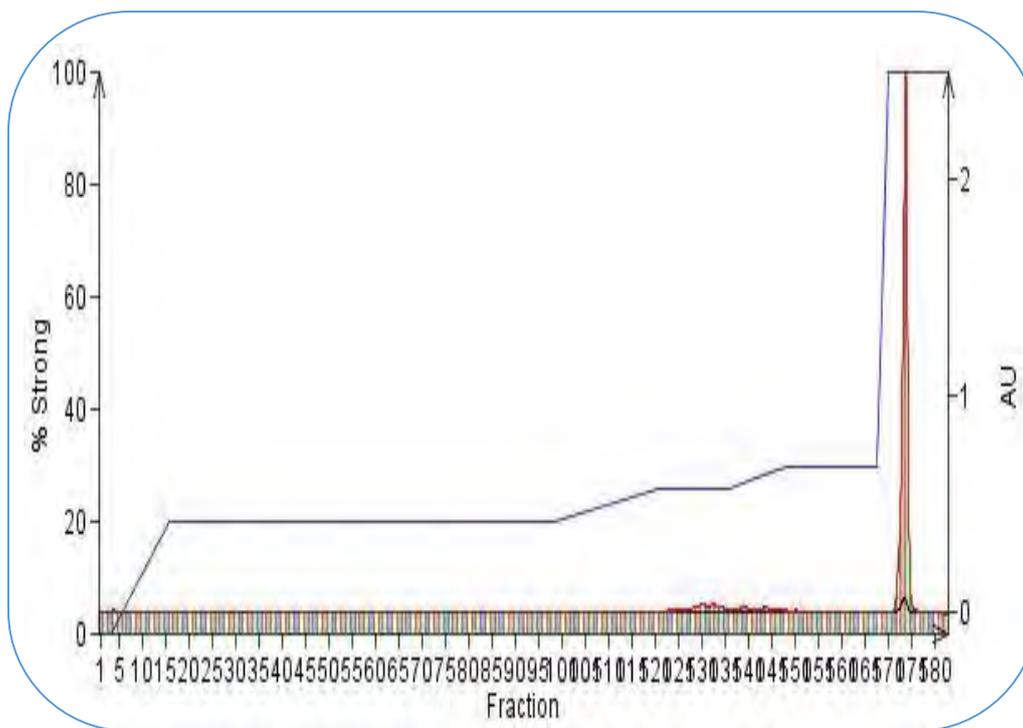


Figure 35 : Structures des deux isomères Aza-A et Aza-B

#### IV.2.1.1.) Purification par chromatographie flash automatisé

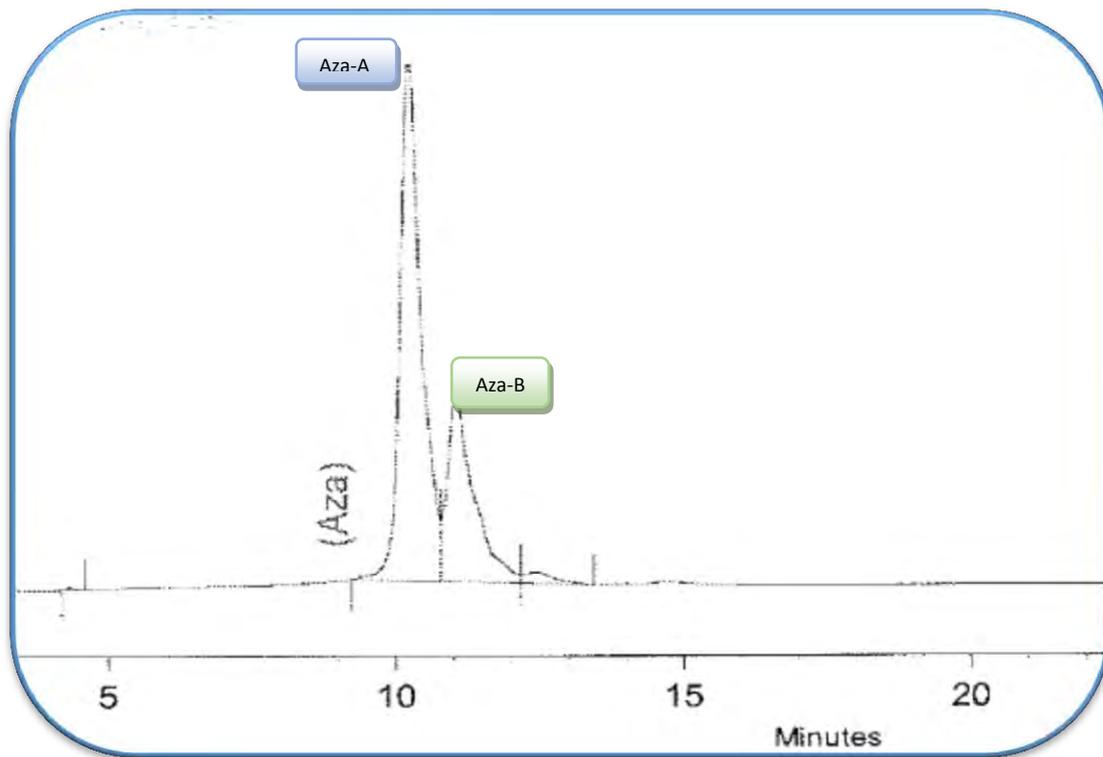
500 mg d'extrait d'azadirachtine technique sont dissouts dans 100 mL d'acétonitrile. La solution est filtrée sur filtre seringue (0.45  $\mu$ m) puis déposée à l'aide d'une pipette pasteur en tête de colonne. Les solutés sont élués à un flux constant de 15 mL/min à travers une colonne 12 g KP-C18-HS SNAP Flash Cartridge selon le diagramme d'éluion ci-dessous avec un mélange de solvant acétonitrile/eau.



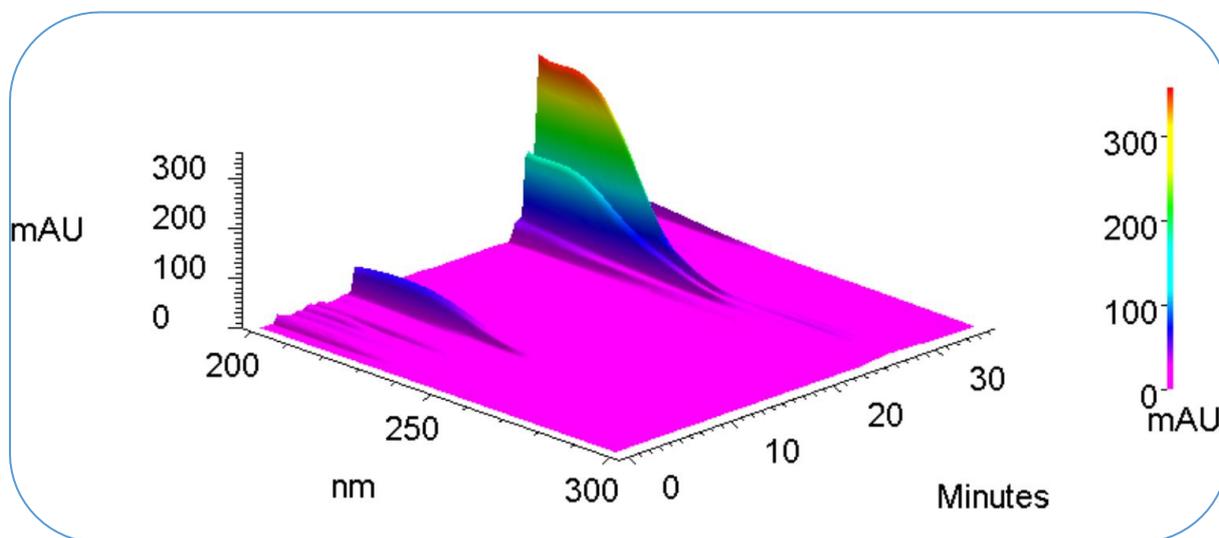
**Figure 36** : Profil du gradient d'élution (en bleu nous avons le pourcentage d'acétonitrile dans le mélange ACN / H<sub>2</sub>O).

Au cours de l'analyse, la phase stationnaire est maintenue à la température ambiante. Au début de l'analyse, la phase mobile contenait 20% de CH<sub>3</sub>CN. Ce rapport est conservé pendant 30CV (volume colonne), qui correspondent à 450 ml de mélange de solvants, puis évolue progressivement pendant 15CV pour atteindre 30%. Ce rapport (30%) est maintenu pendant 10CV. Ainsi pour rincer la colonne nous sommes passés à 100% CH<sub>3</sub>CN pendant 5CV. La longueur d'onde de détection est fixée à 214 nm.

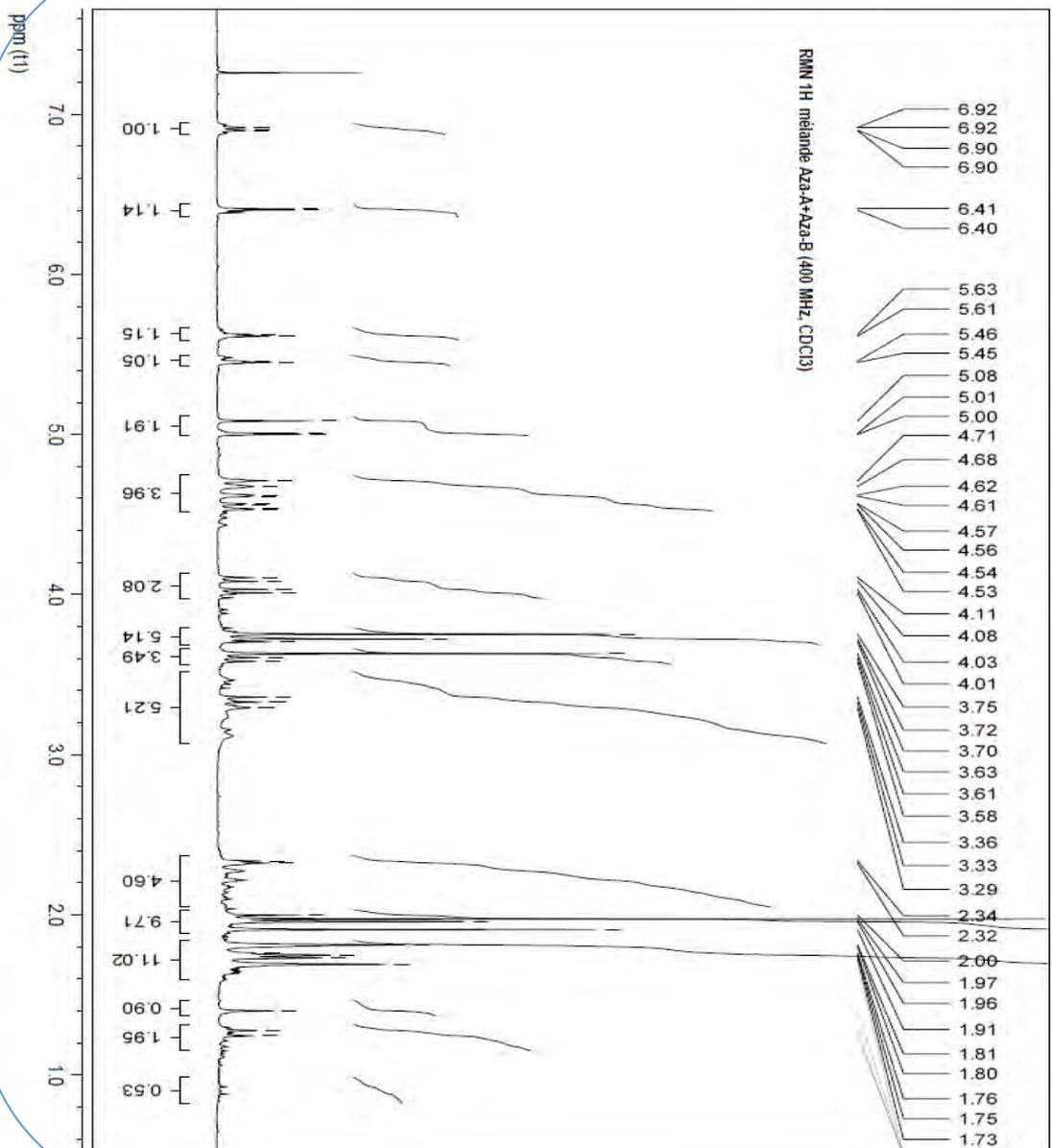
Dans chaque tube des volumes de 10 ml sont collectés. Huit racks de 24 tubes ont été remplis au total. Grâce au détecteur UV de l'appareil les tubes contenant l'Aza-A (fraction F<sub>10</sub> à F<sub>24</sub> du sixième rack) sont identifiés et regroupés. Après évaporation à sec du solvant le résidu solide est pesé et dissout dans l'acétonitrile (CH<sub>3</sub>CN) à la concentration de 1 mg/mL. L'analyse CLHP de cette solution permet d'apprécier la pureté de l'Aza-A obtenu lors de la première étape de la purification au biotage avant de passer à la CLHP préparatrice. Le chromatogramme analytique de l'extrait issu du biotage est donné en **figure 37**.



**Figure 37:** *Chromatogramme du produit de la première purification (biotage)*

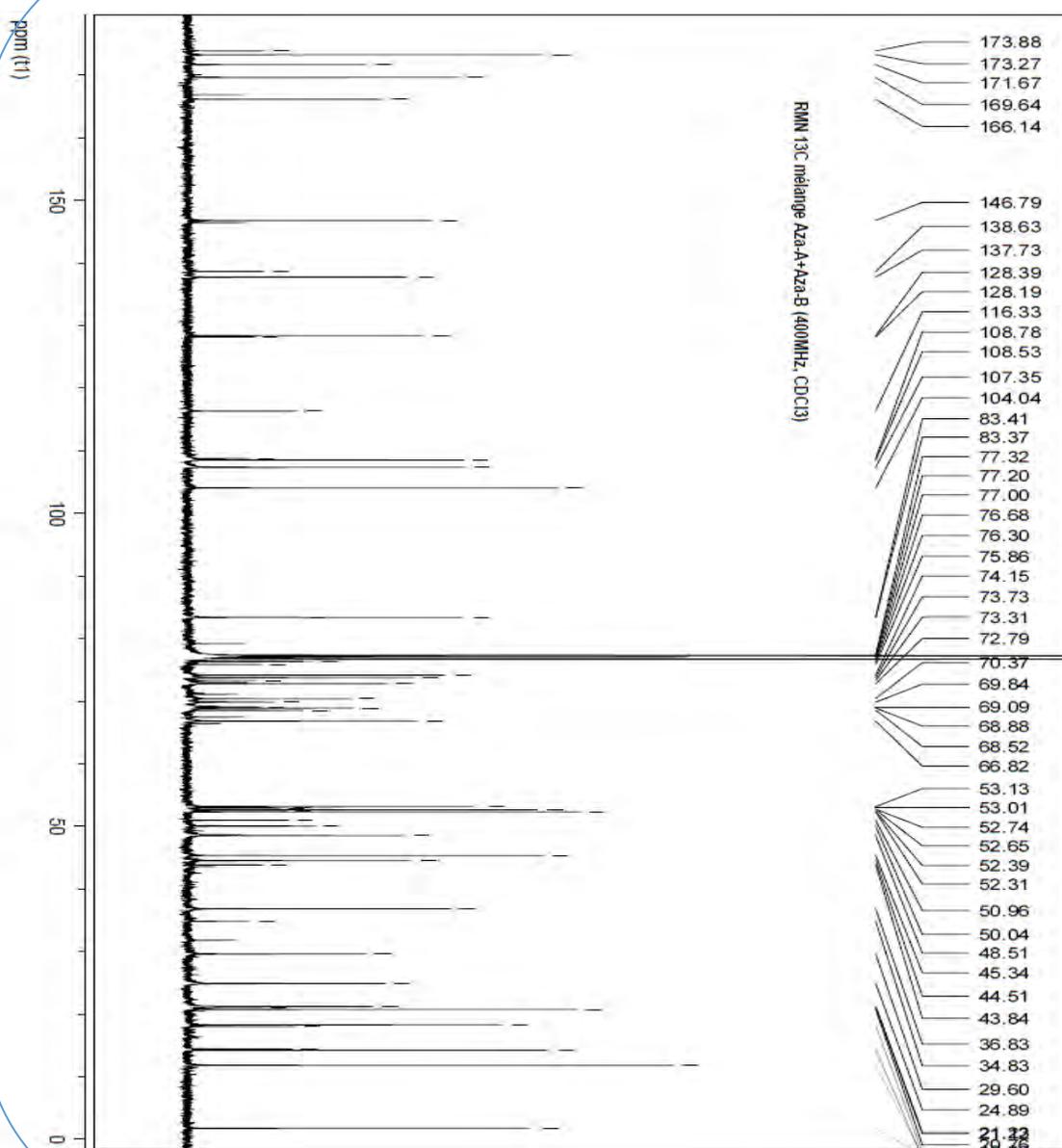


**Figure 38 :** *Chromatogramme en 3D*



**Figure 39:** spectre RMN <sup>1</sup>H du mélange Aza-A et Aza-B (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) issu de la première purification par chromatographie flash automatisé.

**Figure 40:** spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du mélange Aza-A et Aza-B (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) issu de la première purification par chromatographie flash automatisée.

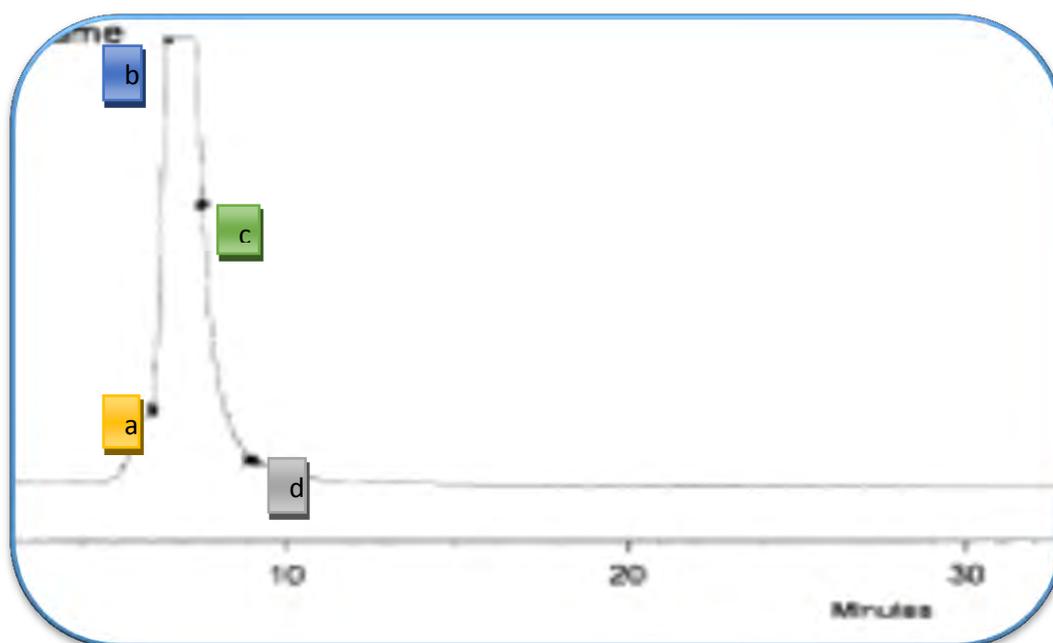


Dans le spectre RMN  $^1\text{H}$ , l'excédent de protons noté dans la zone des aliphatiques vient de l'Aza-B dont la présence dans l'extrait a été bien décelée dans le chromatogramme CLHP analytique **figure 37**.

#### IV.2.1.2.) Purification à la CLHP préparatrice

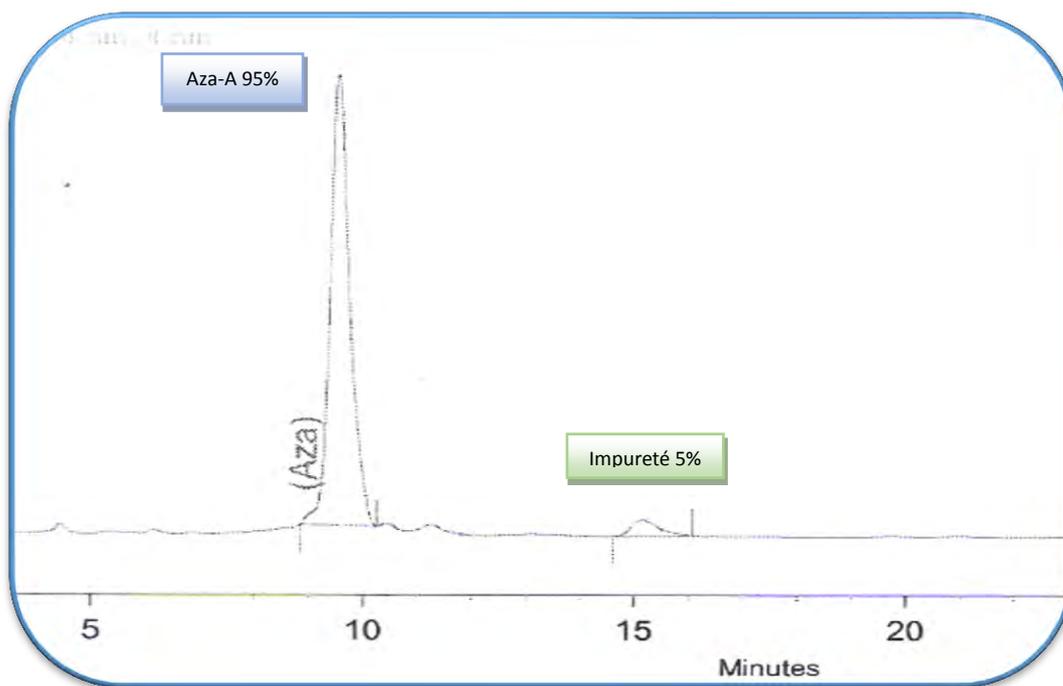
L'extrait issu de la purification au biotage est à nouveau solubilisé dans de l'acétonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) à la concentration de 4.6 mg / mL. La solution est filtrée sur filtre

seringue (0.45  $\mu\text{m}$ ). Un volume de 20  $\mu\text{l}$  est injecté à chaque run. L'élution est faite à travers une colonne Purospher® STAR RP-18e (5  $\mu\text{m}$ , 100-10 mm). La phase mobile est constituée d'un mélange d'acétonitrile-eau dans un rapport 40 : 60. La séparation est faite sur une durée de 55 min. L'Aza-A et l'Aza-B sont élués sous le même pic (assez large) au temps de rétention ( $t_r$ ) de 7 min. Le pic a été fractionné en trois : [ab], [bc] et [cd] (**figure 41**). La première collection est faite entre les points a et b [ab], la seconde entre les point b et c [bc] et la troisième entre les points c et d [cd].

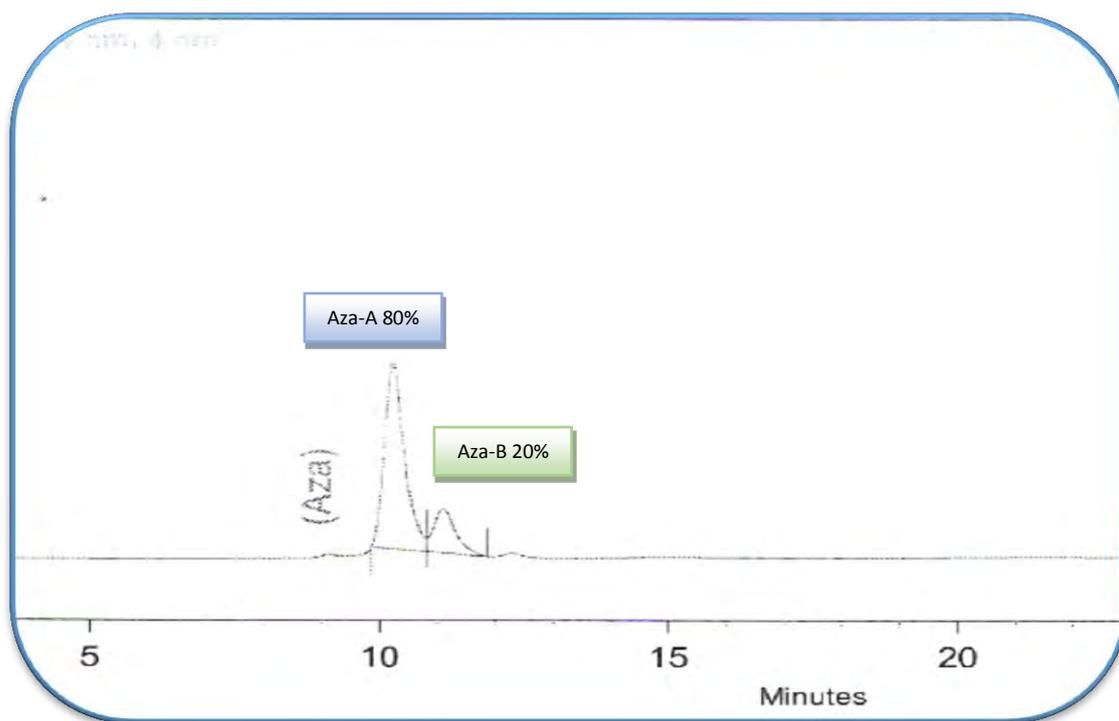


**Figure 41:** Profil CLHP préparatrice du produit de la première purification (biotage)

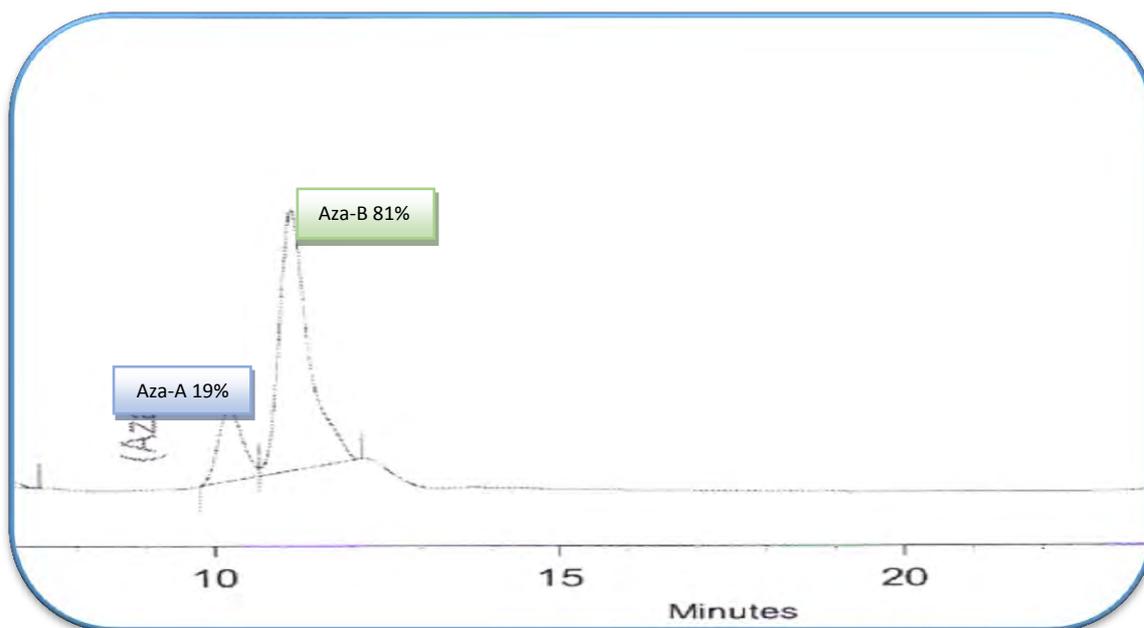
La pureté des différentes fractions a été déterminée par CLHP analytique. Les chromatogrammes sont donnés en **figure 42**.



**a)** Chromatogramme (CLHP analytique) du produit de la première fraction



**b)** Chromatogramme (CLHP analytique) du produit de la deuxième fraction



c) *Chromatogramme (CLHP analytique) du produit de la troisième fraction*

**Figure 43:** *Chromatogrammes (analytiques) des différentes fractions.*

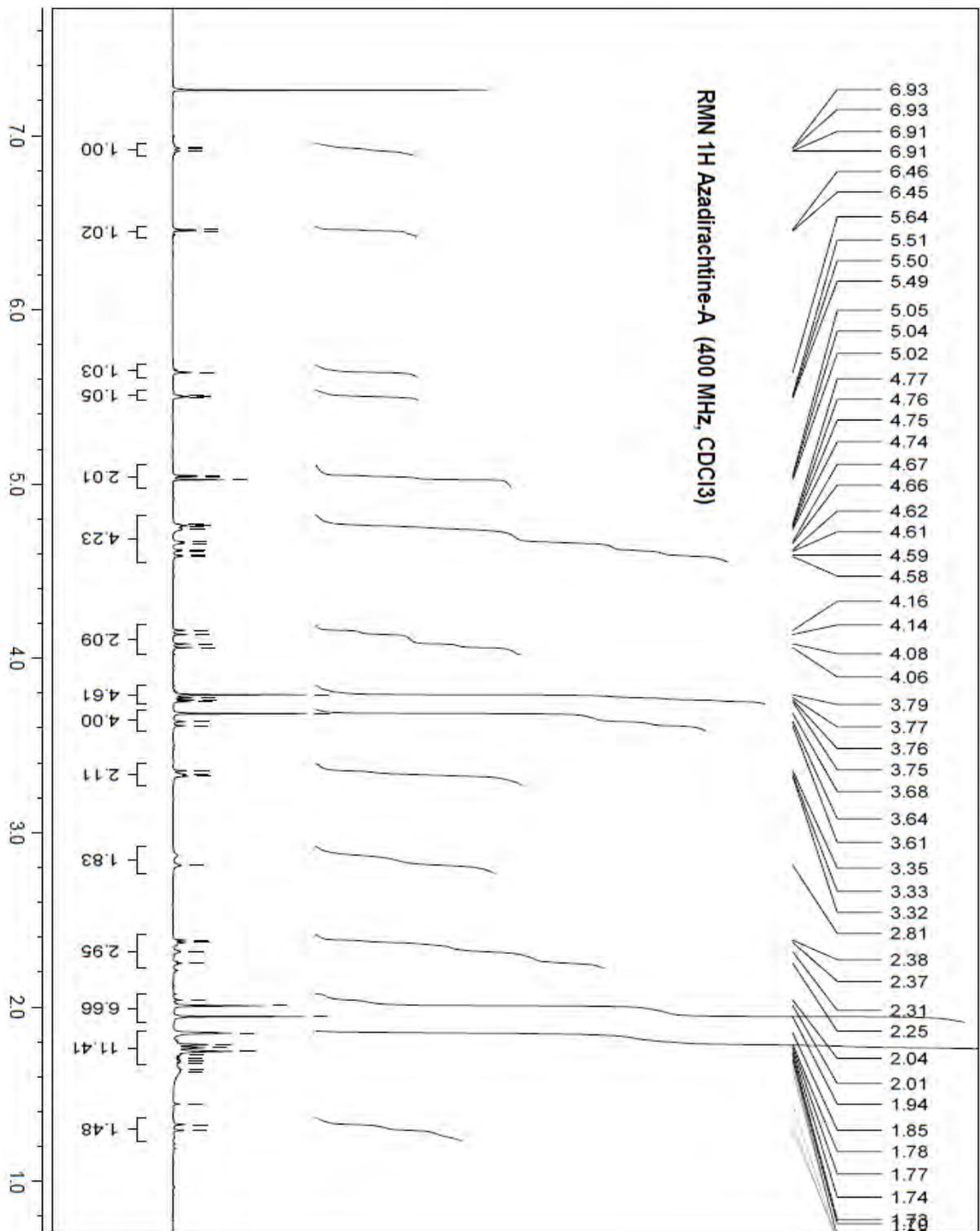
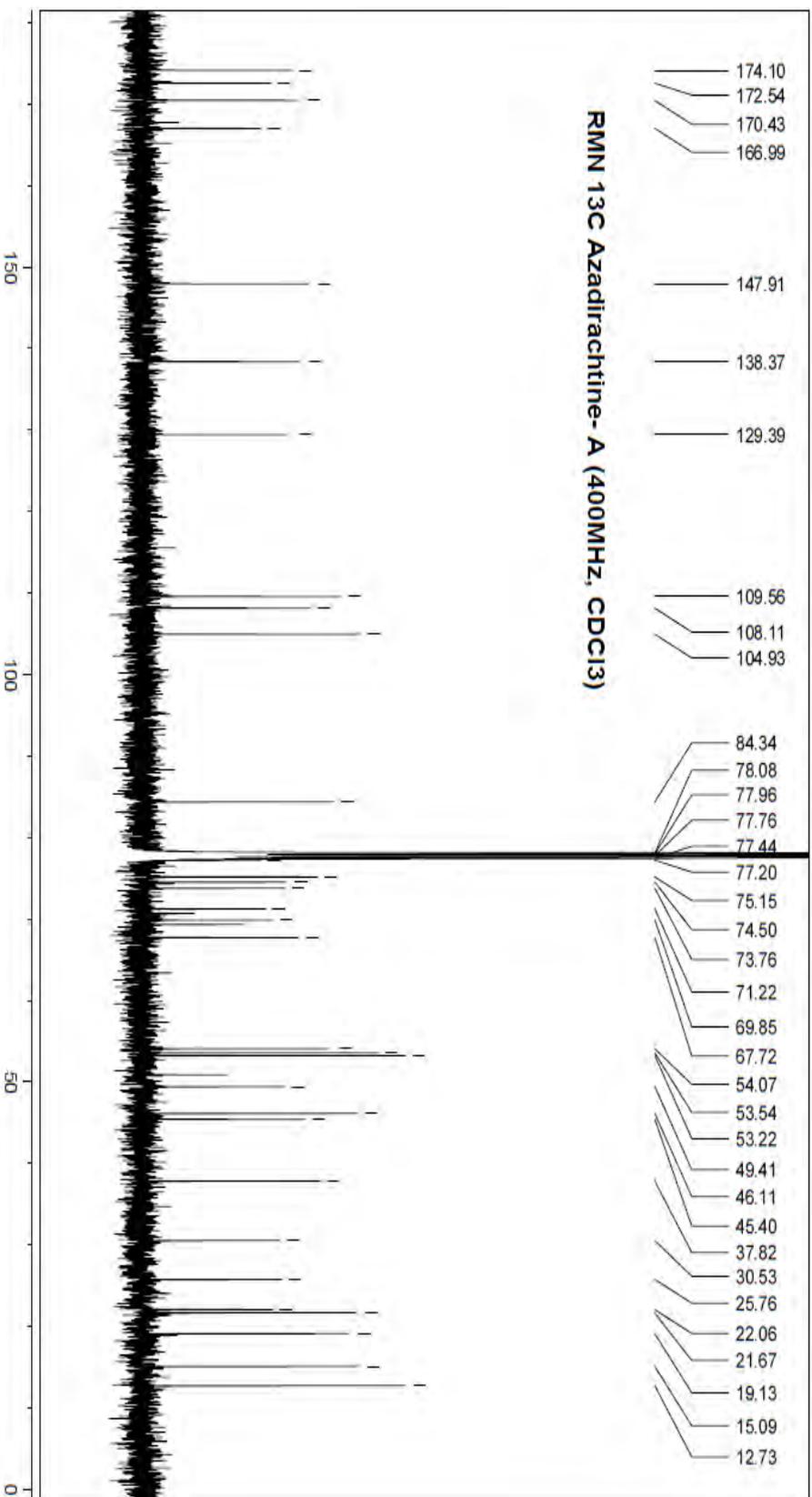


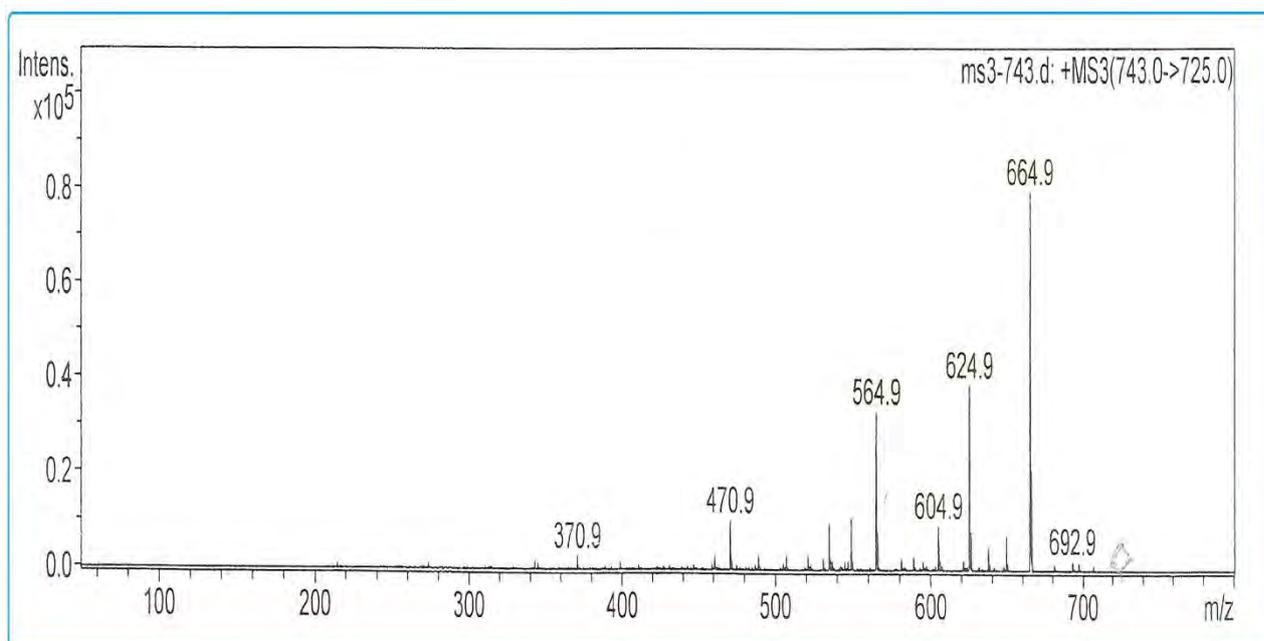
Figure 44: Spectre RMN <sup>1</sup>H de la première fraction : l'Azadirachtine-A (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta_{\text{H}}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 6.93 (1H, q, H-3'), 6.46 (1H, d, H-23), 5.64 (1H, s, H-21), 5.50 (1H, t, H-3), 5.05 (1H, d, H-22), 5.02 (1H, s, OH), 4.76 (1H, t, H-1), 4.74 (1H, d, H-7), 4.67 (1H, d, H-15), 4.61 (1H, dd, H-6), 4.15 (1H, d, H-19), 4.07 (1H, d, H-28), 3.79 (3H, s,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.77 (1H, d, H-28), 3.69 (3H, s,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.63 (1H, d, H-19), 3.35 (1H, d, H-5), 3.34 (1H, s, H-9), 2.84 (1H, s, OH), 2.79 (1H, s, OH), 2.38 (1H, d, H-17), 2.31 (1H, m, H-2), 2.25 (1H, m, H-2), 2.01 (1H, s, 18-Me), 1.94 (3H, s, 3-OAc), 1.85 (3H, s, 5'-Me), 1.78 (3H, d, 4'-Me), 1.76 (1H, m, H-16), 1.74 (3H, s, 30-Me).

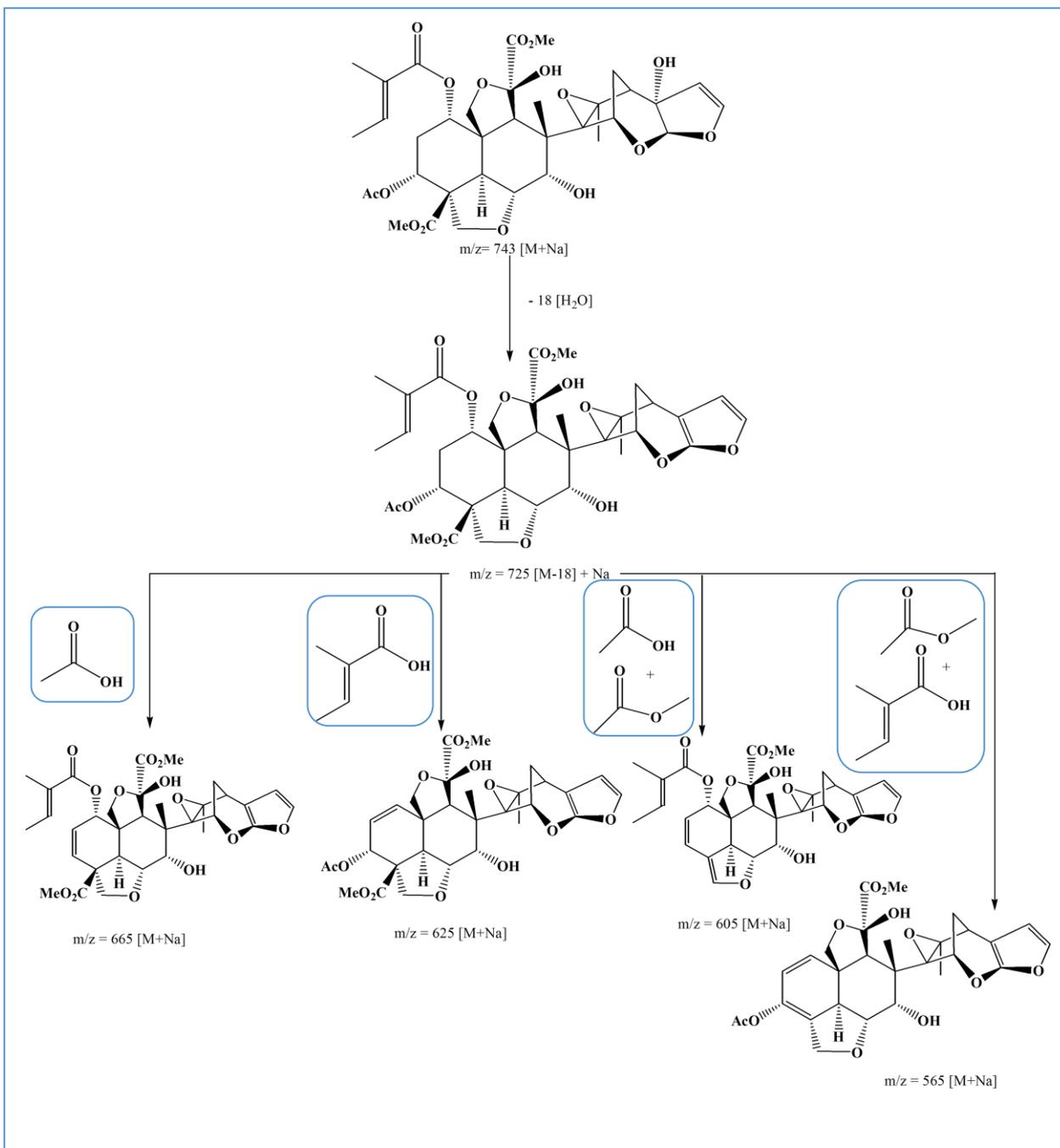


**Figure 45:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la première fraction : l'Aza-A (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

1-) 174.10 (1 C ; (s) ); 2-) 172.54 (1 C ; (s) ); 3-) 170.43 (1C ; (s) ); 4-) 166.99 (1C ; (s) ); 5-) 147.91 (1C ; (s) ); 6-) 136.37 (1 C ; (d)); 7-) 129.39 (1 C ; (s)); 8-) 109.56 (1 C ; (d)); 9-) 106.11 (1 C ; (d)); 10-) 104.93 (1 C ; (s) ); 11-) 84.34 (1 C ; (s) ); 75.15 (1 C ; (d)); 12-) 74.50 (1 C ; (d)); 13-) 73.76 (1 C ; (d)); 14-) 71.22 (1 C ; (t)); 15-) 69.85 (1 C ; (d)); 16-) 67.72 (1 C ; (s) ); 54.07 (1 C ; (t) ); 53.54 (1 C ; (s) ); 17-) 53.22 (1 C ; (d)); 18-) 49.41 (1 C ; (s)); 19-) 46.11 (1 C ; (q) ); 20-) 45.40 (1 C ; (q) ); 21-) 37.82 (1 C ; (s) ); 22-) 30.53 (1 C ; (s)); 23-) 25.76 (1 C ; (d) ); 24-) 22.06 (1 C ; (s)); 25-) 21.67 (1 C ; (d) ); 26-) 19.13 (1 C ; (d) ); 27-) 15.09 (1 C ; (s)); 28-) 12.73 (1 C ; (t)).



**Figure 46:** *Spectre de masse de l'Aza-A (isolé dans la première fraction)*

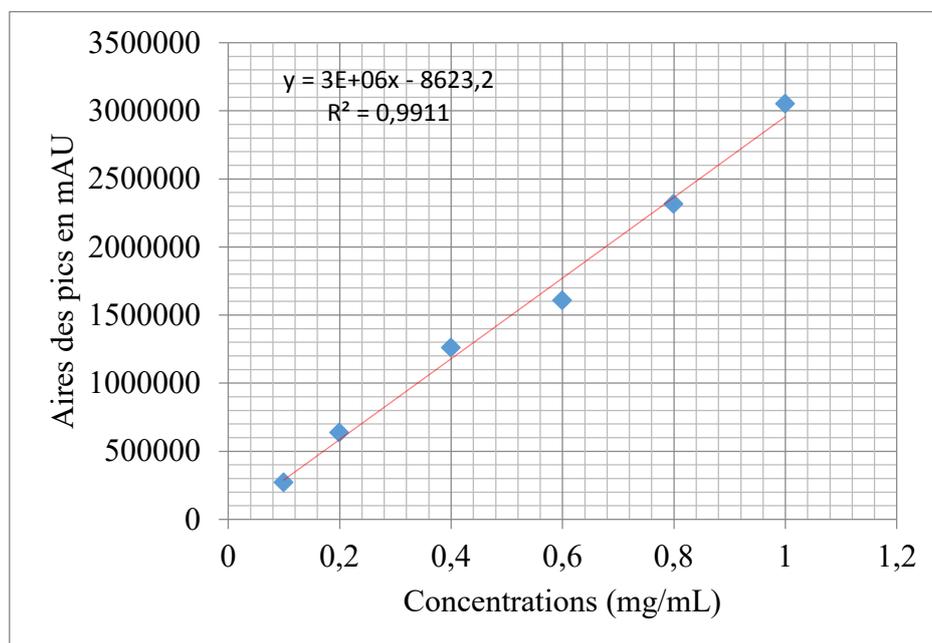


**Figure 47 :** Schéma d'attribution des pics du spectre de masse de l'Aza-A

#### IV.2.2.) Détermination de la droite d'étalonnage.

La droite d'étalonnage, correspondant aux concentrations d'Aza-A en fonction des aires des pics d'éluion, est établie avec six solutions d'Aza-A (95%) avec des concentrations allant de 0.1 à 1 mg/mL.

Chaque solution de concentration donnée est injectée trois fois ; la moyenne des surfaces des pics est calculée pour tracer la droite des aires en fonction des concentrations (**figure 48**).



**Figure 48** : Droite d'étalonnage

#### IV.2.3.) Autres méthodes de purifications tentées :

Les spectres RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) faits dans cette partie de la purification n'ont pas fait l'objet d'interprétation. L'objet des analyses étaient de pouvoir apprécier la pureté de l'extrait final ; en comparant ces spectres à ceux de l'étalon dont tous les signaux ont été attribués.

##### IV.2.3.1.) La méthode par précipitation<sup>140</sup>

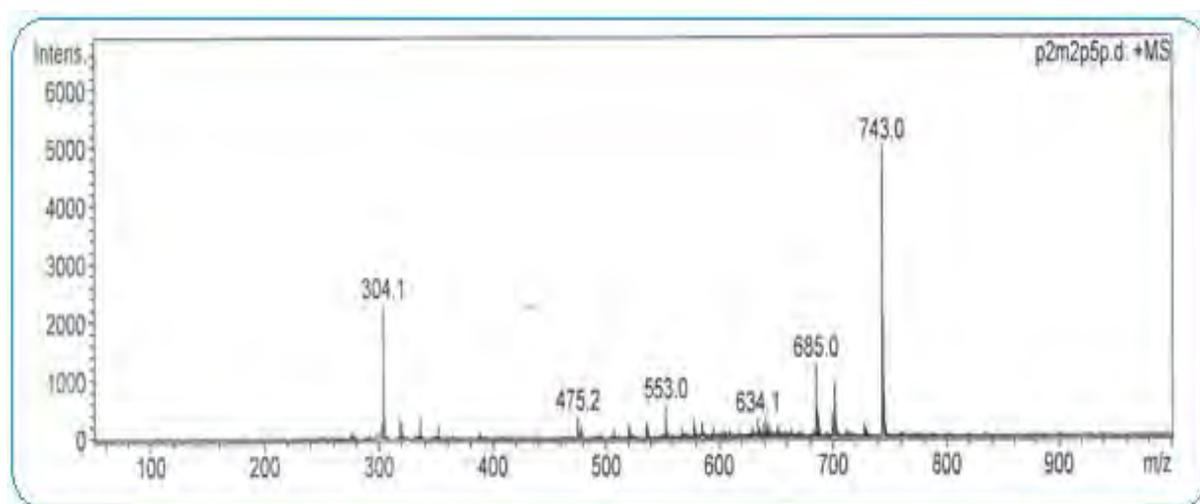
1 g de l'azadirachtine technique issu de l'extraction sur pilote est placé dans une erlenmeyer de 100 ml puis solubilisé dans 5 ml d'acétate d'éthyl avant d'ajouter 40 ml de

<sup>140</sup> Sharma V. ; Walia S. ; Kumar J. ; Nair M. G. and Parmar B. S.; An Efficient Methode for the purification and characterization of Nematicial Azadiractins A, B, and H using MPLC and ESIMS, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3966-3972.

n-hexane. Il se forme un précipité blanc récupéré par filtration sur papier filtre. Le processus est repris cinq fois.

Le précipité final (le produit purifié) est analysé en premier lieu par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) avec comme éluant un mélange DCM / MeOH (19 : 1). Un seul spot a été observé après révélation des plaques avec du Para-anisaldehyde.

La spectrométrie de masse effectuée en mode positif sur le produit purifié donne un pic de base  $m/z = 743$  qui correspond à la masse de l'Aza-A accompagné d'un ion de  $\text{Na}^+$  venant de l'adduit : le Chlorure de Sodium ( $\text{NaCl}$ ).



**Figure 49** : Spectre de masse du produit de la précipitation

L'analyse RMN du proton ( $^1\text{H}$ ) et du carbone ( $^{13}\text{C}$ ) a donné respectivement les spectres des **figures 50** et **51**. Dans celui du proton nous observons dans la zone des protons aliphatiques un excès de protons. Ce qui montre que la pureté du produit de la purification n'est pas maximale et n'est pas utilisable pour servir d'étalon de dosage.

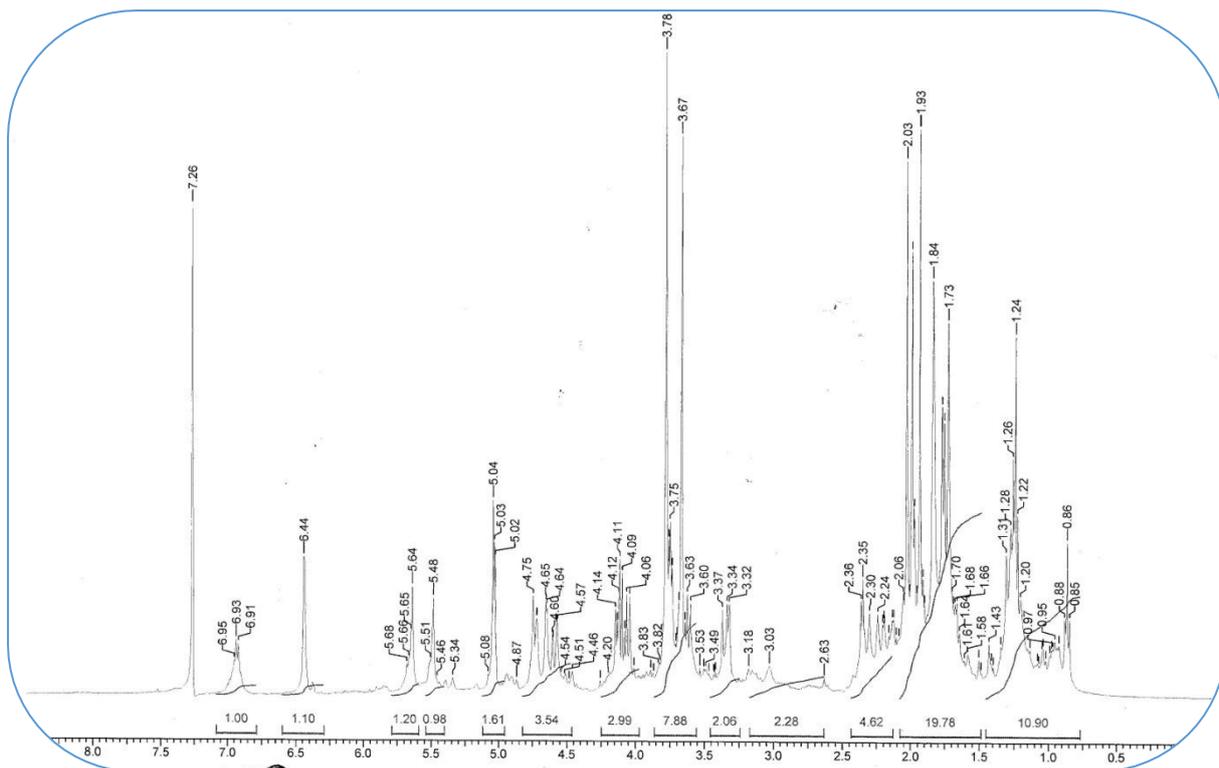


Figure 50 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) du produit de la précipitation

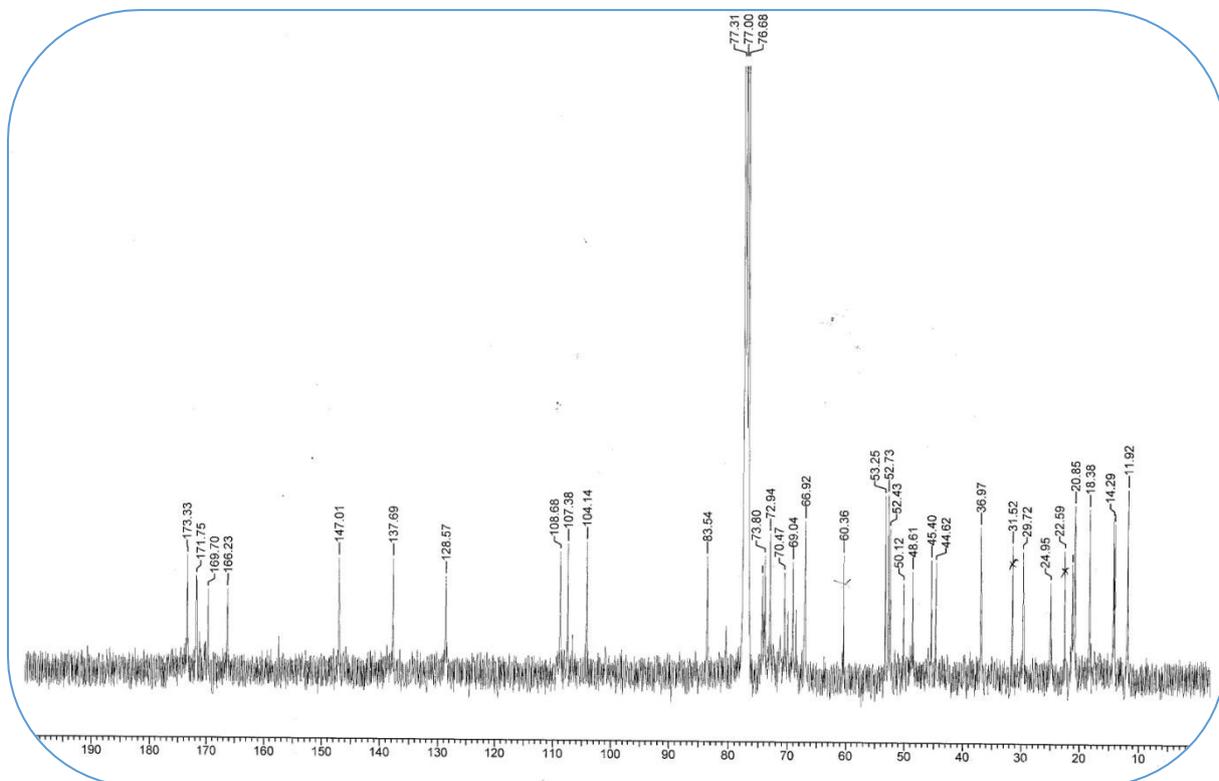


Figure 51 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) du produit de la précipitation.

#### IV.2.3.2.) Purification sur colonne de micro-silice

Cette méthode portait sur 1 g d'extrait déjà purifié par précipitation. La phase stationnaire constituée de micro-silice ; nous avons utilisé respectivement deux mélanges de solvants AcOEt/n-Hex au ratio (1 :1) et au ratio (6 :4) pour éluer les composés de l'extrait à purifier. Pour chaque mélange de solvant un extrait purifié a été collecté. Les analyses RMN des extraits collectés sont données dans les **figures 52, 53 et 54**.

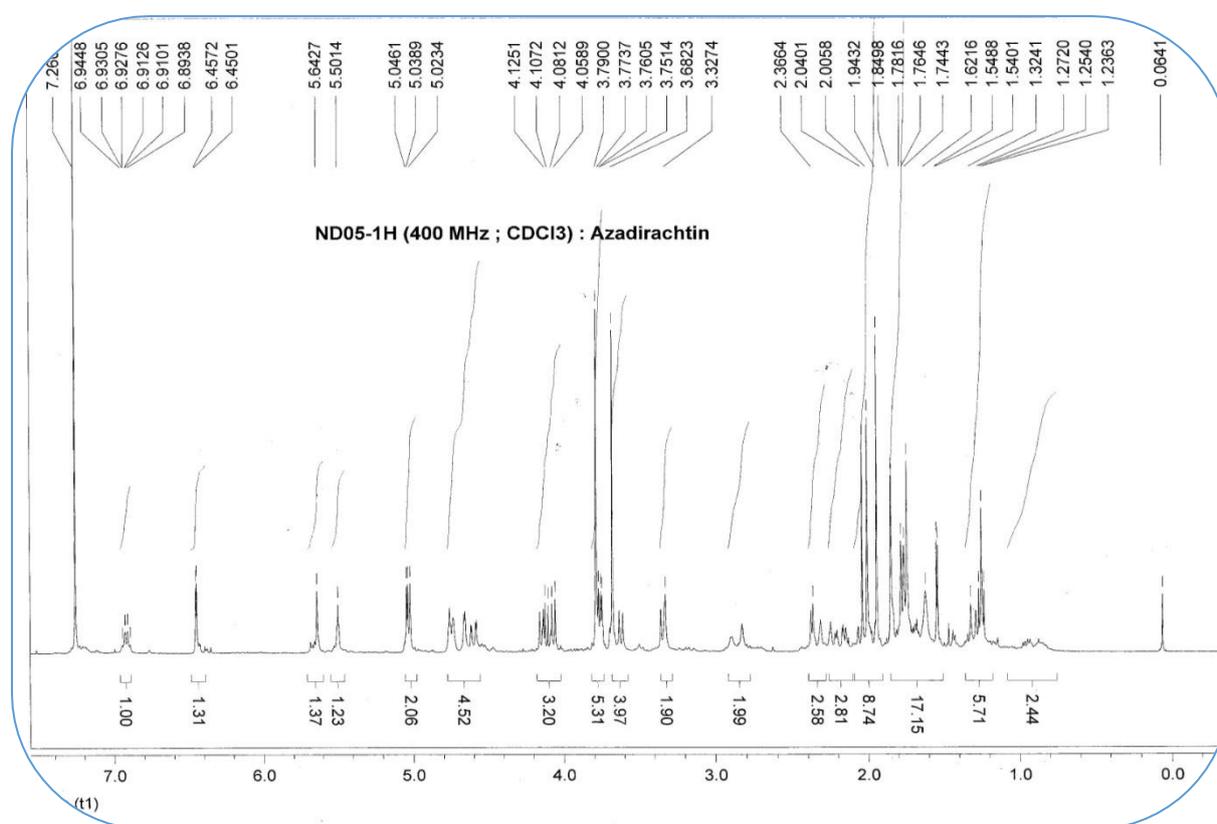


Figure 52 : Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz ; CDCl<sub>3</sub>) de l'extrait purifié (1 :1)

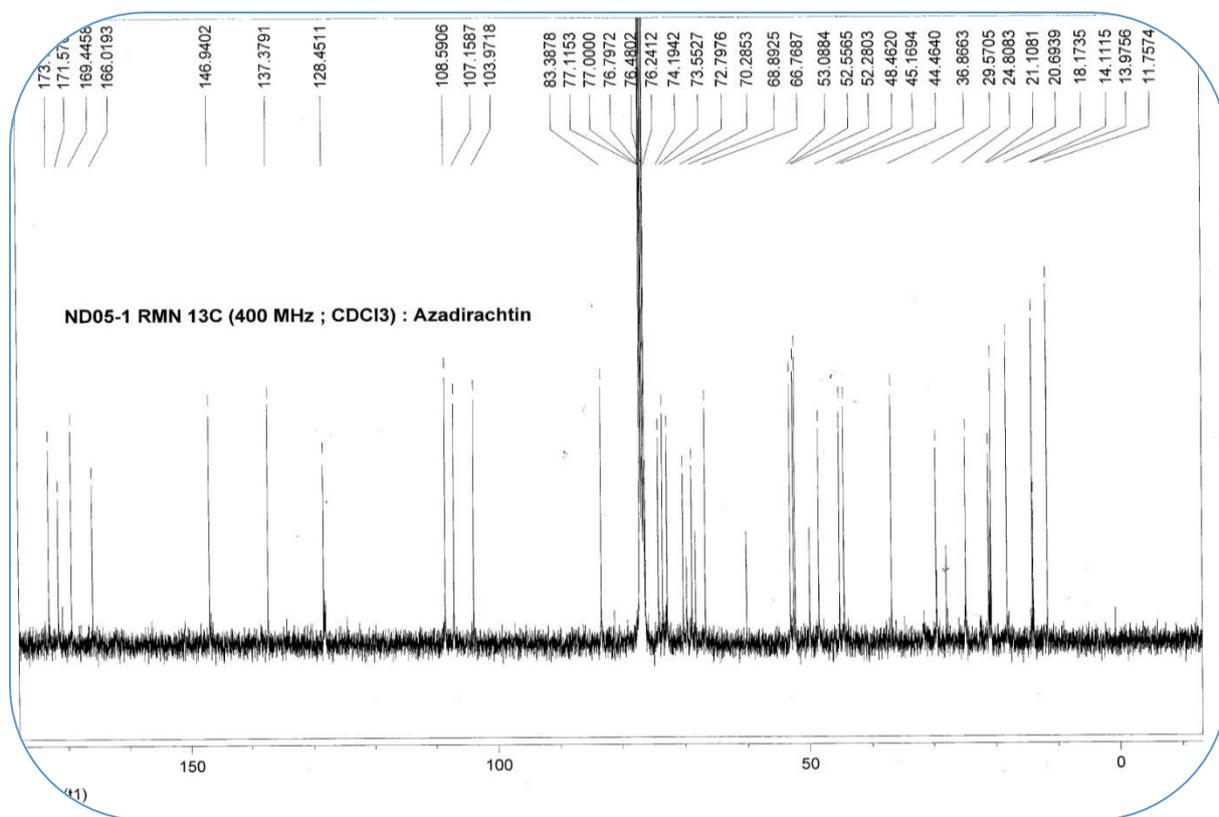


Figure 53 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) de l'extrait purifié (1 :1)

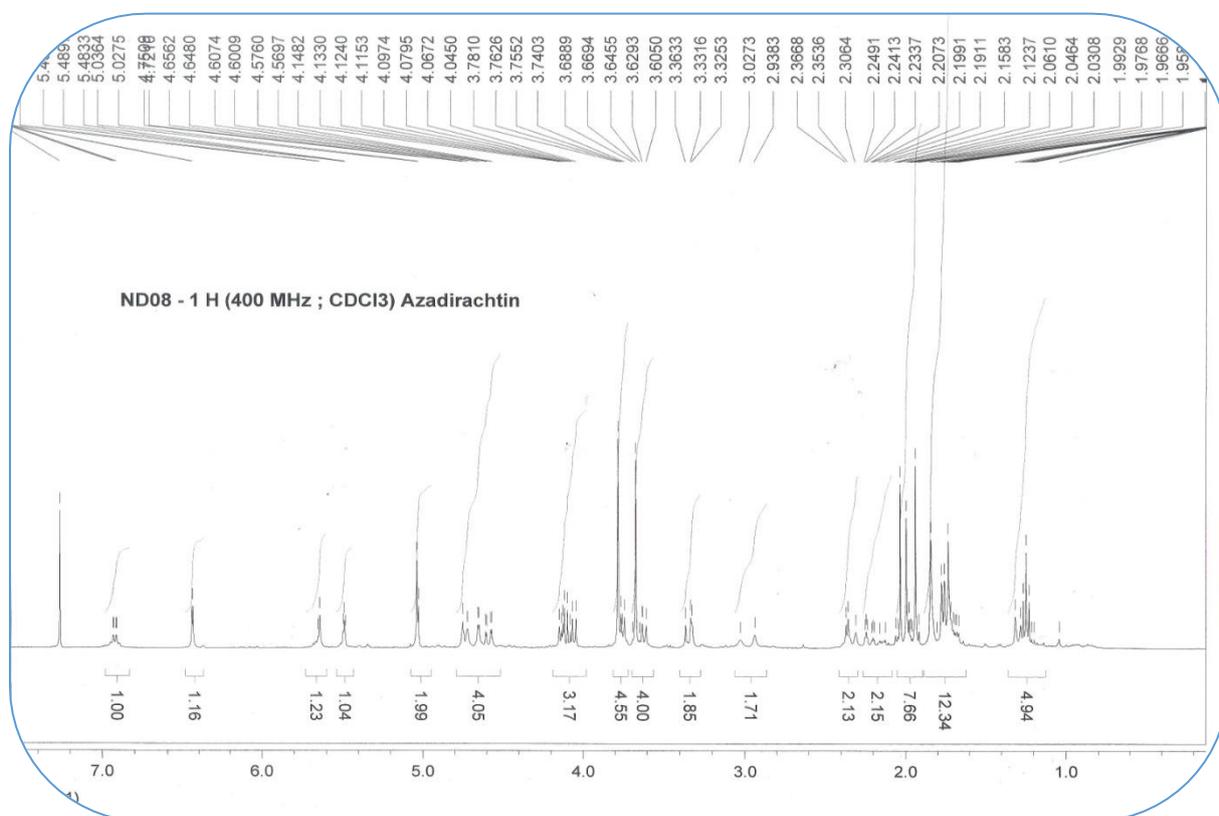
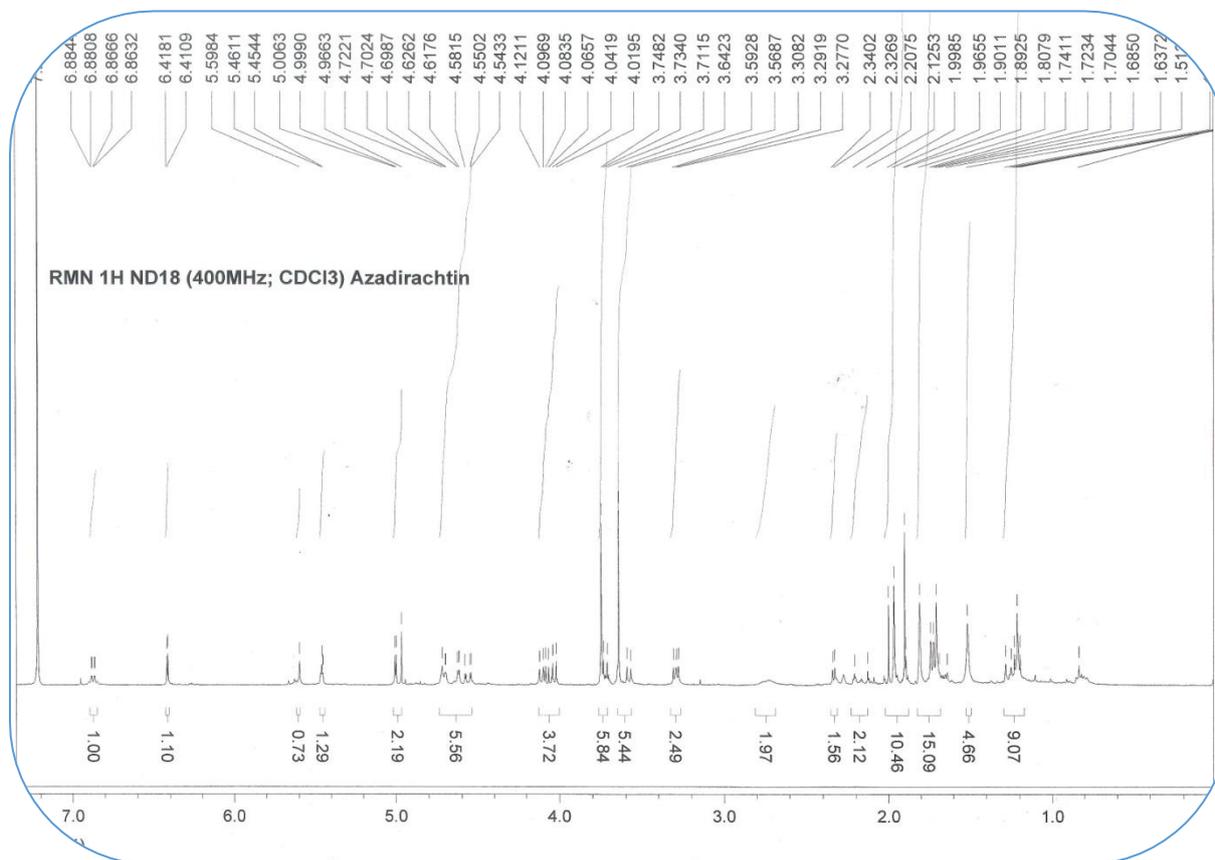


Figure 54 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) de l'extrait purifié (6 :4)

L'extrait ND08, dont le spectre RMN  $^1\text{H}$  est donné en **figure 54**, a été repris dans une seconde colonne de micro-silice et élué avec un mélange acétate d'éthyle / n- hexane (8 :2). Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de l'extrait de la seconde purification (ND18) est donné en **figure 55**. Le point de fusion de l'extrait est de  $150,3^\circ\text{C}$  soit  $0,3^\circ\text{C}$  de plus que celle de l'Aza-A pure.



**Figure 55** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) de l'extrait de la seconde purification

#### IV.2.3.3.) Purification par recristallisation

Méthode peu adaptée dans cette étude du fait de l'instabilité de la molécule d'intérêt (Aza-A) à chaud et en solution ; mais nous avons jugé nécessaire de tenter la méthode car l'objectif premier de cette purification n'est pas d'avoir un rendement de purification élevé mais plutôt une pureté maximale du produit final même si le rendement est faible.

127,5 mg de l'extrait technique, issu de l'extraction sur pilote, sont portés à reflux pendant 10 minutes dans du tétrachlorométhane ( $\text{CCl}_4$ ) à  $150^\circ\text{C}$ . 11,1 mg de produit purifié ont été

récupérés soit un rendement de purification de 8,71 %. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure 56) de cet extrait purifié ND10 donne un spectre de l'Aza-A dégradé.

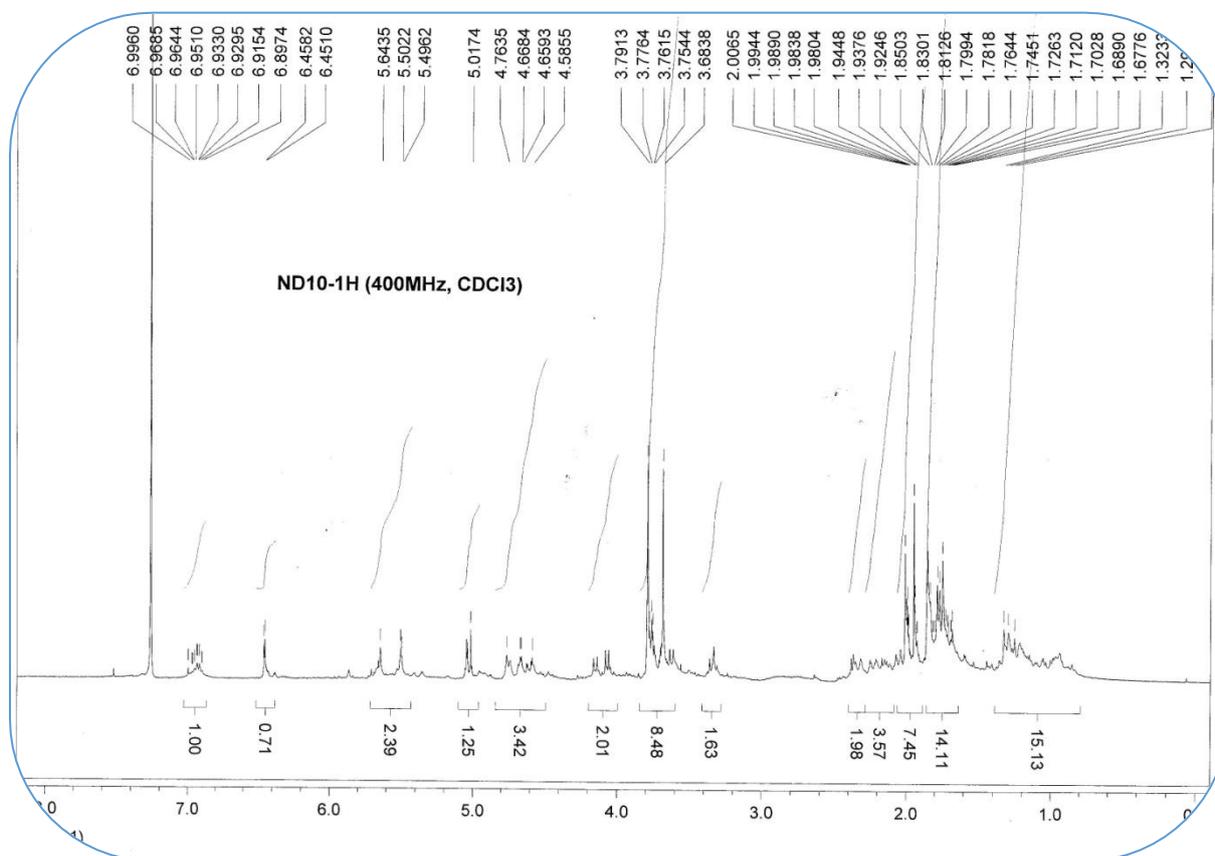


Figure 56 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) du produit de la recrystallisation

#### IV.2.4.) Résultats des dosages de l'Aza-A pour les différentes régions de collectes

##### IV.2.4.1.) La région de Dakar

Tableau 18 : les résultats d'extraction des fruits mûrs de neem de Dakar

	Mode de séchage	
	Ombre	Soleil
% d'Aza-A dans l'extrait technique	39.06	54.18
% d'Aza-A dans les amandes	0.5	0.4
Rendement d'extraction	0.90	0.50

#### IV.2.4.2.) La région de Thiès (Commune de Tivaoune)

**Tableau 19 :** *les résultats des extractions des fruits de neem de Tivaoune*

Types de fruits	% Aza-A dans l'extrait technique	% Aza-A dans les amandes	Rendement d'extraction
Fnm/O	50.77	0.5	1.16
Fmr	40.07	0.4	1.18

#### IV.2.4.3.) La région de Diourbel

**Tableau 20 :** *les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Diourbel*

Types de fruits	% Aza-A dans l'extrait technique	% Aza-A dans les amandes	Rendement d'extraction
Fnm/O	30.47	0.2	0.61
Fmc/O	31.33	0.2	0.82

**Tableau 21 :** *les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Touba*

Types de fruits	% Aza-A dans l'extrait technique	% Aza-A dans les amandes	Rendement d'extraction
Fnm/O	30.36	0.2	1.12
Fmc/O	26.88	0.2	0.94
Fmr	33.97	0.1	0.89

#### IV.2.4.4.) La région de Louga

**Tableau 22 :** *les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Ndande*

Types de fruits	% Aza-A dans l'extrait technique	% Aza-A dans les amandes	Rendement d'extraction
Fnm/O	24.32	0.2	1.00
Fmr	31.20	0.2	1.43

#### IV.2.4.5.) La région de Matam

**Tableau 23 :** les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Nabadji Civol.

Types de fruits	% Aza-A dans l'extrait technique	% Aza-A dans les amandes	Rendement d'extraction
Fnm/O	24.45	0.2	0.89
Fnm/S	31.22	0.2	0.62
Fmr	--	--	0.75

#### IV.2.4.6.) La région de Kaolack

**Tableau 24 :** les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Kayemor

Types de fruits	% Aza-A dans l'extrait technique	% Aza-A dans les amandes	Rendement d'extraction
Fmr	11.35	0.04	0.61

#### IV.2.4.7.) La région de Tambacounda

**Tableau 25:** les résultats des extractions des fruits de neem de la commune de Backel

Types de fruits	% Aza-A dans l'extrait technique	% Aza-A dans les amandes	Rendement d'extraction
Fmr	16.71	0.1	1.20

#### IV.2.4.8.) Analyse des résultats des dosages de l'Aza-A pour les différentes régions de collectes

##### ❖ Choix du mode séchage

Les résultats du dosage de l'Aza-A montrent que le **mode de séchage** au soleil ou à l'ombre a un impact sur la teneur en Aza-A dans les amandes de neem lorsque les fruits sont cueillis à l'état mûr. Pour une bonne conservation de la teneur en Aza-A dans les amandes le séchage à l'ombre reste le meilleur (0.5 % contre 0.4 %) voir **tableau 18**. Par contre lorsqu'ils sont cueillis à l'état non mûr aucune perte n'est notée sur la teneur en Aza-A dans les amandes 0.2 % voir (**tableau 23**).

Par contre en ce qui concerne le pourcentage d'Aza-A dans les extraits techniques le séchage au soleil reste le meilleur quelque soit l'état de maturité des fruits (**tableau 18 et 23**). La différence de teneur est de l'ordre de 6 % pour les fruits non mûrs (**Fnm**) et de 15 % pour les fruits mûrs (**Fmc**).

Cette différence pourrait se justifier par la teneur importante en huile dans les fruits mûrs. Une partie de l'Aza-A peut passer dans l'huile de l'amande au moment de l'extraction. Ce qui n'est pas le cas pour les fruits non mûrs dont la teneur en huile reste inférieure à celle des fruits mûrs.

Une hausse de la teneur en huile dans le fruit entraîne une baisse de la teneur en Aza-A dans le tourteau. Ce passage de l'Aza-A du tourteau vers l'huile diminue la teneur en Aza-A dans l'extrait technique issu de l'extraction du tourteau délipidé.

#### ❖ **Choix du stade de cueillette des fruits (état de maturité)**

L'**état de maturité** des fruits, défini par la couleur de la pulpe (couleur verte fruits non mûrs et couleur jaune fruits mûrs), n'affiche pas une différence significative sur la teneur en Aza-A dans les amandes lorsque les fruits sont cueillis. Pour les fruits ramassés nous notons une baisse de 0.1 % de la teneur en Aza-A (**tableau 21**). Cette baisse peut s'expliquer de deux manières : l'une par une possible dégradation de la molécule et l'autre part par un passage progressif de la molécule dans l'huile de neem qui se forme. Les résultats montrent que les fruits mûrs ramassés renferment plus d'huile.

La deuxième explication est consolidée par les résultats de l'extraction de l'Aza-A dans les huiles de neem. Une teneur de 13.14 % en Aza-A dans les extraits techniques est obtenue. Ces résultats prouvent que l'Aza-A est présent dans l'huile de neem. Selon Kaushik et al 8 à 33 % de l'Aza-A des amandes passent dans l'huile au moment de la délipidation<sup>141</sup>. L'extraction de l'Aza-A dans l'huile se fait avec de bons rendements de l'ordre de 0.45 %.

### **IV.3.) Influence de la granulométrie sur les rendements d'extraction en Aza-A**

#### **IV.3.1.) Répartition granulométrique**

---

<sup>141</sup> Kaushik N. Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC, *Anal Bioanal Chem.* **2002**, 374, 1199-1204.

La répartition granulométrique est effectuée sur tamis normalisés (NORME AFNOR NF-X-11-504, monture et toile en acier 18/8) avec des trous de diamètres (d) variable (0.5 mm à 2 mm). L'étude comparative de la granulométrie porte sur cinq catégories dont les tailles sont données dans le **tableau 26**.



**Photo 12 :** *Tamis normalisés (NORME AFNOR NF-X-11-504)*

**Tableau 26 :** *répartition granulométrique du broyat*

Classes de granulométries	A	B	C	D	E
Tailles grains (mm)	$0.5 < d < 1$	$1 \leq d < 1.25$	$1.25 \leq d < 1.6$	$1.6 \leq d < 2$	$d \geq 2$
% dans le mélange	9.92	6.19	14.61	16.28	47.69

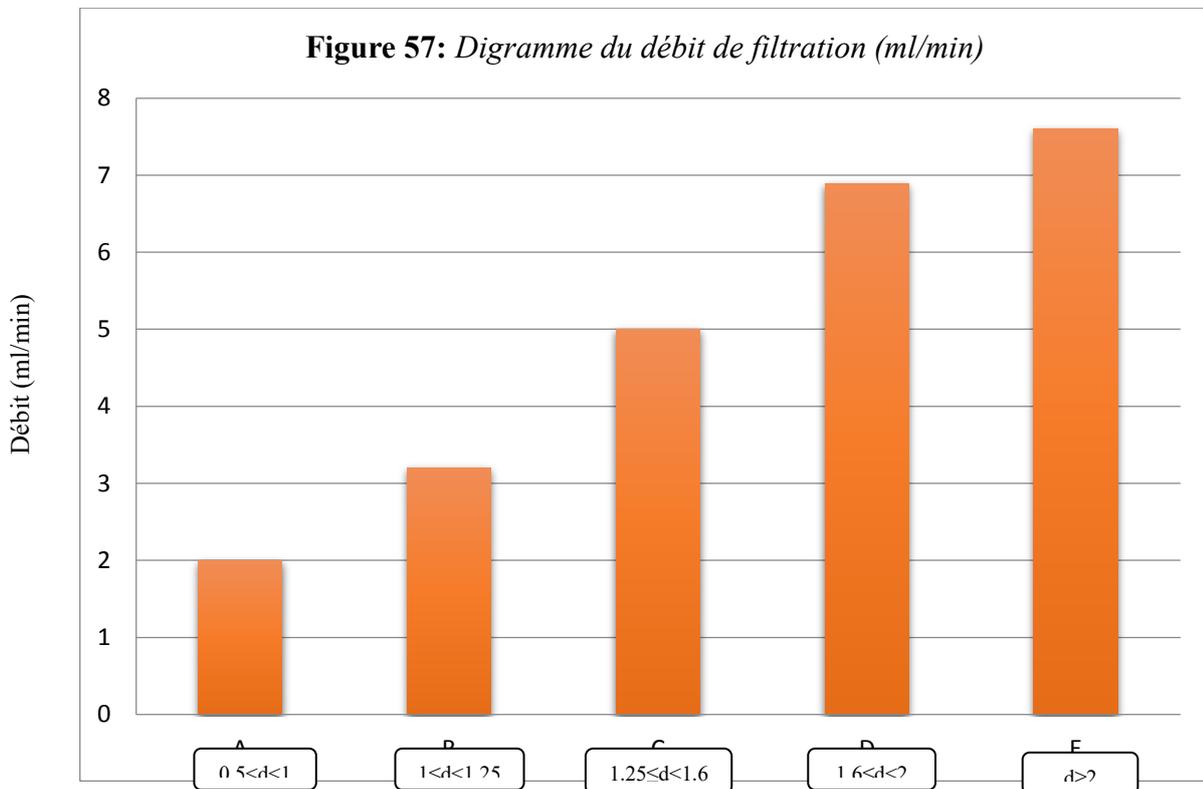
### IV.3.2.) Extraction et quantification de l'Aza-A

Sur les cinq catégories, la méthode d'extraction reste la même. Elle est décrite dans le paragraphe IV.1.3.2. La méthode d'analyse CLHP des extraits techniques est identique à celle décrite au paragraphe VII.3.

#### IV.3.2.1.) Résultats de l'extraction

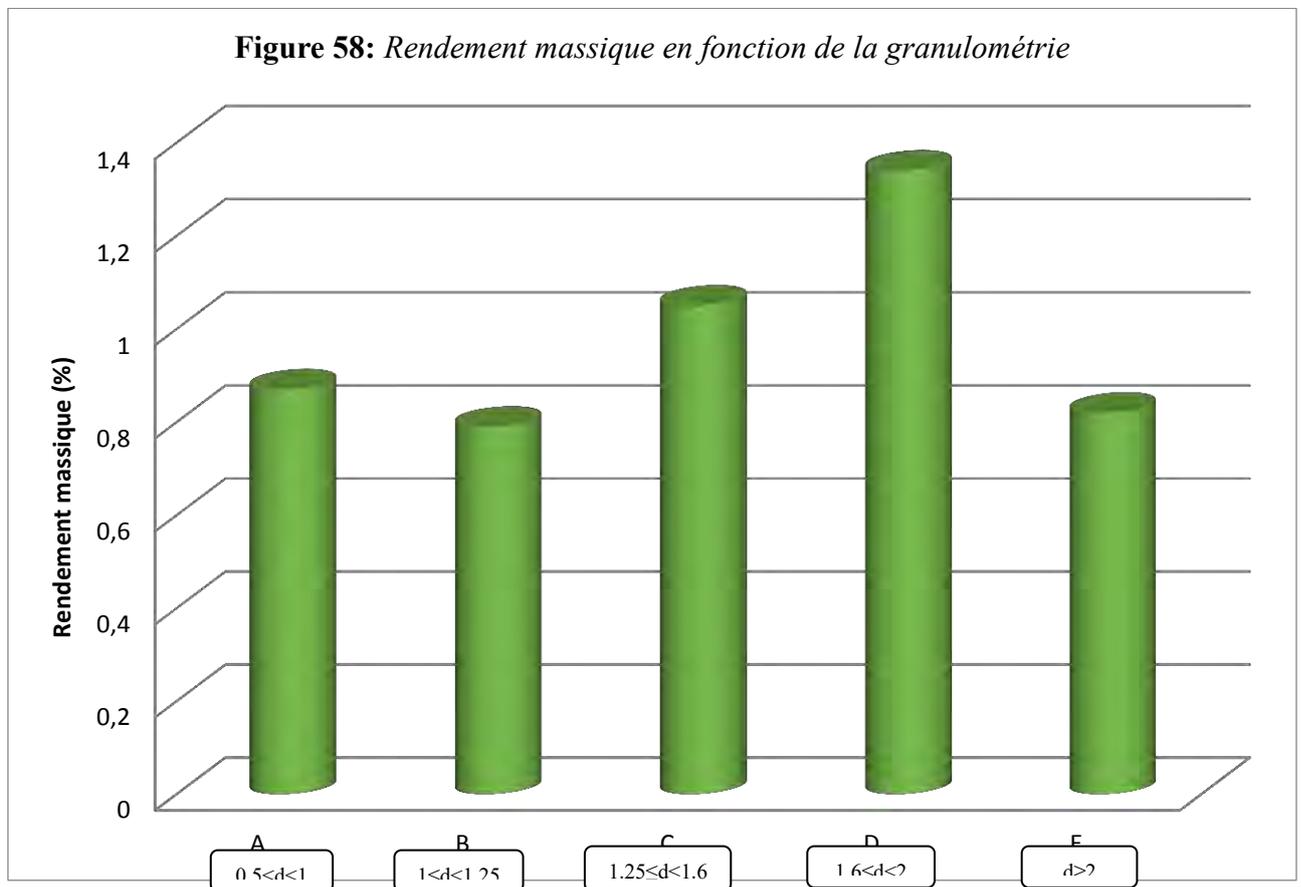
Comme il est souvent le cas dans les études d'extractions, utilisant une matrice solide, de séparer le solvant d'extraction et la matrice ; cette opération n'est pas toujours facile à réaliser. Dans cette étude la matrice solide est constituée d'une granulométrie très variée avec des grains de diamètres allant de 0.5 mm jusqu'à 2 mm.

Cependant le débit de la filtration, un facteur très important dans l'efficacité de la procédure d'extraction, a été évalué dans cette partie de nos travaux. Les résultats sont donnés en **figure 57**. Nous constatons que le débit de la filtration baisse avec la réduction de la granulométrie du broyat. Les ports du filtre sont bouchés dès les premières minutes de la filtration. Ce qui entraîne la forte baisse du débit de la filtration à partir de la granulométrie comprise entre 1,25 mm et 1,6 mm.



De A à D le rendement d'extraction subit une évolution croissante. Cette hausse peut être justifiée par la réduction des pertes lors de la filtration : opération dans laquelle une bonne partie du solvant d'extraction reste confinée dans le mélange pâteux malgré la puissance des pompes utilisées pour créer le vide. Ainsi, donc en augmentant la taille de la granulométrie on note une baisse des pertes dans la séparation de la matrice solide et le solvant.

Cependant au delà de la taille de matrice 2 mm une forte baisse est notée. L'une des raisons capitales de cette baisse est le problème de diffusion du solvant dans la matrice solide. Cette limitation de la diffusion du solvant empêche l'extraction des molécules situées en profondeur dans la matrice. La **figure 58** donnent une parfaite illustration de ces résultats.



La teneur en Aza-A dans les différents extraits techniques finaux est déterminée par la méthode CLHP en phase inverse. Les résultats sont donnés dans la **figure 59**. A travers cette figure nous constatons que la teneur en Aza-A dans l'extrait technique ne suit pas la même allure que le débit de la filtration en fonction de la granulométrie.

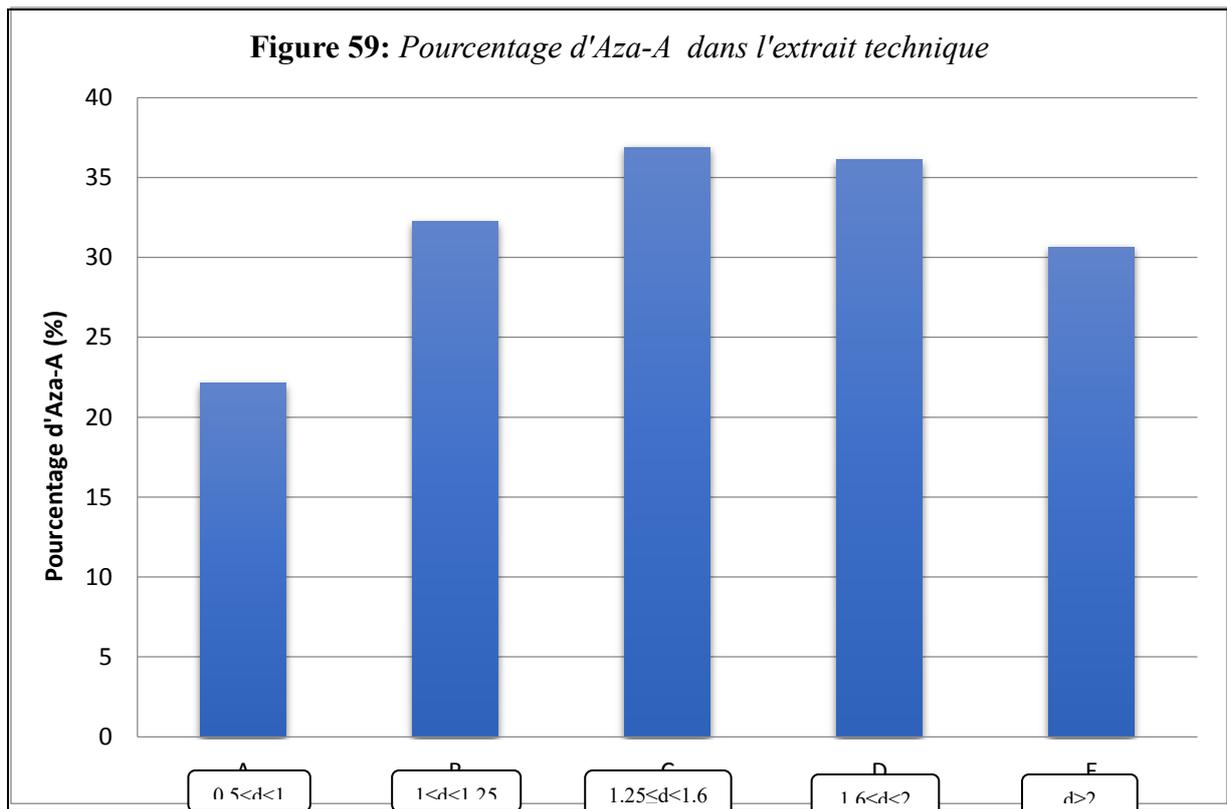
Le meilleur résultat est obtenu avec la granulométrie comprise en 1.25 mm et 1.6 mm avec une teneur de l'Aza-A dans l'extrait technique de 36.9 %.

Vers les granulométries inférieures à 1.25 mm une baisse de cette teneur en Aza-A est notée. Cette baisse peut être justifiée par les pertes non négligeables notées lors de la filtration. Car avec la granulométrie fine une bonne partie du solvant reste emprisonnée dans la patte qui constitue la matrice solide formant ainsi une suspension très concentrée. La constitution de la matrice en élément de petite granulométrie ( $d < 1.6 \text{ mm}$ ) favorise leur cohésion grâce au solvant qui joue le rôle de liant entraînant ainsi la formation d'un concentré solide/liquide sous forme de patte. Ainsi le solvant emprisonné ne peut pas libérer les molécules d'Aza-A de la masse obtenue. Avec des pompes à membrane très puissantes nous n'arrivons pas à tirer le solvant de la patte boueuse.

Vers les granulométries supérieures à 1.6 mm, une autre baisse est notée ; mais pas pour les mêmes raisons que précédemment avec la petite granulométrie. La nouvelle baisse est principalement due à la diminution de la diffusion du solvant à l'intérieur des éléments de grande granulométrie qui constituent la matrice solide. La constitution de la matrice en éléments de granulométrie suffisante ( $d \geq 1.6 \text{ mm}$ ) entraîne un degré de liberté qui empêche leur association en masse en libérant le solvant qui est filtré plus facilement.

Ainsi le solvant n'est plus retenu (en tant que liant), cependant il passe plus vite entre les éléments sans atteindre, dans un temps suffisant, l'intérieur de chaque constituant de la matrice.

Ainsi le solvant plus libre ne peut pas atteindre sa limite maximum d'extraction solide/liquide.



#### IV.4.) Influence du rapport MeOH/H<sub>2</sub>O sur l'extraction de l'Aza-A

Trois rapports (A=35/65, B=45/55 et D=50/50) ont été retenus pour la détermination de l'influence du rapport de solvants MeOH/H<sub>2</sub>O sur l'extraction de l'Aza-A. Les graines (séchées au soleil) utilisées sont collectées dans la commune de Tivaoune.

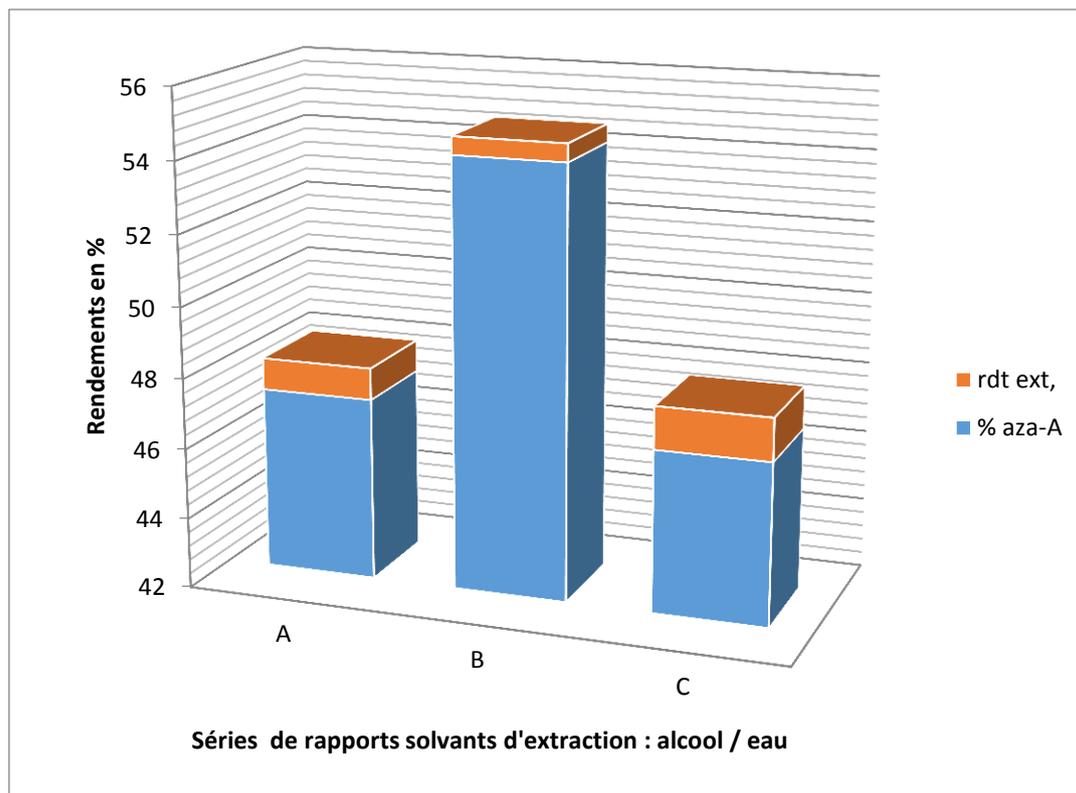
Les méthodes d'extractions et d'analyses CLHP des extraits techniques sont identiques à celles décrites précédemment. Les résultats des analyses CLHP sont représentés sur la **figure 60**.

##### IV.4.1.) Résultats d'extraction

A=35/65 ; B= 45/55 ; C= 50/50)

*rdt ext* : rendement d'extraction

% *Aza-A* : pourcentage Aza-A dans l'extrait technique



**Figure 60** : rendement d'extraction et pourcentage d'aza-A en fonction du rapport de solvants alcool/eau

Le rapport du mélange alcool / eau joue un rôle déterminant dans la composition de l'extrait technique final. Le rapport 45/55 reste plus sélectif suivi du rapport 35/65 et vient en dernière position celui du 50/50. Le premier donne un rendement d'extraction massique faible mais avec une teneur en Aza-A dans l'extrait technique très forte comparé aux deux autres rapports dont le rendement massique est assez important mais avec une teneur en Aza-A . Le screening portant sur les rapports de solvants est fait dans le but de faciliter les purifications et de n'avoir dans les formulations que les composés utiles à la protection des cultures. L'étude pilote a été effectuée sur le rapport 45 /55. Des résultats très satisfaisants ont été obtenus ; ils sont présentés dans la partie extraction sur pilote.

#### **IV.5.) Influence du rapport volume solvant d'extraction / masse de tourteau sur l'extraction de l'Aza-A**

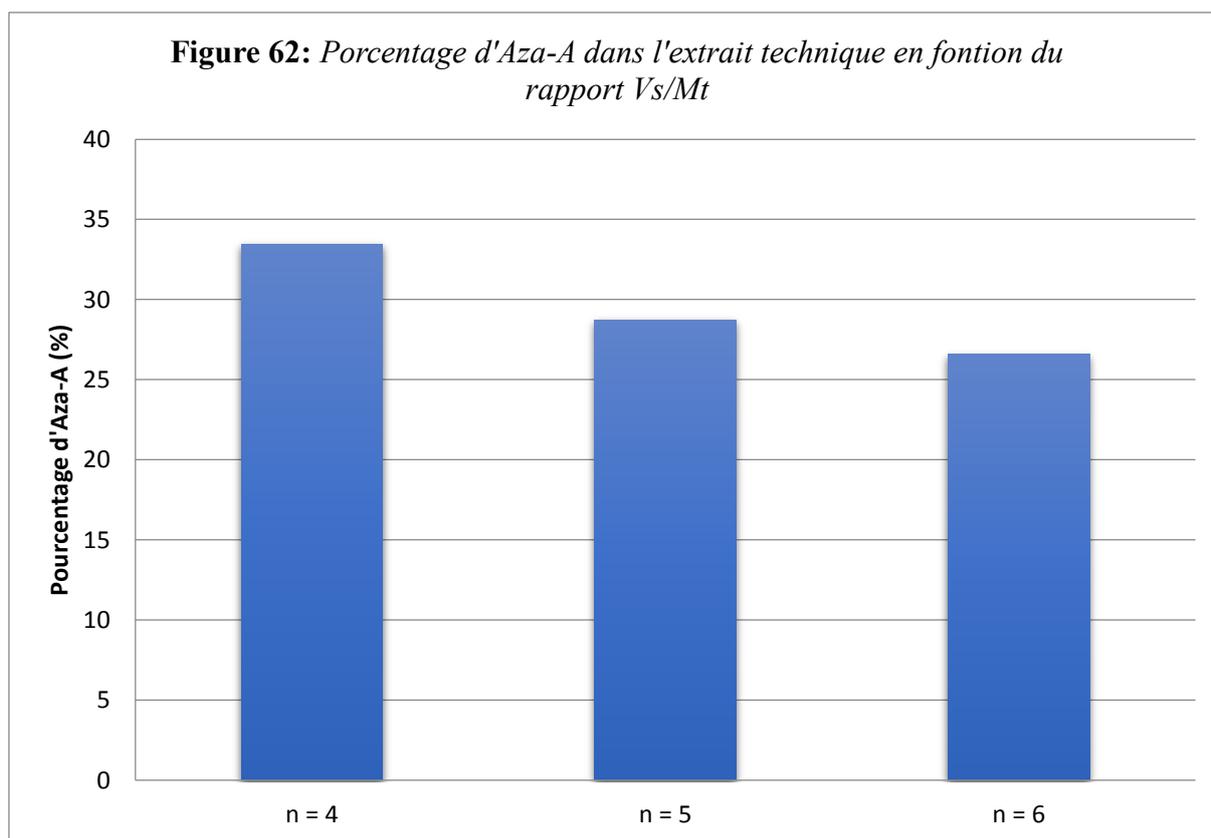
Cette influence est étudiée sur quatre rapports de solvants  $V_s = n M_t$  ( $n = 3 ; 4 ; 5 ;$  et  $6$ ). Le dernier  $V_s = 6 \times M_t$  est à la base de la méthode d'extraction qui nous a conduit aux

premiers meilleurs résultats de nos travaux. La méthode d'extraction est la même pour tous les rapports étudiés. Les méthodes d'analyses CLHP des extraits techniques sont identiques à celles décrites précédemment.

#### IV.5.1.) Résultats des extractions



Les résultats d'extractions reportés dans la **figure 61** montrent que le rendement d'extraction et le rapport du volume de solvant sur la masse de tourteau sont bien liés. Le rendement d'extraction augmente plus quand le rapport est important. Cette corrélation peut être expliquée par le phénomène de saturation du solvant d'extraction. En effet avec les petits volumes d'extraction la saturation est atteinte avant que tous les solutés ne passent dans le solvant.



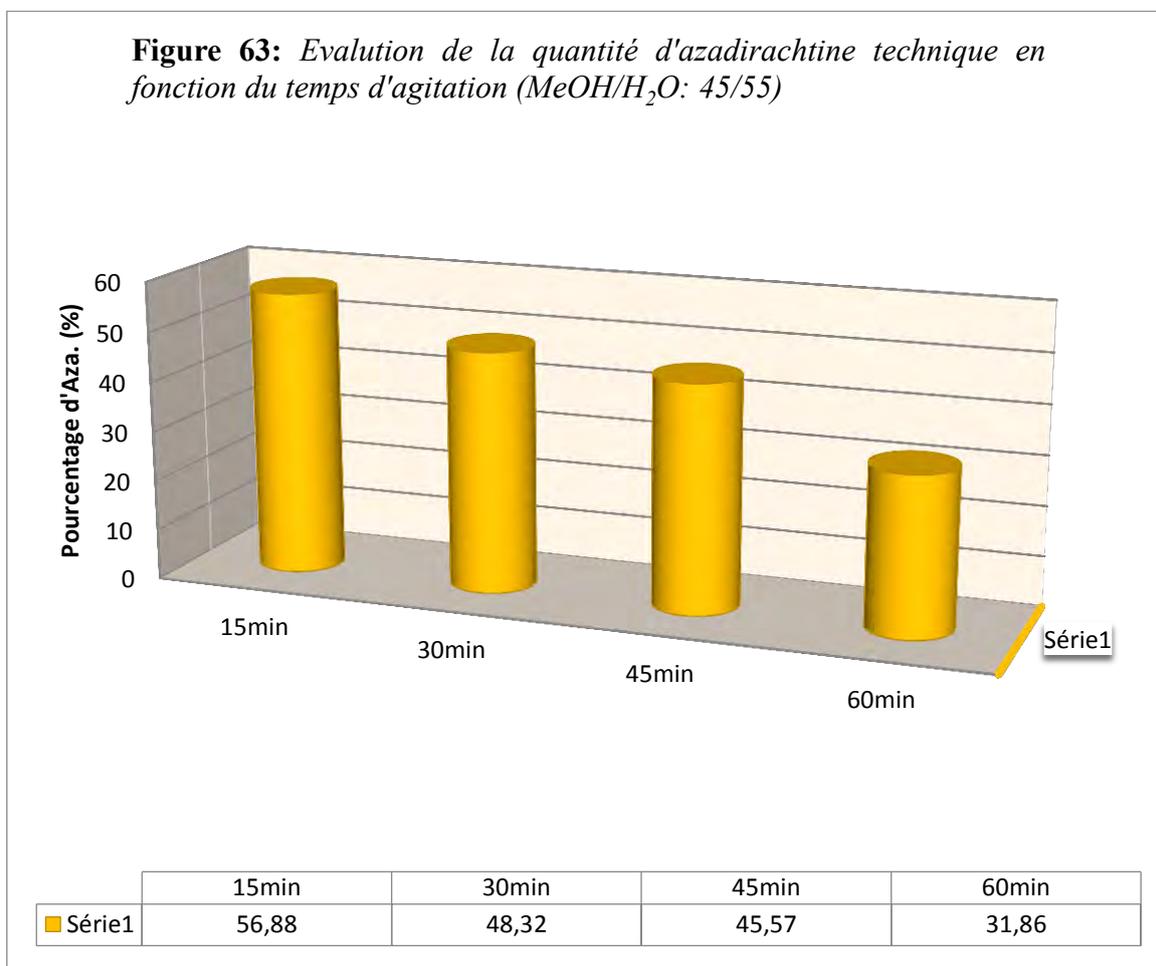
Le pourcentage d'Aza-A dans l'extrait technique diminue avec la hausse du volume de solvant d'extraction. Cette baisse ne signifie pas que l'Aza-A n'est pas extraite mais plutôt que la composition moléculaire de l'extrait technique a augmenté du fait de l'extraction d'autres molécules partiellement soluble dans le mélange de solvant d'extraction. L'Aza-A étant très soluble dans le solvant d'extraction, elle passe en solution dès les premières minutes d'extraction (voir **figure 62**). Avec des volumes de solvants élevés, la saturation n'est pas atteinte toute la durée de l'extraction, les composés peu solubles finissent par passer dans le solvant d'extraction.

#### **IV.6.) Impact de la durée d'agitation (ou extraction) sur le rendement en Aza-A**

Quatre lots ( $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ ,  $L_4$ ) de 14 g chacun, de broyat déshuilé sont extraits à des durées respectives de 15, 30, 45 et 60 minutes. Le mode d'extraction est identique à celui décrit

précédemment. Le pourcentage en Aza-A dans les différents extraits techniques d'azadirachtine est déterminé par CLHP analytique.

Les résultats du dosage CLHP analytique de l'azadirachtine-A dans les extraits technique, obtenus avec les quatre lots (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>), sont donnés dans le diagramme de la **figure 63**.



Sur la **figure 63** nous avons représenté les pourcentages d'Aza-A, dans les extraits techniques, en fonction des durées d'agitation. Sur ce diagramme, nous constatons que le pourcentage et la durée d'agitation sont bien liés. En effet le pourcentage en Aza-A diminue progressivement quand la durée d'agitation passe de 15 à 60 min. Le maximum est obtenu en 15 min d'agitation.

L'Aza-A étant très soluble dans le solvant d'extraction, son passage dans le solvant se fait dès les premières minutes d'extraction. Cependant les longues durées d'agitation entraineraient un passage progressif des autres limonoïdes (accompagnant l'Aza-A) dans le solvant

d'extraction : Ce qui augmente la composition moléculaire de l'extrait d'azadirachtine technique entraînant ainsi simultanément une baisse du pourcentage d'Aza-A.

Pour optimiser le pourcentage d'Aza-A dans l'extrait technique nous devons réduire la durée d'extraction. A l'échelle du laboratoire 30 à 45 minutes sont suffisantes pour extraire l'Aza-A du tourteau de neem. Cependant à grande échelle cette durée nécessite une prolongation car la diffusion du solvant dans la matrice solide serait un facteur non négligeable.

#### **IV.6.1.) L'extraction en trois étapes (3 x 1 heure)**

35.630 g d'amandes en provenance de Touba ont été broyées et délipidées au soxhlet à l'éther de pétrole pendant trois heures.

Le tourteau délipidé est remis dans un erlemeyer pour subir une extraction solide-liquide au mélange de méthanol-eau (45 : 55) de volume 112 ml. Cependant au lieu d'effectuer une extraction continue pendant trois heures, nous avons effectués une série de trois extractions qui ont duré chacune une heure. Au terme de chaque heure d'agitation le mélange est filtré et le raffinat réengagé dans une autre série d'extraction avec le même volume de mélange MeOH : H<sub>2</sub>O (45 : 55). Les filtrats récupérés sont concentrés séparément puis extraits trois fois au MTBE. Avec des volumes de MTBE deux fois supérieurs aux volumes des concentrats. La teneur en Aza-A dans les différents extraits techniques a été déterminée par la CLHP.

##### **IV.6.1.1.) Résultats des extractions**

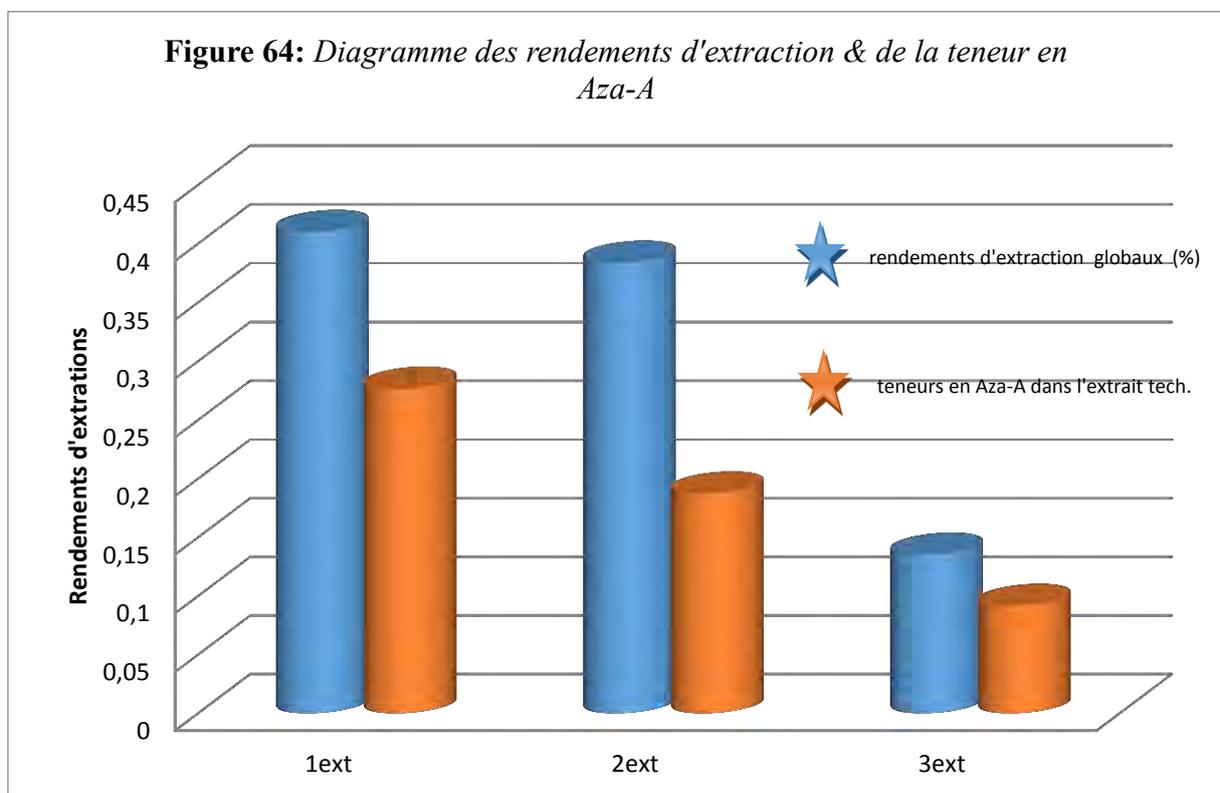
Les résultats des extractions sont donnés en figure 64. L'extraction en trois étapes donne un rendement global d'extraction de l'azadirachtine technique de 0.9 %. Ce rendement reste légèrement supérieur à ceux obtenus en faisant une extraction continue de trois heures qui sont, aux meilleurs des cas, dans l'ordre de 0.8 %.

La **figure 64** montre que la quasi-totalité de l'Aza-A est extraite lors des deux premières extractions. En effet 58 % de la quantité totale d'aza-A sont extraites dès la première extraction. A la seconde extraction 36 % sont extraites et en fin 6 % sont extraites à la troisième extraction. Nos résultats sont comparable à ceux publiés par *Kaushik* dont l'extraction est faite avec de l'éthanol 100 %. Pour *Kaushik* 69 à 71 % de l'Aza-A sont

extraits à la première extraction ; 18 à 19 % à la seconde extraction et 9 à 11 % à la troisième extraction.

Ces résultats montrent que trois extractions suffisent pour extraire la totalité de l'aza-A contenue dans les amandes de fruits de neem. Aucune différence notable n'a été observée sur les rendements d'extraction de l'Aza-A en comparant les deux procédures d'extractions à savoir l'extraction continue et l'extraction par étapes. Ce qui fait de l'extraction continue la procédure la plus intéressante car permettant de faire une économie de solvants et d'étapes de filtrations.

La différence notée sur les rendements massiques globaux proviendrait d'autres composés contenus dans les graines autres que la molécule d'Aza-A.



## IV.7.) Influences des solvants sur l'extraction de l'Aza-A

### IV.7.1.) Extraction avec 100 % méthanol (MeOH)

**Tableau 27** : résultats comparatifs des systèmes de solvants

Solvants extraction	MeOH/H <sub>2</sub> O (45 : 55)	100 % MeOH
Rdt d'extraction (%)	0.5003	5.6181
% Aza-A	33.97	2.89

L'extraction au méthanol (100 %), des amandes de fruits de neem, a donné un rendement d'extrait brut dix fois supérieur à celui des extraits obtenus par extraction au mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (45 : 55). La couleur de l'extrait technique final montre la présence d'une quantité assez importante de chlorophylle. En plus de la couleur de l'extrait ce dernier reste un peu hygroscopique.



**Photo 13** : extrait azadirachtine technique obtenu avec MeOH 100 %

Après dosage par CLHP en phase inverse, nous avons noté une forte baisse du pourcentage d'Aza-A dans l'extrait technique. Le pourcentage d'Aza-A est passé de 33.97 % avec le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (45/55) à 2.89 % avec du méthanol 100 %. Le méthanol serait moins sélectif que le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (45 : 55) d'où la hausse de la masse de l'extrait final entraînant une chute considérable du pourcentage d'Aza-A dans l'extrait technique. L'aspect physique du produit final (nature hygroscopique, coloration verte) rend son utilisation moins pratique comparé à celle des extraits obtenus avec le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (45 : 55).

#### IV.7.2.) Extraction avec 100 % eau (H<sub>2</sub>O)

Un rendement global d'extraction de 0.162 % a été obtenu. Ce rendement d'extraction reste largement inférieur à ceux des extractions faites avec un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O au ratio 45 : 55 avec lequel nous avons des rendements compris entre 0.5 et 0.6 %.

L'analyse CLHP de la teneur en Aza-A dans l'extrait technique a donné 20.31 % ce qui est toujours inférieure aux teneurs obtenues avec le mélange alcool-eau. Il faut aussi noter que le filtrat avait une forte odeur d'ail ce qui n'est pas le cas avec les filtrats des extractions faites au mélange alcool-eau. Cette odeur d'ail serait due à une forte présence de composé soufré : responsable de l'odeur de l'ail selon Morgan et al<sup>142</sup>.

Bien que l'Aza-A soit soluble à l'eau son utilisation comme seul solvant d'extraction reste peu adaptée au protocole d'extraction que nous avons mis au point. L'étape de la filtration est impossible sur papier filtre ou frité comme le montre la **photo 14**. Lors de cette manipulation nous avons fait recours à la colonne pour séparer le solvant du solide (**photo15**). la colonne est bouchée avec du coton et une pression est appliquée à la tête de colonne avec de l'air comprimée pour forcer la sortie du solvant d'extraction.

---

<sup>142</sup> E. D. Morgan, the chemistry of Neem limonoids, *Neem Fondation*, 1999.



**Photo 14 :** *Filtration sur fritté sous vide avec une pompe à membrane*



**Photo 15 :** *Filtration sur colonne*

### IV.7.3.) Comparaison des systèmes de solvants MeOH/H<sub>2</sub>O et EtOH/H<sub>2</sub>O

**Tableau 28** : Comparaison des mélanges de solvants MeOH/H<sub>2</sub>O (45/55) et EtOH/H<sub>2</sub>O (45/55).

Solvants	Teneur en Aza-A (%)	Rendement d'extraction
MeOH/H <sub>2</sub> O (45/55)	33.97	0.5003
EtOH/H <sub>2</sub> O (45/55)	24.8883	0.7004

Les résultats du **tableau 28** montrent que le mélange méthanol-eau (45/55) est plus sélectif que celui éthanol-eau (45/55). Avec une différence de teneur en Aza-A dans l'extrait technique de 9.08 %. Le mélange méthanol-eau reste le meilleur solvant pour une production commerciale d'azadirachtine technique.

**Tableau 29** : Récapitulatif des résultats d'extraction (%)

Solvants	Teneur en Aza-A (%)	Rendement d'extraction
100 % MeOH	2.89	5.6181
100 % EtOH	4.1084	2.7882
100 % H <sub>2</sub> O	20.5327	0.1619

L'utilisation de méthanol (MeOH) pur, éthanol (EtOH) pur ou eau (H<sub>2</sub>O) pure pour extraire l'Aza-A dans les fruits de neem a été effectuée sur les Fmr de la commune de Touba. Les résultats donnés dans le **tableau 29** montrent que l'extraction à l'eau 100 % donne de meilleures teneurs en Aza-A dans l'extrait technique. Les extractions au méthanol 100 % ou à l'éthanol 100 % donnent des teneurs très faibles du fait de leurs non sélectivités visa à visa des molécules qui composent la graine de neem. La non sélectivité du méthanol et de l'éthanol se voit bien dans les rendements massiques qui sont respectivement de 5.6181 % et 2.7882 %.

#### IV.8.) La teneur en huile dans les fruits de neem des différentes régions étudiées

Dans toutes les régions étudiées la teneur en huiles dans les fruits mûrs est supérieure à celle des fruits non mûrs. Ces résultats viennent confirmer ceux trouvés dans la littérature. Nous avons aussi noté une hausse de teneur en huile dans des fruits mûrs ramassés comparée à celle des fruits mûrs cueillis. Cette hausse est de 5.309 % pour les fruits des arbres de neem de la commune de Touba.

**Tableau 30 :** *La région de Dakar*

Etat de maturité	Teneur en huile (%)
Fruits mûrs	21.722
Fruits non mûrs	20.203

**Tableau 31 :** *La région de Thiès (Commune de Tivaoune)*

Etat de maturité	Teneur en huile (%)
Fruits mûrs	24.594
Fruits non mûrs	17.344

**Tableau 32 : La région de Diourbel**

<b>Commune de Diourbel</b>	
Etat de maturité	Teneur en huile (%)
Fruits mûrs	34.083
Fruits non mûrs	24.989

<b>Commune de Touba</b>	
Etat de maturité	Teneur en huile
Fruits mûrs	30.169
Fruits non mûrs	28.785

**Tableau 33 : Région de Matam (Commune de Nabadji Civol)**

Etat de maturité	Teneur en huile (%)
Fruits mûrs	33.957
Fruits non mûrs	32.706

**Tableau 34 : Région de Louga (Commune de Ndande)**

Etat de maturité	Teneur en huile (%)
Fruits mûrs	40.454
Fruits non mûrs	28.100

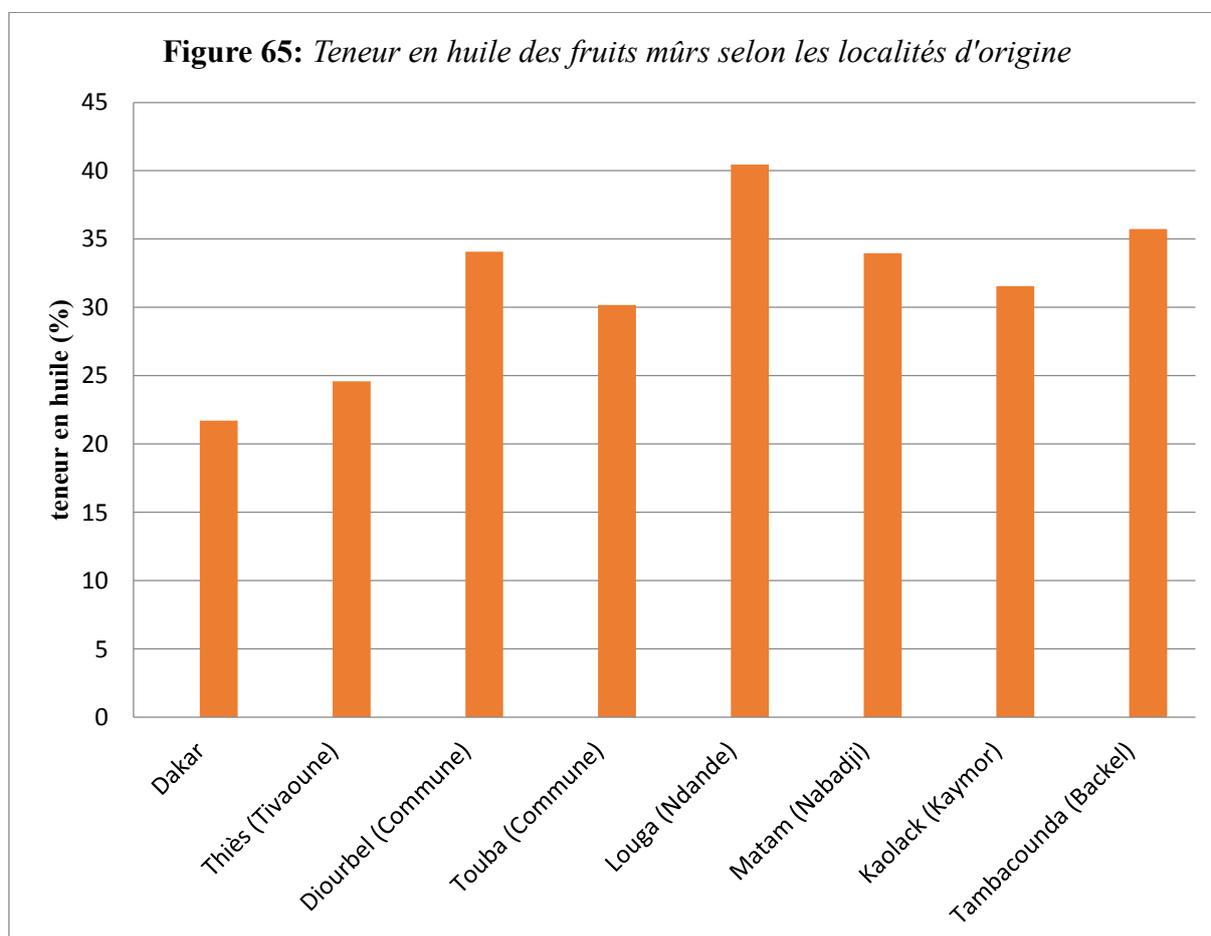
**Tableau 35 : Régions de Tambacounda et Kaolack**

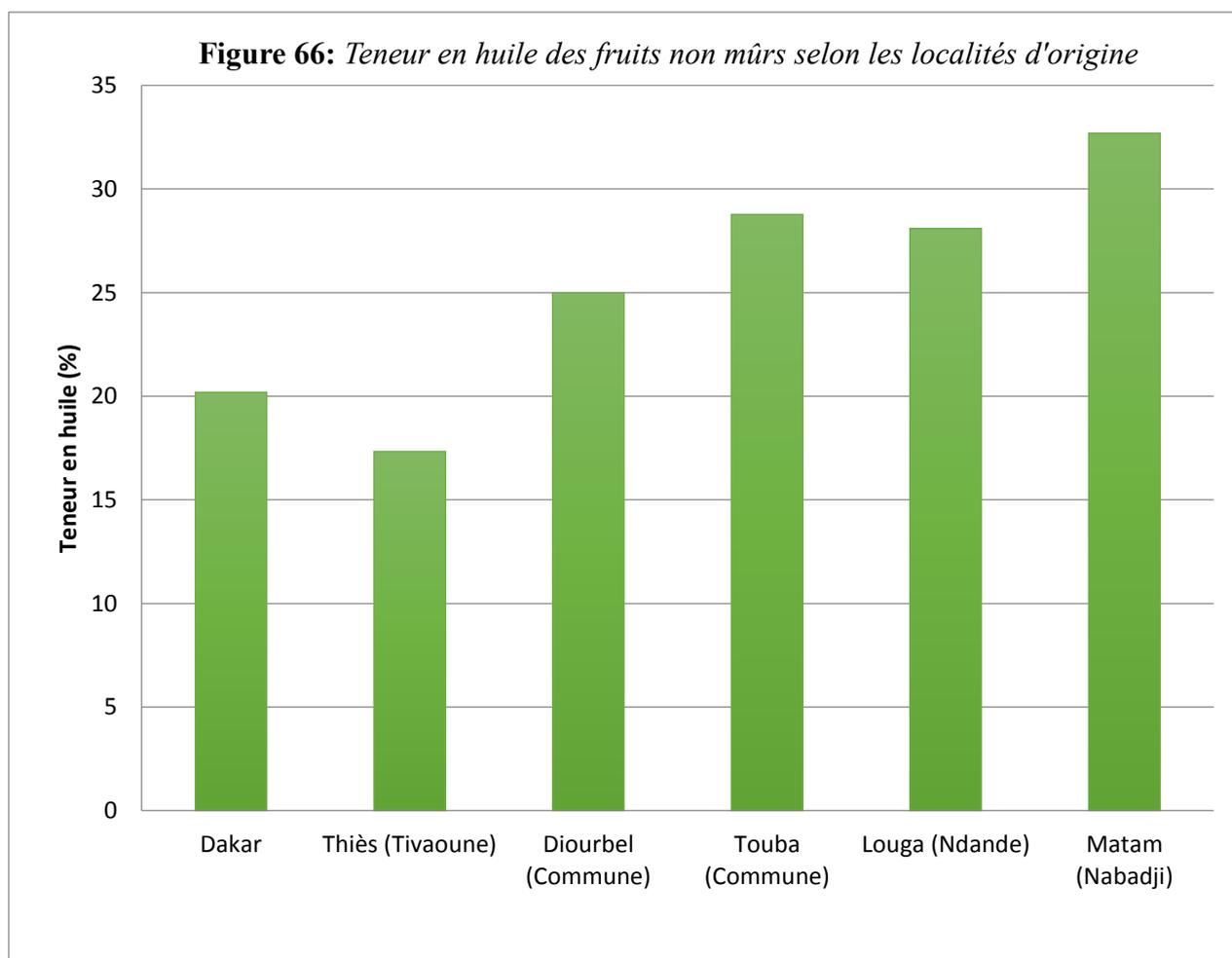
Régions	Etat de maturité	Teneur en huile (%)
Tambacounda : (Commune de Backel)	Fruits mûrs	35.731
Kaolack : (Commune de Kayemor)	Fruits mûrs	31.554

#### IV.8.1.) Facteurs climatiques et formation d'huile dans les fruits de neem

Selon les états de maturité des fruits une étude comparative des teneurs en fonctions des régions d'origines est faite pour mieux voir les rapports entre la production d'huile dans les fruits de neem et les facteurs climatiques.

Les résultats sont donnés dans les figures ci-dessous.





Une variation considérable de la teneur en huile dans les fruits de neem est notée selon les régions d'origine.

Cependant pour les fruits mûrs, les régions de Tambacounda et de Louga renferment plus d'huile avec des teneurs allant respectivement de 35 % à plus de 40 %. Elles sont suivies par les régions de Diourbel, Matam et Kaolack où les teneurs sont respectivement de 34 %, 33.9 % et 31.6 %. Les régions de Dakar et Thiès ferment la marche avec respectivement avec 22 % et 25 %. Par ces résultats nous concluons que : La teneur en huile dans les fruits mûrs est comprise entre 22 % et 40 %.

En ce qui concerne les fruits non mûrs (fruits verts lors de la cueillette) la teneur en huile suis globalement une hausse régulière de Dakar à Matam en passant respectivement par Thiès Diourbel et Louga. La teneur en huile est comprise entre 20.2 % et 32.7 %. Les résultats sont présentés dans la **figure 66**.

## IV.9. Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique

Les extractions se portaient sur les fruits mûrs ramassés en provenance de la commune de Touba. Deux tests ont été effectués l'un sur un broyat non délipidé et l'autre sur un broyat délipidé au soxhlet par de l'éther de pétrole.

### IV.9.1.) Matériels et Méthode

#### V.1.1.) Les caractéristiques de l'extracteur (Séparex, France) sont les suivantes :

Installation : Pilote 4219

Nombre de paniers : 3 (5, 10 et 20 cm<sup>3</sup>)

Pression maximale de travail : 45 MPa

Débit maximal de CO<sub>2</sub> : 0,5 kg.h<sup>-1</sup>

#### IV.9.1.2.) Les conditions opératoires choisies sont les suivantes

Panier d'extraction : diamètre de 1,3 cm pour une hauteur de 15 cm. Volume : 20 cm<sup>3</sup> correspondant à environ 8 grammes de graines de NEEM sèches et broyées. Les caractéristiques sont les suivantes :

Pression de 30 MPa

Température de 50 °C

Débit de 0,4 kg.h<sup>-1</sup>

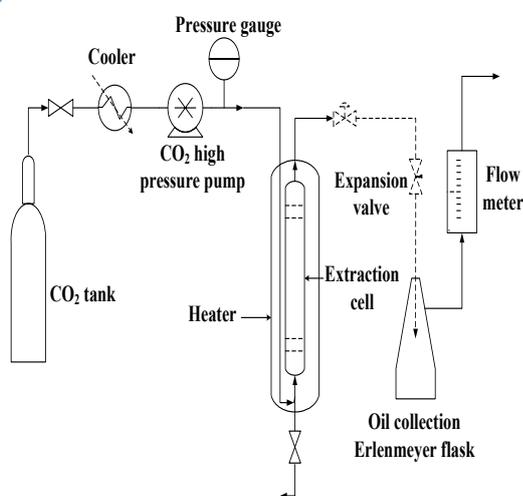


Figure 67 : Schéma de fonctionnement.



Figure 68 : Dispositif expérimental de laboratoire.

#### IV.9.2.) Description du mode opératoire

Une extraction est menée comme suit :

L'autoclave est rempli avec de la biomasse en poudre et chauffé jusqu'à atteindre la température désirée. Le CO<sub>2</sub> liquide (pureté 99,7% - Air Liquide Méditerranée, France) est refroidi dans un bain cryogénique à 277 K, filtré et pompé dans l'autoclave jusqu'à atteindre la pression de travail. La vanne de détente est alors ouverte et un débit de CO<sub>2</sub> traverse donc le lit de poudre de neem à pression, température et débit constants pour des temps d'extraction prédéfinis. Après être passé à travers l'autoclave, le CO<sub>2</sub> est détendu grâce à la vanne d'expansion. Le CO<sub>2</sub> devient gazeux et les extraits sont récupérés dans un récipient collecteur. Le débit de CO<sub>2</sub> est mesuré grâce à un débitmètre placé en sortie du procédé. En général, la totalité de la courbe d'extraction est tracée afin d'identifier si le transfert de matière est limité par la diffusion.

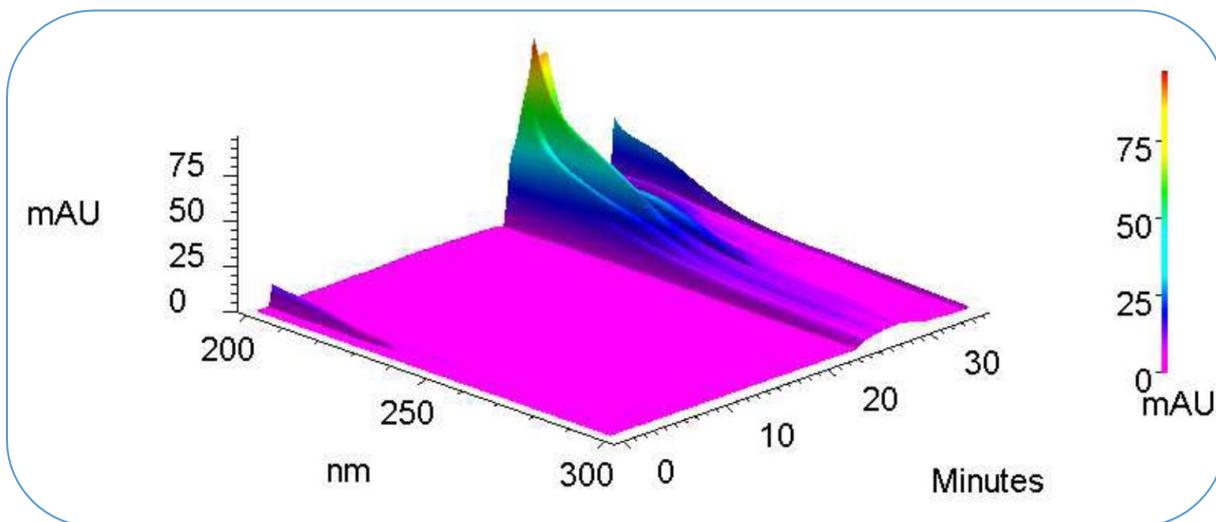
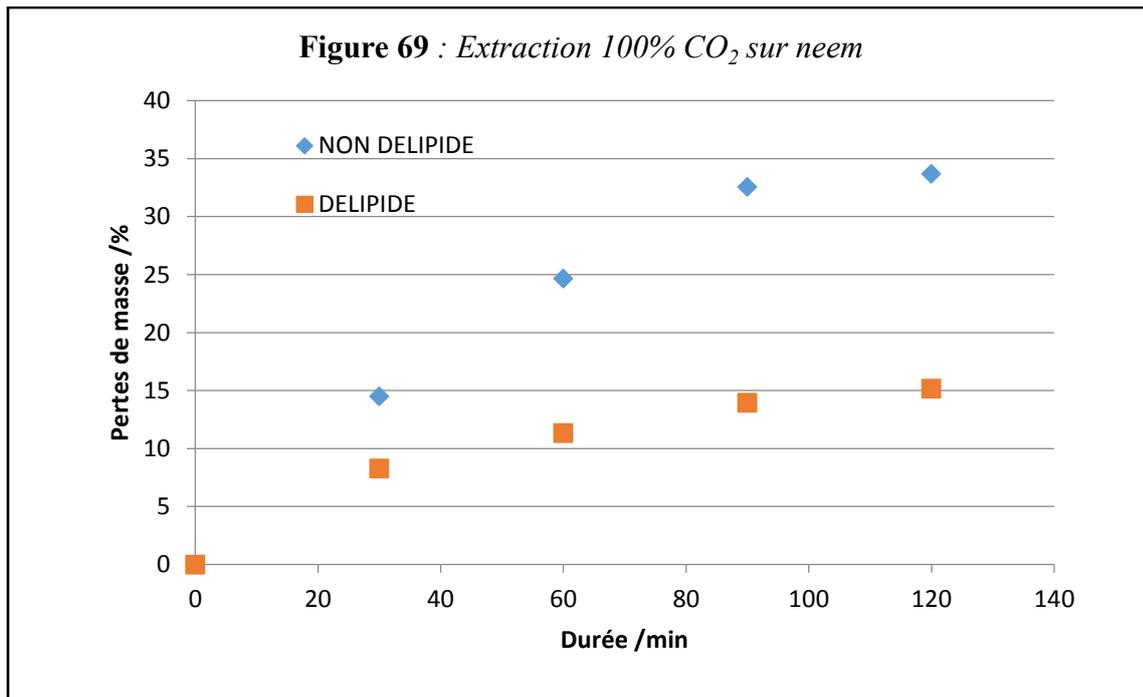
Les performances des extractions sont estimées par rapport à la perte en masse dans l'autoclave.

$$\text{Perte en masse (\%)} = \frac{\text{masse initiale (g)} - \text{masse après extraction (g)}}{\text{masse initiale (g)}} \times 100$$

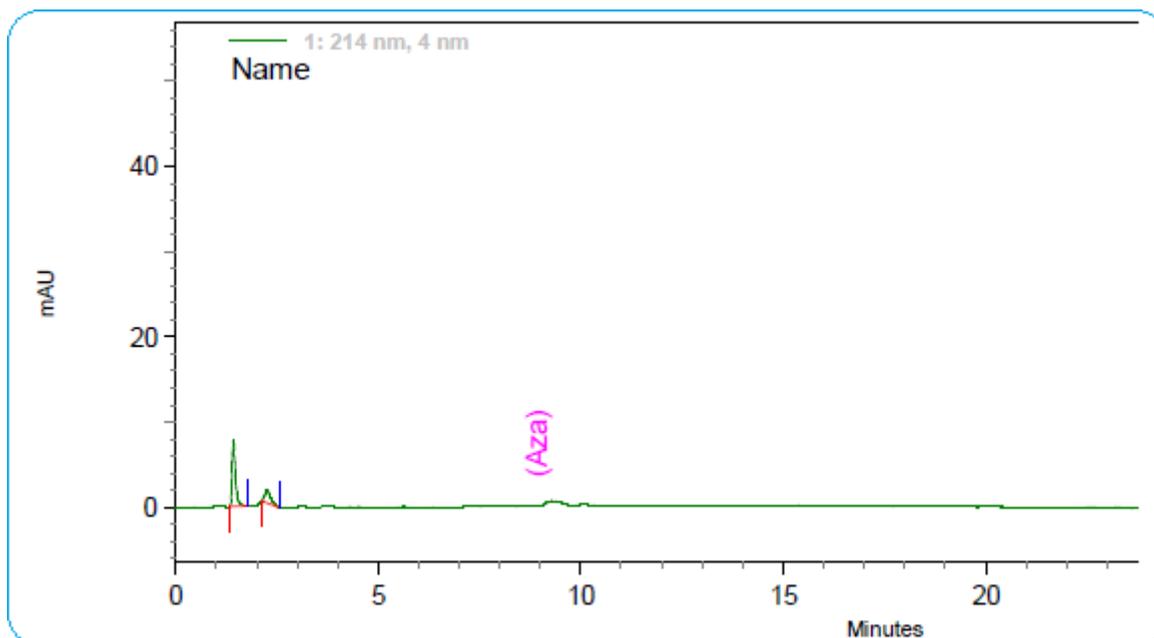
#### IV.9.3.) Résultats des extractions au CO<sub>2</sub> critique

Les résultats des extractions sont donnés en figure 69. Sur la figure sont représentées les pertes de masses en fonction de la durée d'extraction. Avec le broyat délipidé le seuil d'extraction est atteint au bout de 90 min. La perte de masse maximale est d'environ 15 %. Cette perte de masse évolue jusqu'à 35 % au bout de 120 min avec le broyat non délipidé. De 0 à 90 minutes nous notons une évolution en ligne droite de la perte de masse.

L'analyse CLHP des extraits techniques liquides montre une absence totale d'Aza-A. Le chromatogramme de l'un des extraits est présenté en figure 70 et 71.



**Figure 70 : Chromatogramme en 3D de l'extrait au CO<sub>2</sub>**



**Figure 71:** Chromatogramme de l'extrait au CO<sub>2</sub>

#### IV.10.) Extraction à l'échelle semi-industrielle : sur pilote

##### IV.10.1.) Matériels et méthode

##### IV.10.1.1.) Matériel végétal

Dans cette étude nous avons utilisé deux catégories de fruits de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) : Les **fruits verts** (non murs) cueillis et les **fruits murs** (ramassés : considérés comme murs). Après séchage des fruits, les amandes ont été récupérées et gardées dans leur emballage en papier, et dans des boîtes en polystyrènes pendant leur transport à Marseille.

##### IV.10.1.2.) Solvants utilisés

Nom	Références
Ether de pétrole	78-49
Méthanol	56
Méthyl tertiobutyl éther (MTBE)	M/4494/25

### IV.10.1.3.) Appareils et verrerie

Un ballon tricol de 6 L et un agitateur *IKA*<sup>®</sup> *RW14basic* ont été utilisés pendant les extractions solide/liquide et les pesées à la balance *METTLER TYPE 3600* (e : 0,1g). Pour le broyage des amandes, une moulinette *PHILIPS* a été utilisée. Une pompe à membrane (*KnF/LAB*) nous a permis d'effectuer la filtration sous vide.

#### IV.10.1.3.1.) Description du pilote

L'unité (figure 72) est constituée par une colonne en verre de type **York-Scheibel** de **1,15 m** de hauteur utile et **80 mm** de diamètre intérieur, comportant une série de sections d'agitation et de coalescence.

Les sections où s'effectue le mélange des phases possèdent des agitateurs de type turbine à quatre pales fixées sur le même axe médian. Au dessous de chaque zone d'agitation est disposée une couronne en P.T.F.E (polytétrafluoroéthylène) qui permet le passage et le recentrage des deux phases. Les sections coalescence sont constituées d'un garnissage de type toile d'acier tissée qui améliore la séparation en assurant un contact intime des deux phases.

La colonne est munie de deux pompes doseuses de marque *DOSAPRO MILTON ROY* type ST 56C2. Ces pompes assurent l'envoi des deux phases (H<sub>2</sub>O/MeOH et MTBE) dans la colonne à des débits bien contrôlés.



**Figure 72 : le pilote d'extraction**

## **IV.10.2.) Description du mode opératoire**

### **IV.10.2.1.) Délipidation du broyat**

Introduire 1 kg de broyat dans un réacteur de 6 L, équipé d'un agitateur central, ajouter 4 L d'éther de pétrole. Le mélange est agité pendant 3 heures, à température ambiante, avec un agitateur *IKA*<sup>®</sup> à une vitesse constante de 500 tr/min pendant toute l'opération.

A la fin des trois heures arrêter l'agitation, retirer la tige d'agitation du réacteur et laisser reposer le mélange pendant quelques temps (5 minutes environ). Après décantation des deux phases (solide et liquide) filtrer sous vide. Ici la trompe à eau peut être utilisée pour créer le vide nécessaire pour que la filtration s'opère. Le filtrat (phase éther de pétrole) est concentré sous vide au rotavapor (RII) pour récupérer l'huile de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). A l'issue de cette opération de délipidation nous avons obtenu 30 % de rendement en Huile. 67% de l'éther de pétrole ont été récupérés après concentration.

Le raffinat est repris en extraction solide / liquide au mélange MeOH/H<sub>2</sub>O.

### **IV.10.2.2.) Extraction des limonoïdes du tourteau**

L'extraction des limonoïdes du tourteau déshuilé est faite avec un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O au ratio 45/55. Six manipulations ont été effectuées sur le pilote :

Le protocole d'extraction est le même que celui de la délipidation ; cependant après avoir filtré (phase la plus difficile qui nécessite une pompe puissante : pompe à membrane), le filtrat est concentré au 1/9 dans le but de réduire le volume de MTBE à utiliser dans l'extraction liquide-liquide mais aussi pour récupérer le méthanol. Le recyclage du méthanol et du MTBE nous permet de réduire au maximum les dépenses pour l'achat des solvants. Car ils peuvent être réutilisés à nouveau dans les prochaines extractions.

### **IV.10.2.3.) Extraction liquide-liquide**

Pour 3 L de concentré nous avons rajouté 6 L d'eau distillée pour des raisons liées au fonctionnement de la colonne utilisée. Ainsi nous avons 9 L de phase aqueuse (Phase lourde) à extraire au MTBE (phase légère).

La phase lourde est introduite par l'intermédiaire d'un diffuseur en tête de colonne et la phase légère en fond de colonne. Les débits de chacune des deux phases sont assurés par deux

pompes doseuses. Les débits d'injection des deux phases étaient variés pendant la première heure d'extraction afin de régler la zone de séparation des deux phases.

L'extrait (MTBE + limonoïdes) est éliminé par trop plein en tête de colonne. Le raffinat (eau + limonoïdes restants) est évacué en fond de colonne, par l'intermédiaire d'une garde hydraulique, dans le bidon de réserve pour être à nouveau réinjecté dans la colonne. Ainsi l'extraction a duré quatre heures. La vitesse de rotation de la turbine est fixée à 160 tr/min pendant toute l'opération.

#### **IV.10.2.4.) Concentration de l'extrait (MTBE + limonoïdes)**

L'extrait MTBE, après avoir été séché au sulfate de magnésium, est concentré à sec au rotavapor (*BÜCHI ROTAVAPOR – R*) sous pression réduite. C'est à l'issue de cette concentration que nous obtenons l'azadirachtine technique sous sa forme poudre.

#### **IV.10.3.) Résultats des extractions sur pilote**

Les meilleures teneurs en Aza-A dans l'extrait technique sont obtenues avec les fruits de neem de la commune de Tivaoune (tableau 36). L'extrait technique issu des fruits non murs renferme 55,23 % d'Aza-A, celui provenant des fruits mûrs 45,14 %.

Ces résultats montrent que le procédé d'extraction établi à l'échelle du laboratoire (petite quantité : dans l'ordre du gramme) est applicable à l'échelle industrielle (sur des quantités de l'ordre du kilogramme). Les masses de graines utilisées au pilote partent de 0.7 Kg à 1.2 Kg.

**Tableau 36 :** *Teneur en Aza-A dans les extraits technique selon les régions*

<b>Provenance</b>	<b>Etat de maturité</b>	<b>Teneur en Aza-A dans l'extrait technique (%)</b>
<b>Tivaoune (P1M)</b>	Mûrs (fruits ramassés)	45.14
<b>Tivaoune (P2M)</b>	Non mûrs (fruits cueillis)	55.23
<b>Backel (PM55)</b>	Mûrs (fruits ramassés)	20.72
<b>Kaymor (PM56)</b>	Mûrs (fruits ramassés)	9.22
<b>Touba (PM57)</b>	Mûrs (fruits ramassés)	18.21
<b>Ndande (PM58)</b>	Non mûrs (fruits cueillis)	24.32

## **IV.11.) Matériels et méthodes d'analyses**

### **IV.11.1.) Spectroscopies RMN ( $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ )**

Les analyses en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été effectuées sur un appareil Bruker AC400 (400MHz). Les valeurs des déplacements chimiques ( $\delta$ ) ont été reportées en ppm par rapport au  $\text{CDCl}_3$  comme standard interne ( $\delta$  7.26 ppm). Pour l'interprétation des spectres, les abréviations suivantes ont été utilisées : (s) singulet, (d) doublet, (t) triplet, (q) quadruplet, (quint) quintuplet, (dd) doublet doublet, et (m) multiplet. Les constantes de couplages  $J$  sont exprimées en Hertz.

### **IV.11.2.) Spectroscopie Masse**

Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil Bruker esquire 6000 à trappe d'ion, équipé d'une source electrospray. Ces analyses sont faites en injection directe dans une solution méthanolique de NaCl à  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$

### **IV.11.3.) Dosage CLHP des extraits d'azadirachtine technique**

Le dosage de l'Azadirachtine-A (Aza-A), dans les extraits d'azadirachtine technique, est effectué par chromatographie liquide haute performance (CLHP), suivant la méthode de l'étalonnage externe. L'éluant utilisé est un mélange acétonitrile / eau en 40 / 60 (v : v). La vitesse d'éluion est fixée à  $0.7 \text{ mL/min}$  et la longueur d'onde de détection à  $214 \text{ nm}$ . Des solutions de  $1 \text{ mg/mL}$  d'azadirachtine technique sont préparées dans de l'acétonitrile (grade HPLC). Pour chaque solution un volume de  $10 \mu\text{L}$  est injecté. Avec les extraits à doser, une seule injection est faite et l'aire du pic correspondant au  $t_r$  (temps de rétention) d'éluion de l'Aza-A est utilisée pour quantifier la teneur en Aza-A dans l'extrait technique correspondant.

#### IV.11.4.) Référence des appareils utilisés

- ❖ **RMN** un appareil *Bruker Avance III nanobay - 400MHz* (aimant de 9,4 teslas) équipé d'une sonde BBFO+
- ❖ **Spectro de masse du laboratoire:** appareil *Bruker esquire 6000* à trappe d'ions, équipé d'une source électrospray.
- ❖ **HPLC du labo :** appareil *VWR Hitachi LaChrom Elite* équipé d'un détecteur à barrette de diode L-2455, d'un passeur d'échantillon L-2200, d'une pompe L- 2130 et d'une colonne *Purospher Star RP18e 5 mm* (150 x 4.6 mm).
- ❖ **Flash chromatographies** sont réalisées sur un appareil *boisage SP1*.
- ❖ **Pompe à vide :** KnF/LABOPORT
- ❖ **Pompes du pilote :** *DOSAPRO MILTON ROY* type ST 56C2
- ❖ **Colonne du pilote :** verre de type *York-Scheibel*
- ❖ **Evaporateurs :** rotavapor (RII) ou BUCHI ROTAVAPOR – R
- ❖ **Agitateur:** *IKA® RW14basic 01679950*
- ❖ **Balance:** *METTLER TYPE 3600* Poids max: 3600 g - Poids Min : 5 g
- ❖ **Broyeur :** *PHILIPS, HR2875/AM*, 220-230 V, 50-60 Hz, 400W

#### V.5.) Références des solvants d'extraction :

- ❖ **Eau de robinet :** (ou eau distillée pour le pilote)
- ❖ **Méthanol:** (65543 *SIGMA-ALDRICH*)

- ❖ **Ethanol** :( 32205 *SIGMA-ALDRICH*)
  
- ❖ **Acétonitrile**: (271004 *SIGMA-ALDRICH*)
  
- ❖ **Acétate d'éthyl**: (270989 *SIGMA-ALDRICH*)
  
- ❖ **Hexane** :(439177 *SIGMA-ALDRICH*)
  
- ❖ **Méthylterbutyléther** : (M/4494/25 Fisher Chemical)
  
- ❖ **Ether de pétrole** : (78-49)
  
- ❖ **Sulfate de Magnésium** : (Q 9I101249 M)

# *Discussion*

La production d'Aza-A dans les fruits de neem serait liée aux facteurs climatiques : mais pas de la même façon pris individuellement.

Notre étude, porte sur sept régions du Sénégal (Dakar, Thiès, Diourbel, Louga, Matam, Kaolack, et Tambacounda) avec des données pédoclimatiques assez diversifiées. Elle montre que la pluviométrie aurait un impact plus significatif sur la production d'Aza-A. Les études faites par *Kumar et al*<sup>143</sup> sur des fruits de neem de l'Inde montrent que la variabilité de l'azadirachtine est liée à la pluviométrie et à l'humidité. Les régions de Dakar et Thiès renferment les teneurs les plus élevées dans les fruits de neem. Dans ces deux régions de moyenne pluviométrique supérieure à 350 mm par an, nous avons deux types de climats différents: Dakar caractérisé par un microclimat et Thiès par un climat de type sahélien. Les sols retrouvés dans ces deux régions sont : pour la région de Thiès sols minéraux à pseudo gley très humifères et pour la région de Dakar plus précisément les sols de l'université sont constitués de sables reposant sur un substratum argilo calcaire. Les fruits de neem des régions de Dakar et Thiès renferment la même teneur en Aza-A (0.5 %). Ces deux régions aux types de sols différents, avec la même teneur en Aza-A laisse présager deux suppositions : la première le sol n'est pas un facteur déterminant sur la production en Aza-A dans les amandes et la seconde tous les deux types sols sont propices pour une bonne production d'Aza-A dans les fruits. Cette dernière supposition reste la plus soutenable car l'arbre puisant ses besoins en nutriment dans le sol la qualité de ce dernier ne peut être indifférent à la composition en principe actif (Aza-A) dans les fruits.

Bien que plus laborieuse la cueillette sera notre principale mode de collecte des fruits. Car pour la même région les fruits cueillis renferment plus de principe actif dans leurs amandes. Pour Dakar et Thiès les fruits cueillis et ceux ramassés nous avons respectivement 0.5 % et 0.4 % en Aza-A dans les amandes. Cette baisse de 0.1 % est attribuée à la dégradation de la molécule contenue dans les graines dont la durée par terre n'est pas connue avec précision.

La région de **Matam** avec une pluviométrie moyenne annuelle de 312.8 mm et un sol de type dunaires (diéri et ferlo sableux) donne une teneur maximale de 0.2 %. Cette moyenne pluviométrique légèrement inférieure à celles de Dakar et Thiès aurait conduit à une teneur

---

<sup>143</sup> Kumar, J. ; Parmar, B. S. Neem oil content and its key chemical constituents in relation to the agro-ecological faactors and regions of India *Pestic. Res. J.* **1997**, 9, 216-225.

égale ou légèrement inférieure à celles des régions de Dakar et Thiès si la pluviométrie était le seul facteur responsable de la production en Aza-A dans les amandes. Cependant avec un type de sol différent nous pouvons dire que le sol de la région de Matam n'est pas propice à la formation d'Aza-A dans les amandes. En plus du sol le climat de la région serait défavorable à la production d'Aza-A.

La région de **Louga** donne la même teneur d'Aza-A (0.2 %) que celle de Matam. Elle a une moyenne pluviométrique annuelle maximale de 320.5 mm ; son sol est à dominante ou rouges. Le résultat de la région comparé à ceux de Dakar et Thiès conduit aux mêmes constats faits sur la région de Matam : le sol est un facteur déterminant sur la production en Aza-A.

La région de **Tambacounda**, toujours dans la même tranche pluviométrique (395,0 mm) ; avec un sol dominé par deux types : ferrugineux tropicaux et peu évolués d'érosion, possède une teneur de 0.2 % en Aza-A dans les amandes de fruits de neem. Ce résultat montre que le sol de cette région n'est pas non plus propice à la production de l'Aza-A. Car sa pluviométrie reste comparable à celles de Dakar et Thiès.

Les graines de la région de **Kaolack** avec une pluviométrie maximale de 732,05 mm ont la plus faible teneur en Aza-A (0,1 %). Les sols de la commune de Kayemor où la collecte a été effectuée correspondent aux ceux de texture limon argileux. Ce résultat incomparable à ceux de Dakar et Thiès montre de plus que la pluviométrie n'est pas seule responsable de la formation d'Aza-A dans les fruits. Pour la région de Kaolack il faut noter que la faible teneur peut en partie être attribuée à la vieillesse des amandes utilisées pour l'extraction.

La région de **Diourbel** possède une teneur maximale de 0,2 % en Aza-A dans les fruits. Cette région, dont le sol est dominé essentiellement par les sols ferrugineux tropicaux communément appelés « diors » avec une pluviométrie de 321.7 mm a une teneur très inférieure à celle des régions de Dakar et Thiès. Du point de vue quantité de pluies enregistrées, ces trois régions sont dans la même fourchette. Mais les sols sont très différents.

Nous retenons dans cette étude comparative que les moyennes pluviométriques de plus de 350 mm par an avec des sols minéraux ou argilo calcaire sont les conditions meilleures de biosynthèse d'Aza-A dans les fruits de neem. Pour la collecte future dans le pays les régions de Thiès et Dakar seront nos principales destinations.

Le mode de séchage au soleil ou à l'ombre n'affecte pas la teneur en Aza-A dans les amandes. Cependant que le mode de séchage fait apparaître une différence nette en

pourcentage d'Aza-A dans les extraits techniques. Pour toutes les régions étudiées le séchage au soleil donne les meilleurs résultats du point de vue teneur en Aza-A dans les extraits techniques. Pour une commercialisation des produits technique (poudre d'azadirachtine) la forte teneur en Aza-A est une condition essentielle pour une bonne compétitivité dans le marché. Avec les fruits séchés à l'ombre la pureté reste faible et nécessite une purification de l'extrait brut pour obtenir un bon pourcentage d'Aza-A. Cette étape de purification augmente le coût de la production. Or une hausse du coût de la production entraîne une hausse de prix de vente. Ce qui réduit la compétitivité de notre produit. Par ce résultat nous retenons que le mode séchage n'impacte pas la teneur en Aza-A mais plutôt celle d'autres composés de la graine.

Les résultats obtenus sur le mode de séchage vont complètement à l'encontre de nos attentes ; car l'instabilité de l'Aza-A au soleil entraînerait une perte du principe actif. Ce résultat vient confirmer ceux publiés par *Jarvis et al*<sup>91</sup> qui ont montrés que la molécule d'Aza-A est assez stable en phase solide.

Dans la préparation de l'étalon nous nous sommes rendu compte qu'aucune technique prise seule ne permet de donner une bonne pureté de l'extrait destiné au dosage. La combinaison de la chromatographie flash automatisée (biotage) et de la CLHP préparatrice a conduit à la meilleure pureté. Ce produit d'une pureté de plus 95 % a servi d'étalon pour le dosage de l'Aza-A dans tous nos extraits techniques.

Entre la teneur en Aza-A dans les fruits secs, l'humidité relative, et la pluviométrie une bonne corrélation a été trouvée par *Gupta et al*<sup>144</sup>. Selon *Gupta et al 2010* les sites appropriés pour la production d'Aza-A sont les régions à basse température (30 - 35° C) et humidité comprise entre 45 % et 55% au cours de la période de floraison jusqu'à la maturité des fruits. *Elteraifi et Hassanali* trouvent en **2011**, en plus des conditions données par *Gupta et al 2010*, qu'une pluviométrie de 400 mm et une altitude de plus de 470 m au dessus de la mer est propice à la production d'Aza-A<sup>145</sup>.

---

<sup>144</sup> Gupta, V.K., Ahlawat, S.P., Kumar, R.V., Datta, A., Effect of season and year on azadirachtin-A and oil content in neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seeds and relationship of azadirachtin-A and oil content with rainfall, temperature and humidity. *Curr. Sci.* 99, **2010**, 953-956.

<sup>145</sup> Elteraifi, I.E., Hassanali, A., Oil and azadirachtin contents of neem (*Azadirachita indica* A. Juss.) seed kernels collected from trees in different habitats in Sudan. *Intl. J. Biol. Chem.* 5, **2011**, 1063-1072.

L'analyse de nos résultats<sup>146</sup> portant sur la corrélation entre les conditions pédoclimatiques et la teneur en Aza-A confirme les résultats précédemment cités.

Une corrélation positive est notée entre la teneur en zinc du sol et celle en Aza-A. Alors que pour le phosphore et la potasse cette corrélation est négative<sup>147</sup>. Les fruits, collectés dans des zones aux sols de pH (8.05) alcalin, ont une teneur élevée en Aza-A (2.75 mg/g de fruits secs) soit 0.275% de plus pour les fruits en provenance des régions aux sols acide (pH 5.35-6.43)<sup>148</sup>. La couleur pourrait indiquer l'état de leur maturité et leur teneur en molécules phytochimiques. Par exemple les fruits totalement jaunes possèdent 35 % de moins d'Aza-A par rapport aux fruits de couleur vert-jaune<sup>149,150</sup>. L'âge et la taille des arbres n'ont pas montré une influence notable sur la teneur en Aza-A<sup>151,152</sup>, bien que la teneur maximale (2813 ppm) a été trouvée avec les arbres d'âges moyens<sup>153</sup>. En conclusion *Gahukar 2014* retient que la sélection des fruits peut être basée en partie sur la couleur.

---

<sup>146</sup> Ndiaye N. Héran V., Parrain J-L., Galledou B. S., Impact of climatic factors on Azadirachtin –A (Aza-A) content in neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds of Senegal. *International Review of Chemical Engineering (I.R.E.C.H.E.)*, Vol. 7, n. 2, **2015**, 45 - 48.

<sup>147</sup> Pattnaik, S.J., Raghupati Rao, N.D., Chary, P., Ecomorphometric markers reflect variations in azadirachtin content of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) in select regions of Andhra Pradesh, India. *Curr. Sci.* 91, **2006**, 628-636.

<sup>148</sup> Gahukar, R.T., Factors affecting content and bioefficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) phytochemicals used in agricultural pest control, *Crop Protection* , 62, **2014**, 93-99.

<sup>149</sup> Salako, E.A., Anjorin, S.T., Garba, C.D., Omdohunnu, E.B., A review of neem biopesticide utilization and challenges in Central Northern Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 7, **2008**, 4758- 4768.

<sup>150</sup> Angulo-Escalante, M.A., Gardea-Bejar, A.A., Roch, R.V., Garcia-Estrada, R.S., Carrillo- Fasio, A., Chaidez- Quiroz, C., Partida-Lopez, J.I., Azadirachtin-A content in neem seeds (*Azadirachta indica* A. Juss.) collected in Sinaloa, Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 27, **2004**, 305-311.

<sup>151</sup> Cha-Um, S., Kirdmanee, C., Champahem, S., Atanon, P., Physiological and morphological adaptation of a higher content of azadirachtin in Thai neem (*Azadirachta siamensis* Val.) to field trial. *Acta Hort.* 765, **2008**, 137-142.

<sup>152</sup> Tomar, U.K., Singh, G., Kaushik, N., Screening of *Azadirachta indica* tree for enhancing azadirachtin and oil contents in dry areas of Gujarat, India. *J. For. Res.* 22, **2011**, 217-224.

<sup>153</sup> Tomar, U.K., Kaushik, N., Neem (*Azadirachta indica* A. Jussieu) biodiversity in India for bioresource-azadirachtin: an important biopesticide. *Asian J. Exp. Sci.* 25, **2011**, 15 - 21.

Le meilleur stade de collecte des fruits est lorsque 20 % des fruits sur l'arbre sont jaunes ; dans ce cas 75 % sont physiologiquement mûrs mais restent verts<sup>154</sup>. Les fruits collectés doivent être extraits avant six mois pour s'assurer que la quantité initiale en Aza-A n'a pas trop baissée. Pour cela les amandes sont gardées dans un endroit sec et aéré. Dans ces conditions le maximum de perte est de 20 % ; sinon elle peut atteindre 32 % en quatre mois de stockage<sup>155</sup>.

---

<sup>154</sup> Gahukar, R.T., Commercial and industrial aspects of neem-based pesticides. *Pestology* 22 (10), **1998b**, 15- 41.

<sup>155</sup> Yakkundi, S.R., Thejavathi, R., Ravindranath, B., Variation of azadirachtin content during growth and storage of neem (*Azadirachta indica*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 43, **1995**, 2517- 2519.

## *Conclusión et Perspectives*

Vu les problèmes causés par les pesticides de synthèse dont le glyphosate, pesticide le plus utilisé au monde (qui entre dans la composition de près de 750 produits phytosanitaires), trouver des alternatives à ces molécules est devenu une priorité pour toute la planète. Cependant une alternative purement "bio" reste l'idéale pour tous. Le neem depuis plusieurs décennies a été proposé comme une alternative. Dans beaucoup de pays des extraits bio-pesticides issus de cette espèce sont mis dans le marché. Notre pays dispose d'une bonne réserve d'arbres de neem dont l'exploitation des graines peut couvrir les besoins en produits phytosanitaires.

Notre but dans ce travail est de déterminer les conditions de collecte des graines : ramassage ou cueillette, le mode de séchage (au soleil ou à l'ombre), la comparaison de la teneur en Aza-A selon l'état de maturité des graines et de leurs régions de provenance. Cette approche nous permet d'avoir une bonne orientation dans la collecte future des graines selon les régions où une bonne teneur a été obtenue. L'étude des impacts climatiques sur la teneur en Aza-A dans les graines constitue une partie essentielle dans notre travail.

Nous avons abordé la synthèse bibliographique par une présentation générale du Sénégal : sa population, son économie etc. Nous avons remonté les origines de l'utilisation des plantes dans la lutte contre les insectes dans le monde et au Sénégal particulièrement. Il faut noter que les extraits aqueux de fruit de neem sont utilisés de façon artisanale depuis longtemps dans la culture maraîchère.

L'extraction des amandes de neem par la méthode de polarité croissante a conduit à l'obtention d'une poudre d'azadirachtine technique avec des teneurs variables en Aza-A. Par le dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en phase inverse, nous avons trouvé que la meilleure teneur est obtenue avec l'extraction sur pilote (55.23 % d'Aza-A). Avec le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O les teneurs en Aza-A varient de 54.18 % pour les fruits de la région de Dakar à 11.35 % pour ceux provenant de Kayemor de la région de Kaolack.

A l'issue des dosages CLHP des différents extraits nous avons pu remonter les calculs pour déterminer la teneur de la molécule d'Aza-A dans les graines.

Les graines de la région de Dakar et Tivaoune (région de Thiès) renferment la plus grande teneur avec 0.5%. Mais pour ces mêmes régions nous notons une baisse de 0.1% d'Aza-A dans les graines de fruits ramassés par terre.

Elles sont suivies par les régions de Diourbel, Louga et Matam avec des teneurs de 0.2 %. Il faut noter que pour la région de Diourbel les graines ramassées en provenance de Touba présentent une baisse de 0.1 % ; comme c'était le cas avec les régions de Dakar et Thiès.

La région de Tambacounda plus précisément le département de Backel a des graines avec une teneur de 0.1 %. Cependant il faut noter que dans cette région nous n'avions pas pu trouver des graines non mûrs. De ce fait nous ne pouvons pas dire que c'est dû à une baisse de 0.1 % comme précédemment avec les régions Dakar, Thiès, Diourbel, Louga et Matam.

La région de Kaolack donne la plus faible teneur avec 0.04 %. Les graines de cette région ont été ramassées. Avant le tri nous avons noté qu'une bonne partie des amandes étaient défectueuses.

L'étude comparative des proportions de la composition du mélange alcool/eau montre que le rapport 45/55 reste le meilleur mélange pour extraire l'Aza-A des amandes. Ce mélange permet d'extraire tout l'Aza-A avec une grande sélectivité. Le **tableau 27** donne les résultats comparatifs des mélanges 45-55 (alcool/eau) et 100% alcool. Il montre que le rendement massique est dix fois supérieur avec 100 % alcool mais avec un pourcentage d'Aza-A dans l'extrait technique de seulement 2.89 %. L'extrait obtenu avec 100 % alcool comme le montre la **photo 13** reste peu compétitif pour un produit destiné à la vente sur le marché tant pour sa teneur en Aza-A que sa couleur et sa texture.

Une comparaison entre le méthanol et l'éthanol montre que le méthanol en mélange avec l'eau donne un meilleur résultat que l'éthanol (les résultats sont donnés dans le **tableau 28**). Mais pris individuellement l'éthanol reste légèrement meilleur solvant. De tous les deux alcools l'eau à 100 % donne le meilleur pourcentage d'Aza-A avec plus de 20 % (voir **tableau 29**).

Le volume de solvant d'extraction a un impact très évident sur la teneur en Aza-A dans l'extrait technique d'azadirachtine. Le pourcentage d'Aza-A et le rendement d'extraction évoluent en sens inverse. En effet le rendement d'extraction augmente avec le rapport  $n=V_s/M_t$ . cette hausse du rendement peut se justifier par la non saturation du solvant d'extraction.

Le pourcentage d'Aza-A dans l'extrait technique d'azadirachtine baisse quand le rapport est grand. L'Aza-A étant très soluble dans le solvant d'extraction, elle passe en solution dès les premières minutes d'extraction.

Trois rapports de mélange alcool / eau ont été utilisés dans cette étude 35/65, 45/55 et 50/50. Cependant les meilleurs résultats ont été obtenus avec le rapport 45/55. Il donne un rendement massique très bon avec une teneur en Aza-A dans l'extrait technique assez forte.

Les tests sur pilote qui ont conduit à des résultats très satisfaisants ont été effectués avec ce rapport (45/55).

Dans la préparation de l'étalon plusieurs méthodes ont été utilisées mais aucune méthode prise seule n'a permis d'avoir une pureté comparable à celle autorisée pour servir d'étalon. La Purification par chromatographie flash automatisé suivie de la CLHP préparatrice a donné la meilleure pureté obtenue pour déterminer notre droite de calibration. La purification par précipitation, sur colonne de micro-silice et par recristallisation n'ont pas donné de bons résultats. Il faut noter que la méthode par précipitation conduit à des puretés satisfaisant pour des extraits destinés à la formulation. Car pour la formulation la pureté peut ne peut pas atteindre celle des étalons.

L'huile de neem possède une teneur en Aza-A de 0.06 %. Le calcul de la teneur dans l'extrait technique à partir de l'huile donne un pourcentage de 13.14 %. Ces résultats montrent que l'Aza-A est présente dans l'huile. Cette présence se justifie en partie par la solubilité de la molécule dans l'huile. Pour amoindrir les pertes lors de la délipitation nous avons opté d'utiliser le soxhlet qui est une méthode douce. Car il y'a absence totale de choc comme dans l'extraction par agitation. Le solvant lors de son séjour dans la cartouche n'est pas chauffé.

Les meilleurs résultats d'extraction (rendement massique) et de la teneur en Aza-A (dans l'extrait technique) sont obtenus avec la granulométrie comprise entre 1.25 mm et 1.6 mm.

La production d'Aza-A est hautement influencée par les facteurs environnementaux comme avaient trouvé en 2010 *Gupta et al*<sup>156</sup>. Selon eux les régions à basse température (30° C – 35 ° C) et à humidité de 45-55 % pendant la période de floraison jusqu'à la maturité ont une meilleur production en Aza-A.

***Les conditions pédoclimatiques des régions de Dakar et Thiès sont les meilleures pour une bonne production en Aza-A dans les amandes de fruits de neem. Dans l'exploitation future à l'échelle industrielle les régions de Thiès et Dakar seront nos principales destinations dans la collecte des graines. La cueillette sera notre principale mode de collecte et le séchage au soleil retenu comme meilleur technique.***

---

<sup>156</sup> Gupta, V. K ; Ahlawat, S.P. ; Kumar, R.V. ; Datta, A. ; *Curr. Sci.* 99 (7); **2010**; 953-956

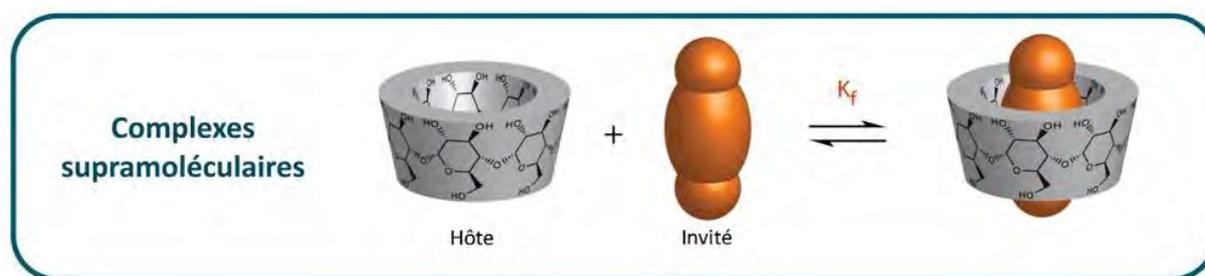
*Nous avons noté dans cette étude que la période de fructification des arbres de neem du Sénégal reste très hétérogène.*

En perspective nous comptons mener les travaux suivants :

- ❖ Une comparaison sur le plan génétique des arbres des différentes régions reste à faire dans l'optique de donner une conclusion exhaustive sur la production d'Aza-A dans les fruits de neem (*Azadirachta indica* A. Juss).
- ❖ L'élaboration d'une formulation à base d'Aza-A dans l'eau reste un objectif pour bien mener à terme cette étude de valorisation des fruits de neem du Sénégal qui possèdent une bonne teneur en principe actif. Ainsi nous aurons contribué au retrait total ou à la baisse de l'utilisation des pesticides de synthèse dans l'agriculture sénégalaise particulièrement et du monde entier généralement.

Dans ces perspectives de formulations l'une des méthodes retenues reste l'utilisation de la cyclodextrine et certains de ses analogues comme capsules. Le choix de la cyclodextrine se justifie par sa faible toxicité. La solubilité de l'Aza-A dans l'eau qui est de 50 µg/mL<sup>157</sup> augmente jusqu'à 2.7 mg /mL en utilisant le β -cyclodextrine (β - CD) et 3.5 mg/mL avec le permethyl- β -Cyclodextrine (PMβCD).<sup>158</sup>

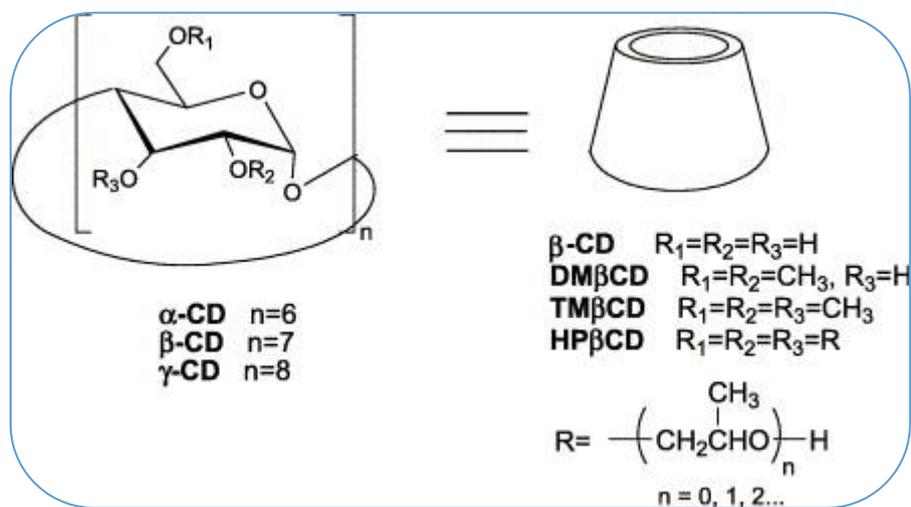
**Figure 73** : Schéma du principe d'encapsulation (inclusion)



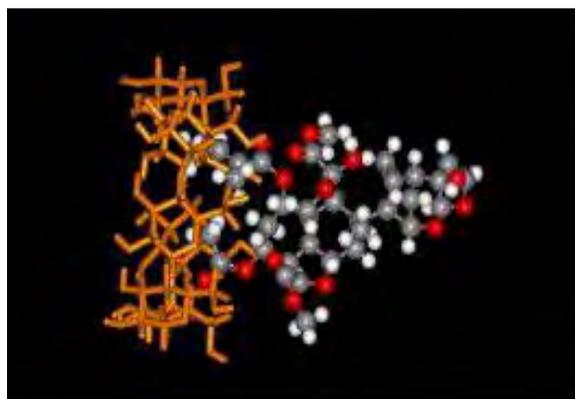
<sup>157</sup> From a Pesticide Information Project of Cooperative Extension Offices of Cornell University, Michigan State University, Oregon State University, and University of California at Davis

<sup>158</sup> Yu Liu, Guo-Song Chen, Yong Chen, Jun Lin Inclusion complexes of azadirachtin with native and methylated cyclodextrins: solubilization and binding ability, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Volume 13, Issue 12, 2 June 2005, Pages 4037–4042

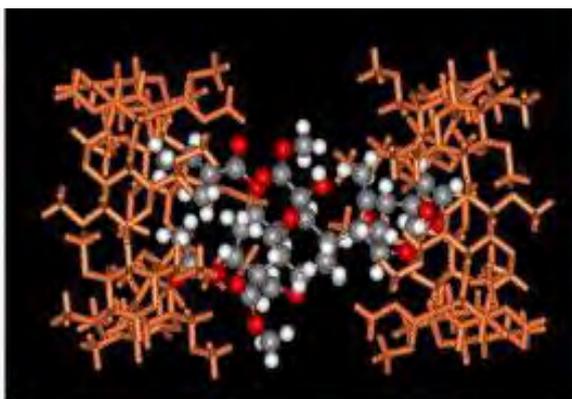
Dans nos travaux l'invité est l'Azadirachtine-A ; l'hôte est : le  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) ou le permethyl- $\beta$ -Cyclodextrine (PM $\beta$ CD).



**Figure 74** : Structures du  $\beta$ -Cyclodextrine et analogues



Complexe  $\beta$ -CD- Azadirachtine -A (1 :1)



Complexe PM $\beta$ CD- Azadirachtine - A (2 :1)

**Figure 75** : Modes d'inclusions possibles des complexes  $\beta$ -CD-Azadirachtine -A et PM $\beta$ CD- Azadirachtine - A

*Article de la Thèse*

# International Review of Chemical Engineering

## *Rapid Communications* (IRECHE)

Contents:

<b>Transitional Heat Transfer and Pressure Drop in Plain Horizontal Tubes</b> <i>by Ventsislav D. Zimparov, Plamen J. Bonev, Valentin M. Petkov</i>	37
<b>Impact of Climatic Factors on Azadirachtin –A (Aza-A) Content in Neem (<i>Azadirachta Indica</i> A. Juss) Seeds of Senegal</b> <i>by Ndiak Ndiaye, Virginie Héran, Jean-Luc Parrain, Boar S. Galledou</i>	45
<b>Study of the Influence Mode of Polishing on the Tribological Parameters and Surface Quality of Nonalloyed Steels</b> <i>by A. Elazzizi, A. Belalia, A. Benamar, A. Maghraoui</i>	49
<b>Numerical Simulation of Combustion in Reactive Porous Media</b> <i>by A. Lapere, G. Debenest, M. Quintard, M. Martins, S. Salvador</i>	60
<b>Physico-Chemical Changes of Human Serum Albumin During in Vivo and in Vitro Glycation Processes</b> <i>by N. Sattarahmady, A. A. Moosavi-Movahedi, M. Habibi-Rezaei, H. Hdi</i>	67



**International Review of Chemical Engineering**  
**Rapid Communications**  
**(IRECHE)**

**Editor-in-Chief:**

**Prof. Jordan Hristov**  
Department of Chemical Engineering  
University of Chemical Technology and Metallurgy  
"KLIMENT OHRIDSKY", Blvd.  
1756 Sofia, 8 – BULGARIA

---

**Editorial Board:**

<b>Abbasov Teymuraz</b>	(Turkey)	<b>Levec Janez</b>	(Slovenia)
<b>Al Hayk Yousef</b>	(U.S.A.)	<b>Luo Lingai</b>	(France)
<b>Assael Marc J.</b>	(Greece)	<b>Marengo Marco</b>	(Italy)
<b>Bennacer Rachid</b>	(France)	<b>Margulis Raul Bautista</b>	(Mexico)
<b>Coppens Marc-Olivier</b>	(U.S.A.)	<b>Oron Alexander</b>	(Israel)
<b>Delichatsios Michael</b>	(U.K.)	<b>Perez Victor Haber</b>	(Brazil)
<b>Denizli Adil</b>	(Turkey)	<b>Pirozzi Domenico</b>	(Italy)
<b>Di Felice Renzo</b>	(Italy)	<b>Poletto Massimo</b>	(Italy)
<b>Esfahani Javad A.</b>	(Iran)	<b>Ravi Kumar</b>	(India)
<b>Fan Maohong</b>	(U.S.A.)	<b>Saghir Ziad</b>	(Canada)
<b>Farid Mohammed</b>	(New Zealand)	<b>Serbezev Atanas</b>	(U.S.A.)
<b>Fernandez –Lahore M.</b>	(Germany)	<b>Sharma Yogesh Chandra</b>	(India)
<b>Gonthier Yves</b>	(France)	<b>Sharypov Oleg Vladimirovich</b>	(Russia)
<b>Gourich Bouchaib</b>	(Morocco)	<b>Shende Rajesh</b>	(U.S.A.)
<b>Gros Fabrice</b>	(France)	<b>Tosun Ismail</b>	(Turkey)
<b>Guo Qingjie</b>	(China)	<b>Valverde Millan Jose-Manuel</b>	(Spain)
<b>Hamdy Abdel Salam</b>	(Egypt)	<b>Wu Guocheng</b>	(China)
<b>Ivanova Viara</b>	(Bulgaria)	<b>Xie Gongnan</b>	(China)
<b>Kosoy Boris</b>	(Ukraine)	<b>Zhu Qingshan</b>	(China)
<b>Krishnaiah Kamatam</b>	(India)	<b>Zhu Jesse</b>	(Canada)
<b>Kulish Vladimir</b>	(Singapore)	<b>Zimparov Ventsislav</b>	(Bulgaria)
<b>Larachi Faical</b>	(Canada)		

---

The *International Review on Chemical Engineering (IRECHE)* is a publication of the **Praise Worthy Prize S.r.l.**. The Review is published bimonthly, appearing on the last day of January, March, May, July, September, November.

Published and Printed in Italy by **Praise Worthy Prize S.r.l.**, Naples, March 31, 2015.

**Copyright © 2015 Praise Worthy Prize S.r.l. - All rights reserved.**

This journal and the individual contributions contained in it are protected under copyright by **Praise Worthy Prize S.r.l.** and the following terms and conditions apply to their use:

Single photocopies of single articles may be made for personal use as allowed by national copyright laws.

Permission of the Publisher and payment of a fee is required for all other photocopying, including multiple or systematic copying, copying for advertising or promotional purposes, resale and all forms of document delivery.

Permission may be sought directly from **Praise Worthy Prize S.r.l.** at the e-mail address:

[administration@praiseworthyprize.com](mailto:administration@praiseworthyprize.com)

Permission of the Publisher is required to store or use electronically any material contained in this journal, including any article or part of an article. Except as outlined above, no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without prior written permission of the Publisher. E-mail address permission request:

[administration@praiseworthyprize.com](mailto:administration@praiseworthyprize.com)

Responsibility for the contents rests upon the authors and not upon the **Praise Worthy Prize S.r.l.**

Statement and opinions expressed in the articles and communications are those of the individual contributors and not the statements and opinions of **Praise Worthy Prize S.r.l.** **Praise Worthy Prize S.r.l.** assumes no responsibility or liability for any damage or injury to persons or property arising out of the use of any materials, instructions, methods or ideas contained herein.

**Praise Worthy Prize S.r.l.** expressly disclaims any implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose. If expert assistance is required, the service of a competent professional person should be sought.

## Impact of Climatic Factors on Azadirachtin –A (Aza-A) Content in Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) Seeds of Senegal

Ndiak Ndiaye<sup>1</sup>, Virginie Héran<sup>2</sup>, Jean-Luc Parrain<sup>2</sup>, Bocar S. Galledou<sup>3</sup>

**Abstract** – Senegal (country of West Africa) has a high potential to produce neem fruit. According to the literature production exceeds 500,000 tons per year, but so far this resource is still under use in this country. People are always use synthetic pesticides that have a negative impact on the human health and have finished showing their limits counters pests of agricultural production. Sampling, based on the collection of neem fruits of four regions of Senegal, has allowed use to determine Azadirachtin–A (Aza–A) contents in neem seeds. A comparative analysis between the Aza–A contents and climatic factors (mean annual temperature, rainfall, soil type) allowed use to detect the Aza–A content is related to rainfall recorded in the region. However regions with annual rainfall exceeding 350 mm have a content of 0.5%. This study allowed use to make a good mapping content in Aza–A in neem seeds in four regions of Senegal, namely: Dakar, Thies (Tivaoune), Diourbel (Touba) and Louga (Ndande). This study will allow proper orientation of future collections for industrial production of technical azadirachtin as part of biological control against pests. Copyright © 2015 Praise Worthy Prize S.r.l. - All rights reserved.

**Keywords:** Azadirachtin–A, Neem Seeds, Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss), Average Rainfall, Aza–A Content Relationship, Sahelian Climate

### I. Introduction

In Africa continent and more particularly in Senegal, alternative bio-pesticides are completely under employed while classical pesticides are intensively used such as for example in the cultivation of plants. In this context, Niayes zone, the main Senegalese place for urban horticultural products exhibits identical problems due to the intensive use of pesticides [1]-[3]. Massive doses of organophosphorous and organochlorinated products are used. These pesticides have been released in environment and groundwater. Among the more effective biopesticides, Azadirachtin-A (Aza-A) is isolated from the seeds of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) that spreads from India to Africa and to the tropical and subtropical areas of China. Since Aza-A induces the death of larvae and pupae and the sterility of the emerged adults in a dose-dependent manner, it is widely used in crops and for environmental protection. Azadirachtin has gained worldwide attention for its insect antifeedant and ecdysone inhibiting properties. It is highly potent at low concentrations against more than 200 agricultural pests [4]. In this context and on the Senegal territory, approximately 20 millions neem trees have been counted and are mainly distributed in the region of Louga, Diourbel, Kaolack, Fatick, Tambacounda, and Kolda.

So the double necessity to decrease the use of imported traditional pesticides and to better respect environment leads us to acquire precise data of the local resources of azadirachtin-A that has the potential to be a safe alternative to the toxic synthetic pesticides [5].

The neem tree yields about 30-40 kg/year of seeds [6] and approximately 80-90% of the trees in Senegal are located in 4 primary production areas marked zones A, B, C, and D.[7] Aza–A (Fig. 2) is a tetranortriterpenoid (C-seco limonoid) present in neem seeds to amounts of 0.2 to 0.6% [8]. Aza–A can be isolated with nearly 100 other limonoids in small amounts from all parts of the neem, but is present at highest concentration in the mature seeds [9], [10].

While Aza–A was present in the extract to the extent of 85%, azadirachtin B and H (see Fig. 2), the two other major components, were present only at concentrations up to 15% [11].



Fig. 1. Map of Senegal with primary neem production zones

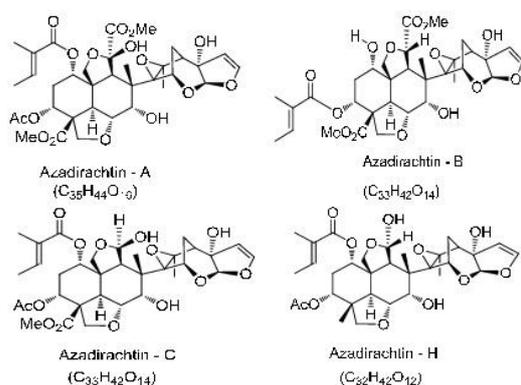


Fig. 2. Chemical structures of Azadirachtin A, B, C and H

## II. Experimental

### II.1. Materials

Fresh neem seeds were collected from Dakar, Tivaoune (Thiès), Ndandé (Louga), Touba (Diourbel) in Senegal and from June to July months. The seeds were dried two weeks in the shade then the kernels were removed from their shells. Petroleum ether (78-49) was purchased from Fisher Scientific. Absolute ethanol (CAS no: 64-17-5), ethyl acetate and *n*-hexane (CAS no: 110-54-3) were purchased from CARLO ERBA Reagents.

The Methanol CHROMASOL® (CAS no 67-56-1) was purchased from Sigma Aldrich. Methyl tertibutyl ether (MTBE) (CAS no: M/4494/25) was purchased from Fisher Scientific. The thin layer chromatographic (silica gel F<sub>254</sub>) plates were purchased from E. Merck.

The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a BRUKER 400 MHz spectrometer in CDCl<sub>3</sub>.

The automated flash chromatography was performed on a biotage SP1. The chromatography was performed on a Hitachi LaChrom® Elite system consisting of a binary LC pump L-2130, a vacuum degasser, a Hitachi L-2455 diode array detector, and a Hitachi L-2200 autosampler.

For analytical analysis, the compounds were separated on a Purospher Star RP18e 5 μm column (150 mm × 4,6 mm) protected by a Purospher Star RP18e 5 μm guard column (5 μm, 10 mm × 10 mm). For preparative chromatography the compounds were separated on a Purospher Star RP18e 5 μm column (100 mm × 10 mm). The mass analysis was performed on an Esquire 6000 ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics), with electrospray ionization source (ESI) interface operated in the positive ion mode. The spectrometer was scanned in positive ion mode from 50 to 1000 m/z.

### II.2. Azadirachtin Rate Determination

#### II.2.1. Extraction Procedure

After the neem seeds were being collected in the four different places, the seeds were dried, peeled and mixed to give a Neem kernel powder. Then 35 g of this neem

kernel powder were delipidated with light petroleum (200 mL) in a Soxhlet apparatus for 3 h. The defatted powder was extracted again with 45% aqueous methanol (160 mL) by stirring at room temperature for 3 h. After filtration, the aqueous methanol extract was concentrated under vacuum to one-ninth of the volume. The resulting aqueous phase was extracted with MTBE (35 mL) to recover the technical Azadirachtins and limonoids.

The combined MTBE were dried with MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. Finally, white solid fractions were obtained and then analyzed by HPLC for determined the rate of Aza- A.

#### II.2.2. Analytical Standard Preparation

##### II.2.2.1. Isolation of Azadirachtin-A by Biotage Flash Chromatography and Preparative HPLC

As commercially available "pure" azadirachtin-A batches were found to be of very poor quality, we decided to prepare our own standard sample using various conditions for the purification of crude aza-A from neem kernels. In order to have authentically sample, a preparative HPLC give pure Aza - A (up to 95 %) which was analysed and checked by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR experiments and by mass spectrometry

A 100 mg amount of the MTBE extract was dissolved in acetonitrile (1 mL), filtered through a Millipore filter (0.45 μm) and then injected into the top a 12 g column (KP-C18-HS SNAP flash Cartridge) using a syringe. The flow-rate was adjusted at 15 mL/min. The column was eluted with several gradients of acetonitrile and water in ratios of 2:8 (450 mL), 3:7 (250 mL), and 3.5:6.5 (250 mL), and finally washed with acetonitrile (75 mL). The eluent was collected in fraction of 10 mL, and an aliquot from each was analysed by HPLC. Similar fractions were pooled and concentrated under vacuum. Then in order to increase the purity, this product was re-chromatographed by preparative HPLC. 10 mg of a mixture Aza-A and Aza-B were separated on a preparative HPLC column by elution with acetonitrile-water (40:60). This operation was repeated twice to give pure Aza-A, which was used as analytical standard. The mass spectrum of Aza-A is reported in Fig. 3.

The molecular ion corresponding to Aza-A was observed at 743 ([M+Na]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR were similar to the literature data [12].

NMR data of Aza-A:

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.93 (1H, q, H-3'), 6.46 (1H, d, H-23), 5.64 (1H, s, H-21), 5.50 (1H, t, H-3), 5.05 (1H, d, H-22), 5.02 (1H, s, OH), 4.76 (1H, t, H-1), 4.74 (1H, d, H-7), 4.67 (1H, d, H-15), 4.61 (1H, dd, H-6), 4.15 (1H, d, H-19), 4.07 (1H, d, H-28), 3.79 (3H, s, CO<sub>2</sub>Me), 3.77 (1H, d, H-28), 3.69 (3H, s, CO<sub>2</sub>Me), 3.63 (1H, d, H-19), 3.35 (1H, d, H-5), 3.34 (1H, s, H-9), 2.84 (1H, s, OH), 2.79 (1H, s, OH), 2.38 (1H, d, H-17), 2.31 (1H, m, H-2), 2.25 (1H, m, H-2), 2.01 (1H, s, 18-Me), 1.94 (3H, s, 3-OAc), 1.85 (3H, s, 5'-Me), 1.78 (3H, d, 4'-Me), 1.76 (1H, m, H-16), 1.74 (3H, s, 30-Me) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 174.10 (s), 172.54 (s), 170.43(s), 166.99 (s), 147.91 (s), 136.37 (d), 129.39 (s), 109.56 (d), 106.11 (d), 104.93 (s), 84.34 (s), 75.15 (d), 74.50 (d), 73.76 (d), 71.22 (t), 69.85 (d), 67.72 (s), 54.07 (t), 53.54 (s), 53.22 (d), 49.41 (nd), 46.11 (q), 45.40 (q), 37.82 (s), 30.53 (s), 25.76 (d), 22.06 (s), 21.67 (d), 19.13(d), 15.09 (nd), 12.73 (t), 24.9 (t), 22.3 (nd), 21.3 (q), 20.8 (q), 18.4 (q), 14.3 (q), 11.9 (q).

### II.2.2.2. Preparation of Standard Solution

Having in hands authentically sample, a plot calibration graph was recorded and used to rapidly determine the Aza-A from different origins.

Standard solution of azadirachtin-A was prepared by dissolving 3.6 mg of the compound in 3.6 mL of acetonitrile. From this, standard dilution (1 mg/mL) was realized into acetonitrile to cover the concentration range 0.1 to 1 mg/mL of Aza-A.

### II.2.2.3. Calibration Curve Construction

Three 10 µL aliquots of each solution were injected onto the HPLC (ELITELaChrom) system connected with a RP-18 column *LiChroCARTT*<sup>®</sup> (150-4.6 mm, 5 µm).

The calibration curve yielded the following equation (see Fig. 4) for areas,  $y = 3e^{+06}x - 8623.2$  ( $y$  = area response,  $x$  = concentrations).

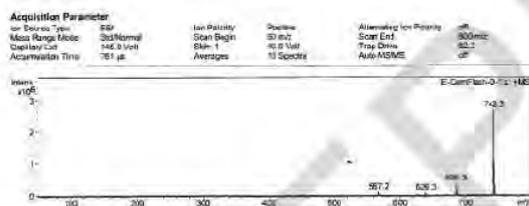


Fig. 3. Mass spectrum of Aza-A (95%)

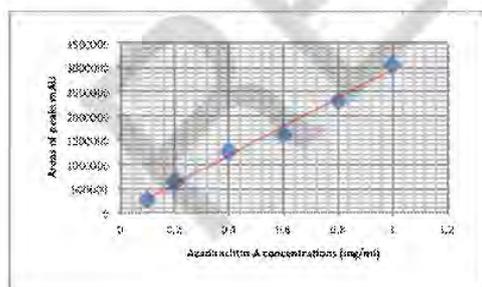


Fig. 4. Curve of calibration

## III. Resultats and Discussion

An efficient method has been developed for the isolation of Aza-A enriched powder concentrates (25 and 45 %) from crude azadirachtin-A extract obtained by the aqueous methanol extraction of the defatted neem seed kernels.

Fruits and seeds of identical state of maturity (ripe) were collected in four regions in Senegal. Details of the weather, soil and rainfall of the different regions are given in the Table I. They were monitored throughout the year during the collection seeds.

TABLE I  
DETAILS OF THE CLIMATIC, SOIL AND RAINFALL  
OF THE DIFFERENT REGIONS

Senegal regions	Average rainfall (mm)	Climate type	Soil type	% Aza-A in kernel
Dakar	522	Microclimate	1 <sup>st</sup> group	0.5 %
Thies (Tivaoune)	381	Sahelian	1 <sup>st</sup> group	0.5 %
Diourbel (Touba)	330	Sahelian	2 <sup>nd</sup> group	0.2 %
Louga (Ndandé)	321	Sahelian	2 <sup>nd</sup> group	0.2 %

1<sup>st</sup> group: hydromorph soils - vertisols - wet areas;  
2<sup>nd</sup> group: brown & brown-red soils, ferruginous soils and exposed feraltic soils

We found that average rainfall would be the most determining factor. The results of this study show that the regions where rainfall is higher than 350 mm per season have a content of Aza-A of 0.5%. On the other hand, the regions situated under the isohyete 350 mm have lower content of Aza-A (0.2%). This difference of 0.3% remains very significant. At this level of our study, only the rainfall recorded could justify this difference in the various corresponding regions and by the type of ground. We can conclude that climatic data of the various regions allow hardly justifying the difference in the content of Aza-A knowing that for regions having the same climate, Thiès and Diourbel for example, had different contents of Aza-A. These results are in good agreement with the results obtained by Kumar *et al* [13] for some neem ecotypes of India and also with the results of Sidhu *et al* [14] showing that a low ratio of azadirachtin A to B was observed from regions under stress of aridity, salinity, or alkalinity.

## IV. Conclusion

We have described a new protocol to obtain good technical purity (up to 45%) and very pure sample of Aza-A.

This first study in sahelian environment reveals a strong relationship between Aza-A and average rainfall which is in accord with the previous studies realized in India. Nevertheless, a weak effect of the soil nature has been featured.

## Acknowledgements

N. Ndiaye thanks to Service of Cooperation and Cultural Action (SCCA) of the Embassy of France in Senegal and the University Agency of Francophonie (UAF).

## References

- [1] I. Cissé, S. T. Fall, Y. Akimbamijo, Y. M. Diop, S.A. Adediran. L'utilisation des pesticides et leurs incidences sur la contamination des nappes phréatiques dans la zone des Niayes au

- Sénégal. In: O.O. Akimbamijo, S.T. Fall, O. B. Smith. *Advances in crop-livestock integration in West African cities*. Ottawa, CRDI, (2002), 85-100.
- [2] I. Cissé, A.A. Tandia, S.T. Fall, E.S. Diop. Usage incontrôlé des pesticides en agriculture urbaine et périurbaine : cas de la zone des Niayes au Sénégal. *Cahier Agriculture*, 12, (2003), 181-6.
- [3] C.S. Wade. *L'utilisation des pesticides dans l'agriculture périurbaine et son impact sur l'environnement. Etude menée dans la région de Thiès*, Thèse de Pharmacie, Dakar, n°66, 2003.
- [4] H. Schmutterer Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, (*Azadirachta indica*). *Annu. Rev. Entomol.*, 35, (1990), 271-297.
- [5] R. Thejavathi, S.R. Yakkundi, B. Ravindranath, Determination of azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard. *Journal of Chromatography A*, 705, (1995), 374-379.
- [6] J.H. Butterworth, and E.D. Morgan, Isolation of a substance that suppresses feeding in locust. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1968), 23-24.
- [7] J. Reynolds, P. Nugawela, M. Diop, neem value chain Senegal: analysis and strategic framework for sub-sector growth initiatives. *International Resources Group, Washington, DC 20036*, (2007), 1-33.
- [8] T.R. Govindrachari, S.P.G. Sandhya Raj, Azadirachtins H and I: Two New Tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*, *J. Nat. Prod.*, 55, (1992), 596-601.
- [9] P. Caboni, G. Sarais, A. Angioni, A.J. Garcia, F. Lai, F. Dedola, P. Cabras. residues and persistence of neem formulations on strawberry after field treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 54, (2006), 10026-10032.
- [10] T.R. Govindrachari. chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (the neem tree). *Current Science*, 63, (1992), 117-122.
- [11] H. Rembold. *Azadirachtins In Insecticides of Plant Origin*. J.T. Amason, B.J.R. Philogene, P. Morand (Ed). *American Chemical Society Symposium Series 387, American Chemical Society: Washington DC*, 150, (1989)
- [12] G.E. Veitch, A. Pointo, A. Boyer, E. Beckmann, J.C. Anderson, S. V. Ley synthesis of natural products from the indian neem tree (*Azadirachta indica*). *Organic letters*, 10, (2008), 569-572.
- [13] J. Kumar, B. S. Parmar. Neem oil content and its key chemical constituents in relation to the agro-ecological factors and regions of India. *Pestic. Res. J.*, 9, (1997), 216-225.
- [14] O.P. Sidhu, V. Kumar, H. M. Behl. Variability in Neem (*Azadirachta indica*) with Respect to Azadirachtin content. *J. Agric. Food Chem.*, 51, (2003), 910-915.

## Authors' information

<sup>1</sup>Departement de Chimie, Faculté des Sciences, Université Cheikh-Anta-Diop, Dakar, Senegal.

<sup>2</sup>ISM2 – UMR Aix Marseille Université Centrale Marseille CNRS n°7313, Campus scientifique de St Jérôme, service 532, Avenue Escadrille Normandie Niémen, 13397 Marseille cedex 20 - France 99.

<sup>3</sup>Departement de Chimie, Faculté des Sciences, Université Cheikh-Anta-Diop, Dakar, Senegal.



**Ndiak Ndiaye** (April 30, 1984) Koungheul ; Senegal.

✓ *Research Experience*

**2011-2014: Ph.D.** Cheikh Anta DIOP University, Senegal and Aix-Marseille Université, France, Supervisors: Pr Bocar S. Galledou and Dr. Jean-Luc. Parrain.

Extraction and characterization of neem seeds. Focus mixture purification technique of Azadirachtins. Determination of distribution of the molecule of azadirachtin -A in neem seed. Determination of the impact of climate and soil factors on the production of azadirachtin in neem seeds.

✓ *Education*

**2011-2014** :Ph.D. in Organic Chemistry with Cheikh Anta DIOP University and the highest honours, Aix-Marseille Université (AMU), France

**2008 – 2010**: Master Degree in Organic Chemistry with Cheikh Anta Diop University.

**2004-2007**: license Degree in Organic Chemistry with Cheikh Anta Diop University.

✓ *Teaching*

Undergraduate Practical Work Supervisor, Organic and inorganic Chemistry. Supervision and training of undergraduate students in the lab.

✓ *Awards & Membership*

Honorific doctoral grant from the Service of Cooperation and Cultural Action (SCCA) of the Embassy of France in Senegal (grant 2010 2013). Honofique master 2 grant from the University Agency of Francophonie (UAF). Member of French Chemical Society (SCF) since 2010

# ***International Review of Chemical Engineering Rapid Communications (IRECHE)***

## **Aims and scope**

The **International Review of Chemical Engineering (IRECHE)** is a peer-reviewed journal that publishes original theoretical and applied papers on all fields of the Chemical Engineering. The topics to be covered include, but are not limited to:

*Biochemical and biomolecular engineering; Bioreactors ; Process Fluid dynamics (pipe flow, mixing, rheology-experiments, Multi-phase flow and so on); Flows with phase change; Coating processes and technology; Computer aided process engineering; Heat transfer (both modelling and experimental results pertinent to problems in chemical engineering, mechanical engineering and biotechnology); Heat and mass transfer (modelling, equilibrium, adsorption, absorption, extraction, etc); New reactors, thermodynamics and thermodynamic optimization of reactors, catalysts, devices and processes; Entropy and Energy analysis of chemical and biotechnological process and optimization; Transport phenomena and process analysis and synthesis, Scale-up, scale-down , modelling and simulation; Fluidization-broad aspect: Gas-solid, Liquid-solid, Gas-liquid-Solid; Fluidized ed combustion processes Separations processes (sedimentation, filtrations, membrane filtration, etc.); Process safety and physics of accidents in chemical technology, Risk analysis; Powder mechanics in both models and experiments; Alternative fuels (such as new developed ones and utilization of wastes: derivation, analysis and combustion performance); Combustion, pyrolysis, gasification, etc.; Environmental chemical and biotechnological engineering; External field assisted process including applications of electric fields, magnetic fields, ultrasound, vibrations, etc.; Physical metallurgy and micro-metallurgy; New materials, Polymers and composites; Process Control, Process Design, Process Development and Process intensification; Wastes: new material based on waste conversion; engineering methods for waste treatment and management; New and important applications and trends.*

---

## **Instructions for submitting a paper**

Contributions may consist of invited tutorials or critical reviews; original scientific research papers (regular paper); letters to the Editor and research notes which should also be original presenting proposals for a new research, reporting on research in progress or discussing the latest scientific results in advanced fields.

All papers will be subjected to a fast editorial process.

Any paper will be published within two months from the submitted date, if it has been accepted.

Papers must be correctly formatted, in order to be published.

Formatting instructions can be found in the last pages of the Review.

An **Author guidelines** template file can be found at the following web address:

[www.praiseworthyprize.org/jsm/?journal=ireche](http://www.praiseworthyprize.org/jsm/?journal=ireche)

Manuscripts should be sent via e-mail as attachment in .doc and .pdf formats to:

[info@praiseworthyprize.it](mailto:info@praiseworthyprize.it)

The regular paper page length limit is defined at **15** formatted Review pages, including illustrations, references and author(s) biographies.

**Pages 16 and above are charged 10 euros per page and payment is a prerequisite for publication.**

---

## **Subscription rates:**

### ***on Cd-Rom, per year:***

Institutional: 350\* (euros)

Individual: 350\* (euros)

Individual Article: 50 (euros)

### ***Print copy, per year:***

350\*\* (euros)

350\*\* (euros)

65\*\* (euros)

\* To be downloaded

\*\* Shipment costs to be charged

---

## **Abstracting and Indexing Information:**

*Academic Search Complete - EBSCO Information Services*

*Cambridge Scientific Abstracts - CSA/CIG*

*Index Copernicus (Journal Master List): **Impact Factor 6.42***

**Autorizzazione del Tribunale di Napoli n. 1 del 2/2/2009**

PREPRINT

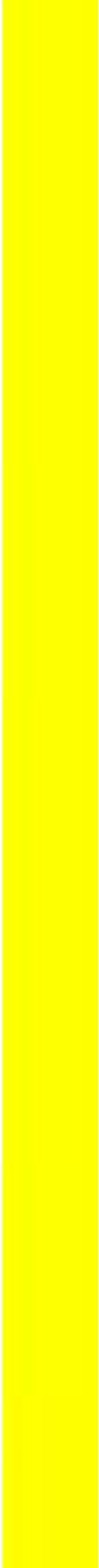


Praise Worthy Prize



2035-1755(201503)7:2;1-1

Copyright © 2015 Praise Worthy Prize S.r.l. - All rights reserved



**Nom et prénoms : NDIAYE Ndiak**

**Titre de la thèse :** Mise au point de protocoles d'extraction de l'azadirachtine à l'échelle du laboratoire et semi-industrielle (pilote). Purification, dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) de la teneur en Azadirachtine-A (Aza-A) dans les fruits de neem de différentes régions du Sénégal. Impact des facteurs pédoclimatique sur la production en Aza-A dans les fruits.

**Résumé :** A l'instar de tous les pays du Sahel, le Sénégal se trouve confronter à un problème devenu préoccupant juste après la sécheresse : la protection des végétaux, des récoltes et des stocks. Dans le but d'apporter une lutte efficace et éco compatible nous avons jugé utile de faire recours au Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) qui est fortement présent au Sénégal et dont les vertus ne sont plus à démontrer. Mais ces dernières années, la maîtrise des facteurs naturels (pédoclimatique) liés à la variabilité de la teneur en molécule actives dans ses fruits est l'une des problématiques qui font l'objet d'étude dans plusieurs laboratoires. Notre approche est partie par la mise au point de protocoles d'extraction de l'azadirachtine à l'échelle du laboratoire et semi-industriel (pilote). Le dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) de la teneur en Aza-A a été effectué dans les fruits de neem provenant de sept régions différentes du Sénégal. Dans l'objectif de maîtriser les conditions de collecte des fruits, un échantillonnage basé sur l'état de maturité des fruits et du mode de séchage (au soleil ou à l'ombre) a été réalisé. L'extraction de l'Aza-A a été effectuée avec différents solvants (alcool ou eau) pris seuls ou en mélange (alcool et eau) à différentes proportions. Le résultat du dosage de l'Aza-A montre que le mélange de solvants (alcool/eau) est plus sélectif pour l'extraction. Les extraits techniques issus de l'extraction mélanges alcool eau renferment des teneurs en Aza-A de plus de 45 % dans certaines régions. Le rapport 45-55 alcool / eau donne le meilleur résultat d'extraction de l'Aza-A. La comparaison des résultats d'extractions des fruits séchés au soleil et à l'ombre montre que les extraits techniques provenant des fruits séchés au soleil sont plus riches en Aza-A. Les résultats d'extraction au pilote montrent que la technique élaborée au laboratoire est bien adaptable à l'échelle industrielle.

Des sept régions de collectes dans cette étude, les fruits de neem des régions de Dakar et Thiès renferment la teneur la plus élevée en Aza-A ; qui est de 0.5 %. La plus faible teneur (0.1 %) est notée dans la région de Kaolack. Une teneur de 0.2 % a été notée dans les régions de Diourbel, Louga, Matam et Tambacounda.

**Mots clés :** *Azadirachta indica* (Neem), Fruits de Neem, Teneur en Azadirachtine-A (Aza-A), Extraction, Facteurs pédoclimatiques.

---

**Name and first name: NDIAYE Ndiak**

**Thesis title:** Development of protocols to extract azadirachtin in laboratory scale as well as in semi-industrial (pilot). Determination of azadirachtin-A (Aza-A) content in neem seeds from different regions of Senegal by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Impact of soil and climate factors on Aza-A content in neem seeds.

**Summary:** Like all countries of the Sahel region, just after facing a severe drought crisis, Senegal is confronting serious problems, such as: the protection of plants, crops and stocks. In order to provide effective and eco-compatible solution to circumvent this problem, we propose to use Neem seeds extract (*Azadirachta indica* A. Juss) which is strongly present in Senegal and whose benefit to mankind are well established. In fact, in recent years, control of natural factors (soil and climate) that govern the variation in concentration of the active molecule in fruit is one of the issues that are currently under study in several laboratories worldwide.

Our approach started with the development of protocols to extract azadirachtin in laboratory scale as well as in semi-industrial (pilot). In this study, the dosage by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of Aza-A content in neem fruits from seven different regions of Senegal has been made. With our goal to better control fruit collection conditions, samples based on the ripeness of the fruits as well as the drying mode (sun or shade) was collected. The extraction of Aza-A was performed with different solvents (alcohol or water) alone or in a mixture (alcohol and water) in different proportions. The titration result of Aza-A shows that the solvent mixture (alcohol / water) is more selective for the extraction of Aza-A. Technical samples from extraction mixtures of alcohol and water solvents contain Aza-A level greater than 45% in some areas. Moreover, the ratio 45-55 alcohol / water gives the best extraction result of Aza-A. Comparing the results of extractions fruit dried in the sun or in the shade shows that the technical extracted from sun-dried fruits are richer in Aza-A. In addition, the extraction result obtained with the pilot showed that our laboratory extraction method is well adaptable to an industrial scale.

Neem seed collection of the seven regions in this study, revealed that regions of Dakar and Thiès have the highest content of Aza-A; which is 0.5% of the seed weight. The lowest Aza-A content (0.1%) was observed in seeds from the Kaolack region, while a content of 0.2% was obtained in the regions of Diourbel, Louga, Tambacounda and Matam.

**Keywords:** *Azadirachta indica* (Neem), Neem Seeds, Azadirachtin-A content, Extraction, soil and climatic factors.

