

Production et analyse d'huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales de Madagascar. Caractérisation par RMN13C, CPG(Ir) et CPG-SM

Delphin Justin Rabehaja Rakotondragaby Rabehaja Rakotondragaby

▶ **To cite this version:**

Delphin Justin Rabehaja Rakotondragaby Rabehaja Rakotondragaby. Production et analyse d'huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales de Madagascar. Caractérisation par RMN13C, CPG(Ir) et CPG-SM. Chimie organique. Université Pascal Paoli; Université d'Antananarivo. Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo (ESPA) (Ambohitsaina), 2013. Français. NNT : 2013CORT0005 . tel-01086548

HAL Id: tel-01086548

https://theses.hal.science/tel-01086548

Submitted on 24 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
ECOLE SUPERIEURE POLYTECHNIQUE D'ANTANANARIVO

THÈSE

en Convention de Cotutelle Internationale
présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN CHIMIE

Mention (France) **: Chimie organique et analytique**
Mention (Madagascar) **: Chimie organique**

Soutenue publiquement
par

Delphin J. R. Rabehaja

le 28 mai 2013

PRODUCTION ET ANALYSE D'HUILES ESSENTIELLES DE PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES DE MADAGASCAR. CARACTERISATION PAR RMN ^{13}C, CPG(Ir) et CPG-SM

JURY

Président:	M. Philippe Andrianary, Professeur, ESPA, Université d'Antananarivo
Directeur de thèse:	M. Panja AR Ramanoelina, Professeur, Université d'Antananarivo
Directeur de thèse:	M. Félix Tomi, Professeur, Université de Corse
Rapporteur :	Me Chantal Menut, Professeur, Université de Montpellier 2
Rapporteur :	M. Jean Rasoarahona, Professeur, ESSA, Antananarivo
Examinateur :	Me Jocelyne Rasolondramanitra, Professeur, ESPA, Université d'Antananarivo
Examinateur :	M. Vincent Castola, Professeur, Université de Corse
Examinateur :	M Ange Bighelli, Professeur, Université de Corse

DEDICACE

A la mémoire de mon père,

A ma mère et ma belle-mère,

A tous mes proches,

A Nivo, mon épouse. Ce travail te doit beaucoup… Qu'il soit pour toi le témoignage de ma reconnaissance pour ces années de compréhension, de ton encouragement et tes affections,

A mes enfants Toky et Irina qui savent m'encourager et me soutenir en priant pour moi tous les jours.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu l'Université de Corse Pascal Paoli qui m'a accueilli et permis d'y effectuer ces travaux en acceptant de signer la convention de cotutelle avec l'Université d'Antananarivo.

Ce travail de thèse réalisé en cotutelle, est le fruit de la collaboration entre :
- l'équipe "Chimie et Biomasse" de l'Université de Corse, associée au CNRS (UMR 6134), Faculté des Sciences et Technologie, sous la direction du Professeur Félix TOMI et

- l'équipe au sein du Département Génie Chimique, Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo(ESPA) de l'Université d'Antananarivo.

J'adresse tout d'abord mes vifs remerciements à Monsieur Philippe ANDRIANARY, Professeur titulaire et Directeur de l'ESPA. Malgré vos multiples occupations, vous avez bien voulu nous faire le grand honneur de présider cette soutenance de thèse.

Ensuite, je suis sensible à l'honneur que me font Madame le Professeur Chantal MENUT (Université de Montpellier 2, France) et Monsieur le Professeur Jean RASOARAHONA (Directeur de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques ou ESSA, Antananarivo, Madagascar) en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis très heureux d'avoir bénéficié de leurs recommandations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt et leurs disponibilités malgré leurs occupations.

Je veux exprimer, ici, ma respectueuse gratitude à Madame le professeur Jocelyne RASOLONDRAMANITRA (ESPA, Université d'Antananarivo) ainsi qu'à Messieurs les Professeurs Ange BIGHELLI et *Vincent CASTOLA (Université de Corse) pour avoir bien voulu participer à ce jury mais surtout, pour leur disponibilité, leurs nombreux conseils et leur sympathie.*

Concernant mes séjours pendant ces trois années de thèse en France, je tiens dans un premier temps à remercier vivement Monsieur le Professeur Joseph CASANOVA (Université de Corse) qui m'a invité à rejoindre l'équipe de Chimie et Biomasse en son époque. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à notre collaboration. Sa grande expérience et ses précieux conseils durant mes séjours en Corse ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail. Je lui suis également reconnaissant pour sa grande disponibilité, son dévouement incomparable. Ensuite, j'exprime toute ma gratitude et tiens à remercier chaleureusement Monsieur le professeur Félix TOMI qui a dirigé mes travaux de thèse pendant mes séjours durant ces trois années passées à l'Université de Corse. Merci à vous Monsieur le professeur Félix TOMI pour m'avoir

fait partager vos nombreuses connaissances, votre détermination, votre disponibilité, vos soutiens sans failles malgré la distance qui nous sépare, la confiance que vous m'avez donnée, et votre amitié.

J'adresse un grand remerciement à Monsieur Panja A.R. RAMANOELINA, professeur titulaire, enseignant vacataire à l'ESPA et Président de l'Université d'Antananarivo qui a accepté de m'encadrer et diriger mes travaux de thèse pendant ces trois années. Je suis très reconnaissant de votre disponibilité, vos conseils, votre amitié et surtout vos encouragements constants à mon égard et la confiance que vous m'avez accordée. Vous n'avez ménagé ni vos temps ni vos compétences pour la réalisation de ces travaux. Et vous trouvez ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je remercie chaleureusement le Ministère des Affaires Etrangères du Gouvernement Français par l'intermédiaire de l'ambassade de France à Madagascar (PROJET MADES) *pour m'avoir octroyé des bourses qui m'ont permis de réaliser cette thèse en France.*

Mes remerciements vont également à Madame le Professeur Suzanne URVERG-RATSIMAMANGA (présidente de la Fondation Albert et Suzanne RAKOTO RATSIMAMANGA) ainsi qu'à Monsieur le Docteur Charles ANDRIANJARA (Directeur Exécutif de l'Institut Malgache de Recherches Appliquée ou IMRA) pour m'avoir donné la facilité de réaliser des travaux de recherche à l'IMRA et l'autorisation de terminer ma thèse.

Je tiens à remercier aussi les membres de l'équipe « Chimie des produits naturels », en particulier Monsieur Jean-Marie DESJOBERT, pour son aide dans l'analyse des spectres de masse.

Tous mes sincères remerciements à Harilala IHANDRIHARISON, mon assistant au sein du Laboratoire de Contrôle Qualité et Standardisations de Phyto-médicaments, à Jacob A.P. RAJAONARIVELO et l'équipe du laboratoire de microbiologie, dirigé par le Docteur Christian RABEMANANTSOA, pour les tests antimicrobiens.

Que Messieurs Dr. Pascal Rakotomanga (Société Soimanga) et RakotonirinaBenja (Botaniste) de l'IMRA trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour avoir participé aux récoltes et à l'identification des quatre plantes aromatiques. Que la population autour des sites de collectes qui nous a beaucoup aidés à collecter les matières premières trouve ici aussi mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier Gilles NOTTON et Philippe POGGI de l'équipe « Système à Sources Renouvelables d'Energie » et Madame Pascale BRADESI pour leur sympathie, leur gentillesse et leur bonne humeur.

A Mesdames Cathy LUGREZI et Marie-Christine BOSQUET, personnels CNRS du laboratoire une vive reconnaissance pour leur soutien moral, leur disponibilité à mon égard, leur gentillesse et amitié.

Merci également à mes camarades de l'équipe « Chimie et Biomasse », Dr. Sylvain, Dr. Mathieu, Dr. Zana, Anne-Marie, Ophélie, Khadija, Amel ainsi que mes camarades de physique, Dr. Piéric, Dr. Fabrice, Motaz, Guillaume, Cédric, Serge pour leur sympathie et leur soutien amical.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de mes collègues de l'IMRA, Pr. Adolphe RANDRIANTSOA, Pr. Philippe RASOANAIVO, Pr. Henitsoa RAFATRO, Pr. Jean-François RAJAONARISON, Dr. Voahangy, Dr. Guy, Dr. Dina, Dr. David, Dr. Jacques, Dr. Denis, Dr. Vonjy, Fanja, Aubin, Patrice, René, Solofoniaina, Solofonirina, Tina et Tinasoa pour leurs encouragements, et leurs soutiens de tous les instants. Qu'ils trouvent ici l'assurance de mon amitié sincère.

Enfin, je ne saurais terminer sans remercier vivement mon ami, Dr. Thierry YAPI pour tous les beaux moments partagés avec lui, son aide et conseils.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....i

Liste des tableaux vii
Liste des figures ix

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE I.....7

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : 7

I. FLORE ET VEGETATION DE MADAGASCAR 8

I.1 Flore de Madagascar.....8

I.2 Divisions floristiques et végétations de Madagascar.....11

I.3 Origine et répartition des plantes aromatiques.....13

I.3.1 Répartition générale des espèces aromatiques 14
I.3.2 Répartition par type biologique et par habitat.....14
I.3.3 Origine des plantes introduites 16

II. TECHNIQUES D'EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES 18

II.1 Entrainement à la vapeur et hydrodistillation.....19

III. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DANS UN MELANGE COMPLEXE 20

III.1. Méthodes analytiques.....20

III.2 Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A 21

III.2.1 La CPG et les indices de rétention 22
III.2.2 Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique.....24
III.2.2.1 Les couplages CPG-SM 24
III.2.2.2 Les couplages CPG-SM-SM.....25
III.2.2.3 Le couplage CPGxCPG-SM 26

III.3 Identification des constituants après purification : Voie B 27

III.4 Analyse par RMN-^{13}C sans séparation préalable : Voie C 29

III.4.1 Intérêt de la RMN-^{13}C 30
III.4.2 Identification des constituants en mélange par RMN-^{13}C 30
III.4.2.1 Observation et individualisation des signaux.....31
III.4.2.2 Attribution des signaux.....32
III.4.3 La méthode d'analyse développée au laboratoire.....34
III.4.3.1 Application à l'analyse d'huiles essentielles 37
III.4.3.2 Caractérisation d'huiles essentielles.....37
III.4.3.3 Identification de stéréo-isomères.....39

III.4.3.4 Identification de molécules thermosensibles 39
III.4.3.5 Étude de la variabilité chimique 40

CHAPITRE II 41

CARACTÉRISATION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CYMBOPOGON GIGANTEUS* CHIOV. VAR. *MADAGASCARIENSIS* (A. CAMUS).....41

I. DESCRIPTION BOTANIQUE 42

I.1. Biosystématique 42

1.2 Genre Cymbopogon Spreng (Bosser, 1969) 42

1.3 Cymbopogon giganteus (Hochst) Chiov. var. madagascariensis (A. Camus).....43

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 45

II.1 Propriétés naturelles et utilisations.....45

II.2 Etude bibliographique de l'huile essentielle de Cymbopogon giganteus Chiov 46

III. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CYMBOPOGON GIGANTEUS* CHIOV. VAR. *MADAGASCARIENSIS* (A. CAMUS).....50

III.1 L'huile essentielle de Cymbopogon giganteus var. madagascariensis 50

III.1.1 Analyse d'un échantillon d'huile essentielle par RMN-^{13}C et par CPG(Ir) 51

III.1.2. Analyse de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var*. madagascariensis* par combinaison de CPG(Ir), CPG-SM et RMN-^{13}C 52

III.1.3. Composition chimique des huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* var*. madagascariensis* distillées à l'échelle laboratoire et semi-industrielle 53

III.1.5.1 Influence de la durée récolte/distillation.....61
III.1.5.2 Influence du procédé de distillation.....61
III.1.5.3 Influence du mode de conservation de l'huile essentielle.....64

IV. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS PAR RAPPORT AUX DONNEES DE LA LITTERATURE ..65

IV.1 *trans*- et *cis* p-mentha-2,8-dièn-1-hydroperoxyde (A et B).....65

IV.2 *trans*- et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydroperoxydes (C et D) 65

V. PROPOSITION DE MONOGRAPHIE D'HUILE ESSENTIELLE D'AHIBERO 68

CHAPITRE III 71

I. TANA BOJERIANA 72

I.1. Description botanique.....72

I.2 Composition chimique de l'huile essentielle de Tana bojerana.....73

I.2.1 Analyse d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes 73
I.2.2. Fractionnement de l'huile essentielle de *T. bojeriana*.....75
I.2.3. Bilan de l'analyse détaillée 77

I.3. Identification des constituants à partir des données de la littérature.....79

I.3.1. Identification du dill Ether....79
I.3.2. Identification du *trans*-p-menth-2-ène-1,6-diol....80
I.4. Etude comparative de la composition chimique des HE des différentes parties de la plante....81
II. *VEPRIS MADAGASCARICA* H. 84
II.1. Description botanique....84
II.1.1 Le Genre *Vepris* Comm. Ex A. Juss (Humbert, 1950)....84
II.2. Etude bibliographique....85
II.2.1. Utilisations 85
II.2.2. Travaux antérieurs....85
II.3. L'huile essentielle de feuilles de Vepris madagascarica 86
II.3.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle de *Vepris madagascarica* 86
II.3.2. Fractionnement de l'huile essentielle de *Vepris madagascarica* 87
II.4. Etude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles (2008, 2009 et 2010) et d'écorces de tronc....91
CHAPITRE IV....94
CARACTÉRISATION CHIMIQUE DE DEUX ESPÈCES DE *CROTON*, *CROTON KIMOSORUM* LEANDRI ET *CROTON* SP....94
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 95
I.1. Description botanique....95
I.1.1 *Croton kimosorum* Leandri ou Zanapoly (Napoly)....95
I.1.2 *Croton* sp. 96
I.2. Propriétés et utilisations 97
I.2.1 Propriétés naturelles et utilisations....97
I.2.2 Extraits et huiles essentielles du genre Croton....98
II. L'HUILE ESSENTIELLE DES PARTIES AERIENNES DE *C. KIMOSORUM*....102
II.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes....103
II.2. Fractionnement de l'huile essentielle de C. kimosorum 104
II.3. Bilan de l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle 105
II.4. Quantification par CPG avec utilisation des facteurs de réponse (FR) 110
II.5. Identification de molécules....111
II.5.1 Identification de l'(*E*)-isoélémicine à partir des données de la littérature..111
II.5.2 Identification de l'épi-α-bisabolol 112
III. L'HUILE ESSENTIELLE DES PARTIES AERIENNES DE *CROTON* SP. (ANDRIAMBOLAMENA) 113
III.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes....113
III.2. Fractionnement de l'huile essentielle de *Croton* sp.....113

III.3. Bilan de l'analyse détaillée de l'HE de Croton sp. 115
III.4 Comparaison de la composition chimique en fonction du mode d'extraction 118

IV. BILAN DE L'ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE DEUX ESPECES DE CROTON DE MADAGASCAR 120

V. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE 121

V. 1. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles 122
V. 2. Propriétés antimicrobienne et constituants d'huiles essentielles 123
V.3. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Croton kimosorum 123
V.3.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne par la technique de micro dilution en milieu liquide sur microplaque à 96 puits 124
V.3.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice 124
V.3.4 Résultats et discussion 125

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 134

PARTIE EXPERIMENTALE 134

I. DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION 134

I.1. Extraction par hydrodistillation d'huile essentielle. 134
I.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau d'huile essentielle 135

II. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTROSCOPIQUES 137

II.1 Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) 137
II.2 Analyse par CPG couplé avec Spectromètre de Masse (CPG-SM) 137
II.3 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 138

III. TECHNIQUES DE SEPARATION 138

Chromatographie sur colonne de silice 138

IV. QUANTIFICATION PAR CPG METTANT EN ŒUVRE LES FACTEURS DE REPONSE (FR) 139

V. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE 140

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 143

ANNEXES 161

ANNEXE 1 : QUELQUES COMPOSES NON-VOLATILS ISOLES DANS DES ESPECES DE *CROTON*. 162

ANNEXE 2 : QUELQUES COMPOSES VOLATILS IDENTIFIES DANS LES ESPECES DE *CROTON* 163

ANNEXE 3 : QUELQUES COMPOSES IDENTIFIES DANS L'HUILE ESSENTIELLE DE *CROTON KIMOSORUM* 164

ANNEXE 4: QUELQUES COMPOSES IDENTIFIES DANS L'HUILE ESSENTIELLE DE *CROTON* SP. ...165

ANNEXE 5 : SPECTRE DE MASSE DE QUELQUES COMPOSES.....166

ANNEXE 6 : PREMIERE PUBLICATION SUR *CYMBOPOGON GIGANTEUS* VAR. *MADAGASCARIENSIS* 171

ANNEXE 7 : DEUXIEME PUBLICATION SUR *TANA BOJERIANA* 177

RESUME 182

DISCIPLINE 182

MOTS-CLES 182

FAMINTINANA 183

TARANJA 183

TENY MAMPIAVAKA.....183

ABSTRACT.....184

DOMAIN 184

KEYWORDS.....184

Liste des tableaux

Tableau 1 : liste des 34 familles de plantes aromatiques de Madagascar..... 15
Tableau 2 : Exportation des huiles essentielles au cours de l'année 2011 17
Tableau 3 : Composés identifiés à partir du spectre de RMN 13C de l'huile essentielle brute de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* 52
Tableau 4 : Teneur des cinq constituants majoritaires de l'HE de *C. giganteus* à Madagascar et en Afrique 56
Tableau 5 : Composition chimique des huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis*. 59
Tableau 6 : Composition chimique d'huile essentielle obtenue par distillation à l'échelle laboratoire, riche en composés A, B, C et D 60
Tableau 7 : Composition chimique de l'HE des parties aériennes en fonction du procédé de distillation 62
Tableau 8 : Etude des paramètres : techniques de distillation et le mode de stockage de l'huile. 63
Tableau 9 : Composés à identifier dans l'huile essentielle d'Ahibero 70
Tableau 10 : Composés identifiés à partir du spectre RMN-13C de l'huile essentielle de *Tana bojeriana* Baker 75
Tableau 11 : Composés identifiés du CC à partir des spectres CPG-SM et RMN-13C de l'huile essentielle de *Tana bojeriana* Baker 77
Tableau 12 : Bilan de l'analyse d'huile essentielle aérienne de *Tana bojeriana* 78
Tableau 13 : Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles de différentes parties de la plante en fonction l'état végétatif.....82
Tableau 14 : Composés identifiés à partir du spectre RMN-13C de l'huile essentielle de *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Pierr 87
Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Pierr 89
Tableau 16 : Etude comparative de la composition chimique de trois huiles essentielles de feuilles obtenues par entraînement à la vapeur d'eau et hydrodistillation 92
Tableau 17 : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. kimosorum* 103
Tableau 18 : Fractionnement de l'huile essentielle de *C. kimosorum* 106
Tableau 19 : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. kimosorum*. 108
Tableau 20 : Fractionnement de l'huile essentielle de *Croton* sp.....114
Tableau 21 : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *Croton* sp. (Andriambolamena) ..... .116
Tableau 22: Composition chimique de l'HE des parties aériennes de *Croton* sp. obtenue par hydrodistillation (HD) et par entraînement à la vapeur d'eau (EV) ...119
Tableau 23 : Composition chimique de l'huile essentielle des différentes parties de *C. kimosorum* (Zanapoly ou Napoly) 122
Tableau 24 : CMI et CMB (mg/ml) de l'huile essentielle de différentes parties de *Croton kimosorum* Leandri 126

* * *

Liste des figures

Figure 1 : Localisation de Madagascar dans l'Océan Indien....2
Figure 2 : Répartition de la végétation malgache 11
Figure 3 : Montage d'hydrodistillation 20
Figure 4 : Les principales voies d'analyse d'un mélange complexe naturel 22
Figure 5 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN-^{13}C 36
Figure 6 : Photo d'Ahibero 43
Figure 7 : Schémas de différentes parties de *Cymbopogon giganteus* (Hochst.) Chiov. Subsp. *madagascariensis* (A. Camus) 44
Figure 8 : Composés majoritaires dans les huiles essentielles de *C. giganteus* 47
Figure 9 : principaux constituants de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* identifiés par RMN-^{13}C 54
Figure 10 **:** Structure et déplacements chimiques du *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydroperoxyde décrits par Kiuchi *et al., (*2002) et observés dans l'HE de *C. giganteus* var. *madagascariensis* 66
Figure 11 **:** Structure et déplacements chimiques du cis-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde décrits dans la littérature (Kiuchi *et al.,* 2002) et observés dans l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* 66
Figure 12 **:** Structure et déplacements chimiques du *trans*-p-mentha-1(7),8-diène-2-hydropéroxyde décrits dans la littérature (Kiuchi *et al.,* 2002) et observés dans l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* 67
Figure 13 **:** Structure et déplacements chimiques du *cis*-p-mentha-1(7),8-diène-2-hydropéroxyde décrits dans la littérature (Kiuchi *et al.,* 2002) et observés dans l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* 67
Figure 14 : Photo de *Tana bojeriana* 72
Figure 15 : Structures des composés identifiés par RMN ^{13}C de l'huile essentielle 74
Figure 16 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *Tana bojeriana* 76
Figure 17 : Structure et déplacements chimiques du dill ether 14 (tableau 12) décrits dans la littérature (Serra *et al.,* 2004) et observés dans la fraction F4 (8.8%)..... 80
Figure 18 : Structure et déplacements chimiques du *trans*-p-menth-2-ène-1,6-diol 20 décrits dans la littérature (Ahmed *et al.*, 1997) et observés dans la fraction F4.....81
Figure 19 : *Vepris madagascarica* 84
Figure 20 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de feuilles de *Vepris madagascarica* 88
Figure 21 : Structures des 16 constituants identifiés dans l'huile essentielle de *Vepris madagascarica* 90
Figure 22 : Photo de *Croton kimosorum* ou Zanapoly 96
Figure 23 **:** Photo de *Croton* sp ou Andriambolamena 96

Figure 24 : Structures et déplacements chimiques de (E)-isoélémicine 111
Figure 25 : Structure et déplacements chimiques de l'épi-α-bisabolol 112
Figure 26 : Histogramme montrant les composés majoritaires de *C. kimosorum* 125
Figure 27 : Schéma d'un appareil d'hydrodistillation de type Clevenger 135
Figure 28 : Schéma de l'appareillage d'entrainement à la vapeur « semi-industriel » ... 136
Figure 29 : Autocuiseur adapté pour extraire l'huile essentielle par entrainement à la vapeur 136
Figure 30 : Lecteur de plaque ou spectrophotomètre 142

* * *

INTRODUCTION

Quatrième plus grande île dans le monde et située dans l'océan indien (Figure 1), à l'est du continent africain, Madagascar est réputée pour sa richesse floristique unique au monde avec un taux d'endémisme très élevé : 12 000 espèces ont été recensées dont plus de 85% ne se trouvant nulle part ailleurs. Cette flore endémique immense ainsi que sa situation géographique, font de Madagascar une île singulière. Ce pays constitue un immense laboratoire pour les recherches dans le domaine de la phytochimie pour mieux connaitre et aussi mieux préserver cette flore qui présente une véritable valeur patrimoniale. L'utilisation empirique de ces plantes médicinales a déjà fait l'objet d'études (Randriamahefa *et al.*, 1979 ; Descheemaeker, 1986 ; Rabesa, 1986 ; Boiteau *et al.*, 1993 ; Rakotobe *et al.*, 1993 ; Rivière, 2005) mais compte tenu du taux d'endémisme, le travail à réaliser est immense.



Figure 1 : Localisation de Madagascar dans l'Océan Indien

La grande île possède aussi une diversification des étages de végétations due à la variation écologique et climatique du nord au sud et de l'est à l'ouest. Ainsi, les étages humides et subhumides sont caractérisés par la forêt dense sempervirente et plus localement de forêt sclérophylle à l'est et au nord. Les étages secs et sub-arides

couvrent l'ensemble de l'ouest de Madagascar, à l'exception de la région du Sambirano et le sud. Au sud et sud-ouest, les forêts sont denses, sèches caducifoliées ; les savanes se distinguent floristiquement. Enfin, au niveau de l'étage climatique montagnard, la végétation est représentée par une forêt dense humide de montagne faisant le plus souvent place, pour des raisons principalement édaphiques, à la forêt sclérophylle et aux fourrés de montagne.

Madagascar possède des plantes aromatiques parfois introduites mais surtout endémiques, sources d'huiles essentielles. Des groupements de producteurs s'associent pour développer ce secteur et favoriser l'exportation. PRONABIO (Antananarivo), GOHEP (Toliara) et HEVA (Antsirabe) sont les principales structures. Malgré la richesse en espèces aromatiques, une vingtaine seulement est régulièrement proposée sur le marché de Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) dans le monde.

La grande île est un important producteur et fournisseur mondial d'une gamme de produits naturels qui sont considérés comme étant de très haute qualité comprenant les plantes médicinales, les épices et les huiles essentielles. En dépit du nombre restreint des huiles essentielles produites, elle bénéficie d'une bonne image avec des produits-phares (Ravintsara, Géranium type Bourbon, Ylang-ylang). Les huiles essentielles endémiques sont utilisées dans différents domaines pour leurs propriétés organoleptiques, notamment odorantes (parfumerie, cosmétique), thérapeutiques (aromathérapie), pharmaceutiques (industrie pharmaceutique), agro-alimentaires (additif alimentaire) et en agronomie (pesticide naturel). La production des huiles essentielles est assez peu diversifiée et majoritairement basée sur la cueillette, ce qui peut à court terme et en cas de forte demande, menacer la ressource végétale. Par conséquent, un des principaux enjeux pour le développement de cette filière réside d'une part, dans la diversification de l'offre, et d'autre part, dans la préservation et la gestion des ressources végétales.

La diversification de la production d'huiles essentielles ne peut être envisagée que si la caractérisation de ces substances naturelles est réalisée, et celle-ci passe par la

connaissance de la composition chimique, qui constitue un facteur déterminant en vue de leur commercialisation. Ainsi, les travaux qui font l'objet de thèse de doctorat ont été réalisés au sein de l'équipe « Chimie et Biomasse » qui fait partie de l'UMR-CNRS 6134, SPE (Sciences Pour l'Environnement). La problématique générale de cette équipe de recherches concerne la qualité, la caractérisation et la valorisation des substances naturelles végétales.

Dans la plupart des cas, les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant parfois renfermer une centaine de constituants et même plus. La valorisation de ces mélanges naturels passe donc nécessairement par une étape préalable d'analyse de leur composition chimique. Pour cela, deux voies sont actuellement privilégiées.

La première voie est basée sur le couplage «en ligne» d'une technique chromatographique, qui permet d'individualiser les différents constituants, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), couplée avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM), permettant l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Les données spectrales sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcanes ou d'esters méthyliques d'acides gras.

Dans la deuxième voie, les constituants du mélange sont purifiés par diverses techniques séparatives puis identifiés à l'aide de l'ensemble des techniques spectroscopiques structurales (SM et Résonance Magnétique Nucléaire du ^{1}H et du ^{13}C) ainsi que la RMN bidimensionnelle. Cette voie est plus longue à mettre en œuvre mais indispensable dans le cas de molécules nouvelles et d'une grande fiabilité pour les molécules qui sont déjà décrites dans la littérature.

Ainsi, à la suite des travaux de Formácek et Kubeczka (1982a, 1982b), l'équipe « Chimie et Biomasse » a mis au point et développé une méthode d'analyse basée sur

la RMN-^{13}C pour l'identification des constituants des mélanges complexes sans purification préalable. Le principe de cette méthode repose sur la comparaison, à l'aide d'un logiciel d'aide à l'identification, des raies de résonance du spectre du mélange avec celles de composés de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Elle est particulièrement intéressante car elle permet de prendre en compte des informations intrinsèques du squelette carboné des molécules (déplacement chimique des carbones). Cette technique permet aussi l'analyse de molécules quels que soient leur squelette et leur fonctionnalisation, incluant les molécules thermosensibles et les stéréo-isomères difficilement différentiables par les techniques conventionnelles. Elle a été appliquée avec succès à diverses familles de produits naturels comme les huiles essentielles, les extraits végétaux et même avec les huiles végétales.

Dans ce contexte, un double objectif est fixé dans ce travail de thèse qui s'inscrit dans la valorisation des plantes aromatiques et médicinales :

- sur le plan méthodologique, il s'agit de se familiariser avec la méthode d'analyse basée sur la RMN-^{13}C développée par l'Université de Corse qui constitue une méthode originale et complémentaire au couplage CPG-SM ;

- d'un point de vue appliqué, il s'agit d'exploiter les potentialités de la RMN-^{13}C pour caractériser les huiles essentielles de quatre plantes qui poussent à l'état spontané dans la région sud-ouest de Madagascar, *Cymbopogon giganteus madagascariensis* (Poaceae), *Tana bojeriana* (Apiaceae), *Croton kimosorum* et *Croton* sp. (Euphorbiaceae), et d'une cinquième plante qui pousse dans la forêt dense humide du nord-est de Madagascar, *Vepris madagascarica* (Rutaceae).

Dans le premier chapitre, nous fournirons des éléments sur la flore, la végétation ainsi que l'origine des plantes aromatiques de Madagascar. Nous développerons les principales techniques d'extraction, dont celles utilisées pour l'analyse des huiles essentielles, en mettant en évidence, à travers quelques exemples, leurs avantages et leurs limites. Enfin, nous présenterons la méthode d'analyse par RMN-^{13}C développée au laboratoire en soulignant ses potentialités comme outil d'identification et de

quantification des composés de mélanges naturels et sa complémentarité avec les autres techniques.

Dans le deuxième chapitre, nous appliquerons la technique d'identification des mélanges naturels par RMN-^{13}C par combinaison de diverses techniques (CPG(Ir) et CPG-SM) à l'analyse d'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. var. *madagascariensis* (A. Camus) poussant à l'état spontané à Madagascar. Pour cette espèce, nous avons réalisé une étude complète de sa composition chimique et avons comparé aussi les profils chromatographiques des huiles essentielles obtenues à l'échelle laboratoire et celles obtenues à l'échelle semi-industrielle pour mieux la caractériser. Enfin, nous proposerons une monographie pour faire connaître cette nouvelle huile essentielle qui a été déjà proposée sur le marché extérieur (Belgique).

Le troisième chapitre sera consacré à l'identification par RMN-^{13}C, CPG(Ir) et CPG-SM des constituants de l'huile essentielle des différentes parties aériennes de *Tana bojeriana* Baker. Nous avons, d'une part, étudié la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Vepris madagascarica* H. Perr. et d'autre part, comparé la composition chimique des huiles essentielles d'écorce et de feuilles.

Le quatrième chapitre concernera les travaux relatifs à la composition chimique des huiles essentielles de deux espèces de Croton poussant à l'état spontané toujours dans la région sud-ouest de Madagascar, zone Andatabo (Toliara). Il s'agit d'huiles essentielles plus complexes avec de nombreux constituants sesquiterpéniques. Enfin, nous décrirons l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de différentes parties de *Croton kimosorum* (feuilles, tiges et parties aériennes).

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

Flore et végétation de Madagascar

Techniques d'extraction des métabolites secondaires

Identification des constituants dans un mélange complexe

I. FLORE ET VEGETATION DE MADAGASCAR

Tout d'abord, il nous apparait nécessaire de séparer soigneusement les notions relatives à la flore, fait historique, de celles relatives à la végétation, fait écologique.

I.1 Flore de Madagascar

Situé entre 12° et 25°30' de latitude sud, Madagascar se trouve aux limites du monde tropical. Sa grande diversité et sa richesse floristique sont bien connues. Elles sont souvent attribuées à l'isolement ancien de l'île (120 à 140 millions d'année), à la grande diversité des écosystèmes naturels qui ont favorisé l'évolution des espèces végétales mises en place avant la séparation des continents **(**Rajeriarison, 1996).

La flore malgache présente un intérêt scientifique tout particulier en raison de sa diversité et de sa très grande richesse avec de 10.000 à 12.000 espèces recensées (Humbert, 1959), dont le niveau d'endémisme spécifique est supérieur à 80% (Koechlin *et al.*, 1974).

I.1.1 Affinités et origine probable de la flore malgache

Les espèces mise en place avant la dislocation du continent Pangéen et la dérive Gondwanienne sont considérées comme les souches anciennes de la flore actuelle. Les recherches paléobotaniques (Wolfe, 1972, 1975 ; Aubreville, 1977) ont contribué à confirmer ce fait à l'échelle mondiale y compris Madagascar.

Les radiations de la flore à travers les continents gondwaniens ont fait également l'objet de nombreux travaux. Elles permettent d'expliquer l'existence de nombreuses espèces communes ou affines entre ces territoires aujourd'hui séparés. (Perrier de la Bâthie, 1921 ; Humbert, 1959 ; Leroy, 1978). Les modes et les moyens de transport ont été évoqués. Ils ont joué un rôle et ont contribué à l'enrichissement de la flore

originelle. Madagascar est un centre extraordinaire de spéciation pour certains genres qui y ont trouvé les conditions tropicales favorables à la diversification phylétique (Aubreville, 1975). On pourrait citer :

- *Grewia* (Tiliaceae) avec 70-80 espèces,
- *Vepris* (Rutaceae) : 25 espèces à Madagascar et une à Ceylan,
- *Mammea* (Guttiferaeae) : 21 espèces à Madagascar et une en Afrique, une à deux espèces en Amérique,
- *Symphonia* (Guttifereae) : 16 espèces dont une en Afrique et une en Amérique **(**Rajeriarison, 1996).

L'île est également un centre d'endémisme : endémisme ancien pour les endémiques de rang taxonomique élevé et récent ou même actuel au niveau des espèces. Ainsi, Koechlin *et al.* (1974) ont approfondi cette question et l'ont attribuée à la différenciation sur place à partir d'un stock ancien. Suite à cette étude, deux familles sont à cet égard très remarquables, les Palmiers avec 15 genres endémiques sur 18 et 120 espèces et les orchidées qui se répartissent en 16 tribus, 61 genres et plus de 900 espèces, avec beaucoup d'affinités asiatiques (Humbert, 1959).

Rajeriarison (1996) a présenté huit familles endémiques connues : Didieraceae, Sphaerosepalaceae, Sarcolenaceae, Diegodendraceae, Humbertiaceae, Didymelaceae, Bembiciaceae, Kaliphoraceae. A partir de ces différentes considérations auxquelles il faut rajouter les connaissances sur la flore, les affinités des plantes de Madagascar ont été définies, et on reconnait aussi l'existence dans la flore malgache de plusieurs éléments : africain avec 24%, pantropical 42%, asiatique 7%, austral 3% ; l'élément récent dû au transport à longue distance, 15% ; élément véritablement malgache, 6%.

La mise en place de ces différents éléments aurait débuté au Crétacé (Koechlin *et al.*, 1974), l'élément austral étant considéré comme plus ancien, suivi par les éléments pantropical et asiatique puis de l'élément africain. Certains de ces éléments se sont par la suite diversifiés dans plusieurs directions en colonisant d'autres régions du globe.

D'autres n'ont pas évolué et ont gardé leurs caractères primitifs que l'on trouve encore dans les espèces des forêts africaines et malgaches.

I.1.2 Aspect biogéographique

La flore malgache a toujours posé des difficiles problèmes aux biogéographes. Depuis les travaux de Perrier de la Bâthie (1936), beaucoup d'autres informations confirment la position clef de Madagascar en ce qui concerne l'évolution et la distribution des végétaux. Les informations relatives aux affinités des plantes malgaches doivent aboutir à la délimitation de leurs aires de répartition dans les anciens territoires gondwaniens.

Mais un des problèmes qui a été signalé par de nombreux auteurs concerne la proximité du continent africain par rapport à Madagascar. Malgré cette proximité, un nombre assez faible de genres est commun à Madagascar et à l'Afrique. On peut citer l'exemple des Palmiers (Melville, 1970) : 18 genres présents à Madagascar ne sont pas présents en Afrique. Pour les Bombacaceae, une seule espèce d'*Adansonia* en Afrique, alors qu'il y a six espèces à Madagascar (Koechlin *et al*., 1974) ; *Gonioma* (Apocynaceae), une espèce en Afrique du Sud et sept espèces malgaches (Markgraf et Boiteau, 1972) et d'autres encore.

I.1.3 Centre d'endémisme

Un certain nombre de centres d'endémisme a été identifié à l'issue des recherches floristiques et des analyses biogéographiques :

- Humbert (1955) avait divisé la région orientale en trois secteurs en fonction de la latitude : secteur Nord, secteur Est-moyen et secteur Sud-Est. Pour l'auteur, chaque secteur constituerait un centre d'endémisme caractérisé par son lot de taxons endémiques ;

- White, 1983 (*In :* Phillipson, 1994) considère la région orientale et la région occidentale comme des centres d'endémisme important, équivalents aux centres

d'endémisme régionaux du continent africain. La ligne de partage entre ces deux régions correspond aux limites de partage géographique et climatique (Bastian, 1967) ;

- Selon Koechlin *et al.* (1974), le sud devait être considéré comme un centre d'endémisme du type « conservation » ;

- Les hauts Sommets de Madagascar (Tsaratanana, Marojejy, Ankaratra, Andringitra et Andohahela) devaient être considérés comme des centres d'endémisme très important, étant donné le fort pourcentage des espèces endémiques présentes dans la flore orophile.

I.2 Divisions floristiques et végétations de Madagascar.

La première division floristique de Madagascar est due à Baron R. (Baron, 1889-1890) qui distinguait trois régions (orientale, centrale et occidentale) essentiellement basées sur des critères floristiques, données numériques et originalités (Cornet et Guillaumet, 1976).

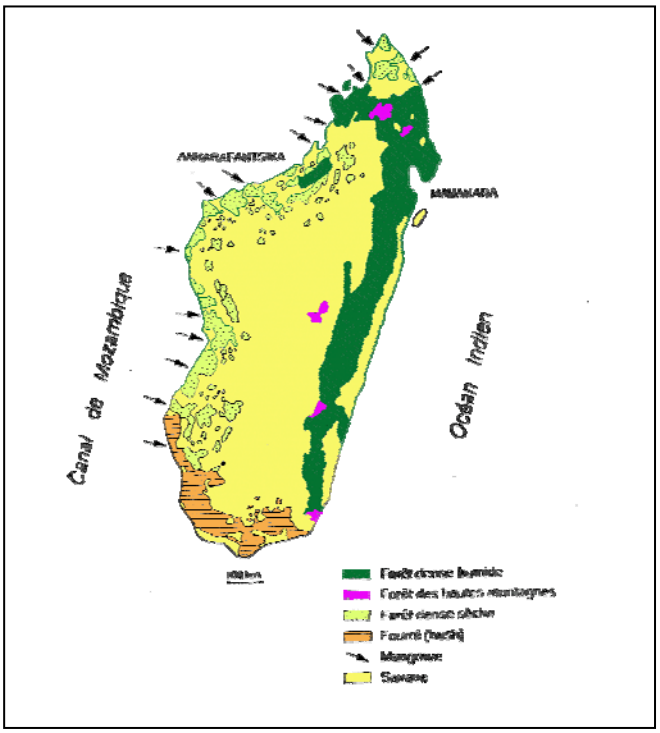


Figure 2 : Répartition de la végétation malgache

I.2.1 Divisions floristiques

Perrier de la Bâthie H. (1921) a proposé deux divisions : la flore du vent (région orientale, région centrale et la région du Sambirano) et la flore sous le vent (région occidentale et région méridionale). Lui-même (1936) traitant de biogéographie a proposé encore une amélioration des dénominations : la région du vent ou orientale (domaine oriental, domaine central et domaine du Sambirano) et la région sous le vent ou occidentale (domaine occidental et domaine du sud-ouest).

Enfin, Humbert H. (1955) a proposé une division botanique de Madagascar suivant la terminologie, la hiérarchie région, domaine et secteur. Ainsi, nous citons les différentes régions malgaches :

- région malgache orientale : domaine de l'est, domaine (et secteur) du Sambirano, domaine du centre et domaine des Hautes Montagnes ;
- région malgache occidentale : domaine de l'ouest et domaine du sud.

I.2.2 Etages bioclimatiques des végétations

La classification des végétations basée sur les étages bioclimatiques est inspirée des travaux d'Emberger (1971). Il a énoncé les deux principes fondamentaux suivants :

- la végétation est l'effet d'un milieu, en particulier du climat,
- l'étage bioclimatique de végétation est l'unité de végétation correspondant à un climat.

Le travail de Cornet A. (1974), basé sur le bilan hydrique et le régime thermique, en établissant une hiérarchie bioclimatique, coïncide avec la répartition de la végétation malgache (Figure 2).

I.2.3 Etages de végétation et principales formations végétales

Les cadres d'une classification des étages de végétation et de leurs principales formations végétales sont :

- Etage de végétation humide,
- Etage de végétation sub-humide,
- Etage de végétation montagnard
- Etage de végétation sec et semi-aride
- Etage de végétation sub-aride

Au point de vue climatique, Madagascar se situe parmi les climats intertropicaux comme climat tropical à tendance de saison thermique, caractérisé par des jours et des nuits nettement, mais faiblement, inégaux et une pluviosité concentrée à la période chaude (Emberger, 1945), avec cependant une température généralement inférieure à celles des stations comparables d'Afrique orientale.

I.3 Origine et répartition des plantes aromatiques

Les premières évaluations des végétaux aromatiques au sein des flores autochtones et introduites sont présentées dans quelques publications de base (Gattefosse, 1921 ; Perrier de la Bâthie, 1923 ; Decary, 1955). Ces auteurs ont mentionné les propriétés d'une soixantaine d'espèces qui nécessitent des études particulières en vue de la production de leurs huiles essentielles. Cet inventaire est loin d'être exhaustif et les données ont pu être complétées par la consultation des autres familles publiées dans la Flore de Madagascar et des Comores. Les études sur les origines des plantes recensées, leurs affinités avec les autres flores tropicales et leur répartition géographique sont tirées des travaux de Perrier de la Bâthie (1936), Dejardin *et al.* (1973) et Koechlin *et al.* (1974).

I.3.1 Répartition générale des espèces aromatiques

Le nombre des plantes aromatiques introduites et autochtones, recensées dans les cinq domaines phytogéographiques (Est, Sambirano, Centre, Ouest et Sud) atteint 110 espèces : 53% sont introduites et 47% autochtones. Parmi ces dernières, 86% sont endémiques. Le recensement effectué par Rakotovao et Randrianjohany (1996) a montré les résultats suivants : les quatre domaines (Est, Sambirano, Centre et Ouest) ont relativement la même richesse spécifique en matière de flore aromatique : 44, 21, 47 et 38 espèces. Par contre, le domaine sud reste le plus pauvre, avec uniquement 4 espèces aromatiques. Toutes ces espèces sont réparties dans 34 familles (Tableau 1).

I.3.2 Répartition par type biologique et par habitat

Malgré la même représentativité des principaux domaines (Est, Sambirano, Centre et Ouest) concernant le nombre des espèces aromatiques, la répartition de ces plantes en fonction des types biologiques et des types d'habitat présentent des différences notables :

- Les espèces ligneuses (arbres, arbustes, ou arbrisseaux) sont prédominantes dans les domaines oriental, occidental et du Sambirano (respectivement 75%, 60% et 57%) ; dans le domaine du centre, ce sont plutôt les espèces herbacées qui sont les plus nombreuses (55%) ;

- Le nombre élevé d'espèces aromatiques introduites, herbacées ou ligneuses, est très marqué dans tous les domaines sauf dans celui du Sud : Centre (68%), Est (75%), Ouest (50%) et Sambirano (90%) ; Sud (moins de 5%).

Tableau 1 : Liste des 34 familles de plantes aromatiques de Madagascar (Rakotovao et Randrianjohany, 1996)

Famille	Espèce introduite (Exemple)	Espèce autochtone (Exemple)
Acanthaceae		*Brillantsia pubescens* And.
Annonaceae	*Cananga odorata* Pum. (Ylang-ylang)	
Apocynaceae		*Alafia perrieri* Jum
Bignoniaceae		*Stereospermum euphorioïdes* D.C
Burseraceae		*Canarium madagascariensis*
Canellaceae		*Cinnamosma fragrans*
Asteraceae		*Helichrysum gymnocephalum* DC.
Euphorbiaceae		*Croton bojerianum* H.
Flacourtiaceae		*Aphloia madagascariensis*
Geraniaceae	*Pelargonium capitatum* Ait	
Poaceae	*Cymbopogon citratus* DC	
Guttiferae	*Callophyllum inophyllum*	
Hernandiaceae		*Hernandia voyronijumelle*
Labiatae	*Ocimum canum* Sims.	
Lauracaea	*Cinnamomum camphora* Nees.	*Ravensara aromatica* Sonnerat
Leguminosae		*Indigofera vohemarensis* Baill.
Loganiaceae	*Buddleiya madagascariensis*	
Malvaceae		*Gossypium barbadense* L.
Meliacaea	*Melia azedarach* L.	
Moringaceae	*Moringa pterygosperma* Goetner	
Myristicaceae	*Myristica fragrans* L.	*Brochoneura acuminata* Lam.
Myrtaceae	*Melaleuca quinquenervia*	*Eugenia emirnensis* Bak.
Oleaceae		*Jasminum greveanum* P. Danguy
Orchidaceae	*Vanilla planifolia*	*Aerangis fastuosa* sehl.
Piperaceae	*Piper pyrifolium*	
Ptaeroxylaceae		*Cedrelopsis greveï* Baill.
Renonculiaceae	*Ranunculus pinnatus* Poiret	
Rubiaceae		*Santalina madagascariensis* Baill.
Rutaceae	*Citrus hystrix* DC	*Vepris madagascarica* Baill.
Solanaceae	*Datura alba* Nees	
Streliziaceae		*Ravenala madagascariensis*
Umbelliferae	*Allium sativum* L.	*Phellolophium madagascariensis*
Verbenaceae	*Lantana camara* L.	
Zingiberaceae	*Zingiber officinale*	

Du point de vue de l'habitat naturel (forêt primaire ou formations secondaires tels que les recrûs forestiers, les savanes, ou les pseudo-steppes), la répartition de 58 espèces aromatiques autochtones est caractérisée par :

- dans le domaine oriental, 76% appartiennent aux forêts denses ombrophiles de basse altitude, situées entre 0 à 800 m ;

- dans le domaine occidental, 12% seulement sont forestières ;

- dans le domaine central, le pourcentage des espèces pseudo-steppes est plus élevé (87%) ;

- dans le domaine du Sambirano, on n'a répertorié que deux espèces autochtones appartenant aux végétations secondaires.

I.3.3 Origine des plantes introduites

Près de 60% des plantes aromatiques introduites sont originaires des terres orientales (Indo-Malaisie, Australie, Nouvelle Calédonie et Asie Orientale). Les autres origines sont par ordre décroissant les pays tempérés de la Méditerranée et Europe occidentale et centrale (20%), l'Amérique du Sud (11%) et l'Afrique (9%).

La liste non exhaustive des plantes à parfum dans cet inventaire montre le potentiel économique évident qu'elles représentent. Parmi les plantes autochtones, de nombreux taxons intéressants sont plus ou moins inconnus des distillateurs à cause de l'insuffisance des études ou de la faible quantité de matériel envoyé pour analyses en Europe à leur époque. Il nous a été difficile d'obtenir des données économiques sur l'exportation des huiles essentielles car il n'existe pas d'organisme centralisant les données. L'examen des données montre cependant que les masses sont importantes (tableau 2).

Pour mieux situer les plantes qui font l'objet de nos travaux de recherches par rapport à la flore et à la végétation de Madagascar, précisons que quatre plantes poussent à l'étage de végétation sub-aride (domaine occidental), dans le fourré xérophile à Didieraceae et à Euphorbiaceae : *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* (Poaceae), *Tana bojeriana* (Apiaceae), et deux espèces de *Croton* (Euphorbiaceae). Une cinquième plante aromatique, *Vepris madagascarica*

(Rutaceae), se situe à l'étage de végétation humide (domaine oriental), dans la forêt dense humide sempervirente de basse altitude. Toutes les plantes étudiées sont endémiques de Madagascar.

Tableau 2 : Exportation des huiles essentielles au cours de l'année 2011

Nom	Destination d'exportation	Valeur FOB (Ariary)	masse (Kilo)
Orange	Espagne, Pologne	397 348 030	1 002
Citron	Pologne	64 637	2
Autres agrumes	Cameroun, France, île Maurice	8 308 763	52
Menthe poivrée	France	58 886 003	261
Lemon-grass	Allemagne, France, île Maurice	12 547 607	267
Géranium	Allemagne, Belgique, Canada, France, Grande Bretagne, Inde, île Maurice, Suisse	383 900 545	3 589
Girofle	Afrique du Sud, Allemagne, Belgique, Cameroun, Canada, Colombie, Espagne, États-Unis, Grande Bretagne, La Réunion, île Maurice Inde, Indonésie, Italie, Nouvelle Zélande, Japon, Singapour	64 457 227 178	1 639 241
Ylang-ylang	Allemagne, Belgique, Canada, Chine, Colombie, Espagne, Etats-Unis, France, Grande Bretagne, Hong-Kong, La Réunion, île Maurice Inde, Indonésie, Italie	864 690 130	11 002
Vétiver	États-Unis, France, La Réunion	205 285 825	661
Autres huiles essentielles	Afrique du Sud, Allemagne, Belgique, Canada, Colombie, Djibouti, Espagne, États-Unis, France, Gabon, Grande Bretagne, Hong-Kong, La Réunion, île Maurice Inde, Indonésie, Italie, Mayotte, Nouvelle Calédonie, Nouvelle Zélande, Japon, Sénégal, Seychelles	8 103 895 470	65 530
TOTAL		74 492 154 188	1 721 607

Source : DGINSTAT/D S E/SSES/COMEXT/Janvier 2012

De nos jours, des travaux de recherche concernant les huiles essentielles de Madagascar contribuent à la valorisation de ces plantes aromatiques. Ainsi, nous citons à titre d'exemples les travaux effectués sur *Helichrysum bracteiferum* (Ramanoelina *et al.*, 1992a), *Helichrysum gymnocephalum* (Afoulous *et al.*, 2011), sur *Lantana camara* L. (Randrianalijaona *et al.*, 2005), quatre espèces de *Croton* (Radulović N. *et al.*, 2006), *Helichrysum faradifani* Scott E. (Ralijerison *et al.*, 2005), sur *Ravensara aromatica* sonn. (Andrianoelisoa *et al.*, 2006 ; Ramanoelina *et al*, 2006 ; Andrianoelisoa, 2008), sur le Niaouli (Ramanoelina, 1989 ; Ramanoelina *et al.*, 1992b, 2007), sur *Cinnamosma fragrans* (Randrianarivelo *et al.*, 2009). Ralambonirina *et al.* (2011) ont travaillé sur deux espèces d'*A*nthospermum et enfin, l'huile essentielle de *Vepris ellioti* (Bouchet et Valisolalao, 1989 ; Poitou *et al.*, 1995).

De ce fait, nos travaux de recherche s'intéressent à la production des huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales de Madagascar. Ensuite la caractérisation de ces espèces par les différentes techniques d'analyses.

II. TECHNIQUES D'EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES.

Les métabolites secondaires représentent un ensemble de familles de molécules qui ne sont pas forcément essentielles à la survie d'une plante, d'une bactérie ou d'un champignon. Il s'agit en général des molécules de taille et masse faibles comparées à celles du métabolisme primaire (lipides, acides aminés et glucides). L'entraînement à la vapeur à l'échelle industrielle, l'hydro distillation à l'échelle du laboratoire ou l'expression à froid (zestes d'agrumes) permettent d'extraire ces métabolites secondaires pour obtenir des huiles essentielles. Les huiles essentielles sont constituées majoritairement par des terpènes mais également par des dérivés phénylpropanoïques ou des composés à chaîne linéaire. Les huiles essentielles présentent une importance économique importante dans les secteurs de la parfumerie et cosmétiques mais surtout dans l'industrie agroalimentaire.

Pour notre part, nous avons utilisé deux types d'extraction : un alambic d'un volume de 1500 L en acier inoxydable que l'on peut considérer comme un procédé d'extraction semi-industriel basé sur l'entrainement à la vapeur et un appareil de type Clevenger qui constitue le montage d'extraction classique au niveau laboratoire et est basé sur l'hydrodistillation.

II.1 Entrainement à la vapeur et hydrodistillation

L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau constituent les procédés les plus anciens d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques, procédés apportés par les Arabes au IX^{ème} siècle. Cette extraction utilise traditionnellement un alambic (Bruneton, 1993).

Le chauffage permet, dans une première étape de l'hydro distillation et de l'entrainement à la vapeur, de former de la vapeur d'eau qui détruit les structures cellulaires libérant les molécules. Les plus volatiles d'entre-elles sont entrainées par la vapeur dans un mélange hétérogène d'eau et de molécules organiques. La formation d'un azéotrope entre l'eau et chacun des constituants du mélange permet une volatilisation de ces métabolites secondaires même à une température d'ébullition inférieure à celle de chaque composé. Ainsi, des substances possédant des points d'ébullition assez élevés peuvent être extraites. Ensuite, la vapeur se condense dans un système réfrigérant (ou condenseur pour l'alambic) avant d'être récupérée dans un essencier ou vase florentin. En raison de sa plus faible densité, l'huile essentielle se place au-dessus de la phase aqueuse. Celle-ci qui contient des composés hydrosolubles est appelée hydrolat ou eau florale.

L'entraînement à la vapeur constitue la technique la plus utilisée et la plus aisée à mettre en œuvre pour la production d'huiles essentielles et demeure sans doute la plus rentable, vraisemblablement en raison de l'investissement matériel relativement peu important

L'hydrodistillation est basée sur le même principe physique que l'entrainement à la vapeur et est plutôt utilisé pour de faibles quantités de végétal. Une pièce de verrerie a été conçue pour permettre à la fois la circulation en circuit quasi-fermé de l'eau sous forme liquide et gazeuse et la cohobation. L'appareillage de type Clevenger modifié de façon à permettre la cohobation est le plus fréquemment utilisé (figure 3).

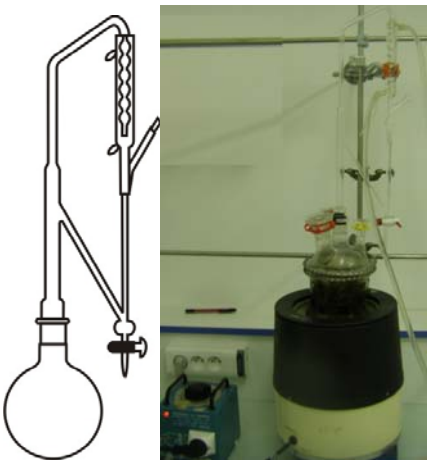


Figure 3 : montage d'hydrodistillation

Quel que soit le mode d'extraction retenu, la valorisation de ces mélanges naturels, nécessite une étape préalable de détermination de leur composition chimique (identification et quantification des constituants) pour les caractériser, mais surtout pour mettre en évidence une éventuelle spécificité. Ce travail nécessite de disposer d'outils analytiques fiables et rapides car l'identification des constituants d'une huile essentielle que l'on doit considérer comme un mélange complexe naturel est un exercice analytique difficile.

III. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DANS UN MELANGE COMPLEXE

III.1. Méthodes analytiques

Les techniques analytiques pouvant être mises en œuvre pour l'identification des constituants d'un mélange complexe sont nombreuses et variées. Toutefois,

l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel restent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires (Coleman et Lawrence, 1997 ; Joulain, 1994).

D'une manière générale, l'identification des constituants d'un mélange complexe naturel s'effectue selon trois voies (Figure 4) :

- la voie A est spécialement bien adaptée aux analyses de routine telles que les contrôles de qualité d'échantillons (d'huiles essentielles ou d'extraits végétaux par exemple) dont les constituants ont déjà été décrits dans la littérature. Elle fait intervenir le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (CPG, CLHP), qui permet l'individualisation et la quantification des constituants, avec une technique spectroscopique (SM, IRTF, etc.), qui permet leur identification par comparaison de leurs données spectrales avec celles de produits connus ;
- la voie B, est préconisée lorsque les constituants d'un mélange présentent des difficultés d'identification (structures d'un nouveau composé et/ou structures très proches). Deux étapes sont nécessaires : après purification/isolement des composés par différentes techniques chromatographiques, une analyse structurale est réalisée en s'appuyant sur la RMN du ^{1}H et du ^{13}C;
- enfin la voie C, intermédiaire entre les deux précédentes, met en œuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C (RMN) sans séparation préalable des composés ou précédée d'une étape de fractionnement réduite au minimum. Cette voie, initiée par Formácek et Kubeczka (1982a/1982b) a été développée, optimisée et informatisée par l'équipe de « Chimie et Biomasse » (UMR CNRS n° 6134 – SPE – Université de Corse) depuis une vingtaine d'années pour devenir un véritable outil analytique pour l'identification des constituants d'un mélange naturel.

III.2 Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A

Dans un premier temps, nous allons décrire les différents couplages, utilisés dans des domaines très divers, entre une technique chromatographique et une technique spectroscopique. Cette partie traitera tout d'abord des différents couplages avec une

technique de chromatographie en phase gazeuse (CPG) et, ensuite, avec une technique de chromatographie en phase liquide.

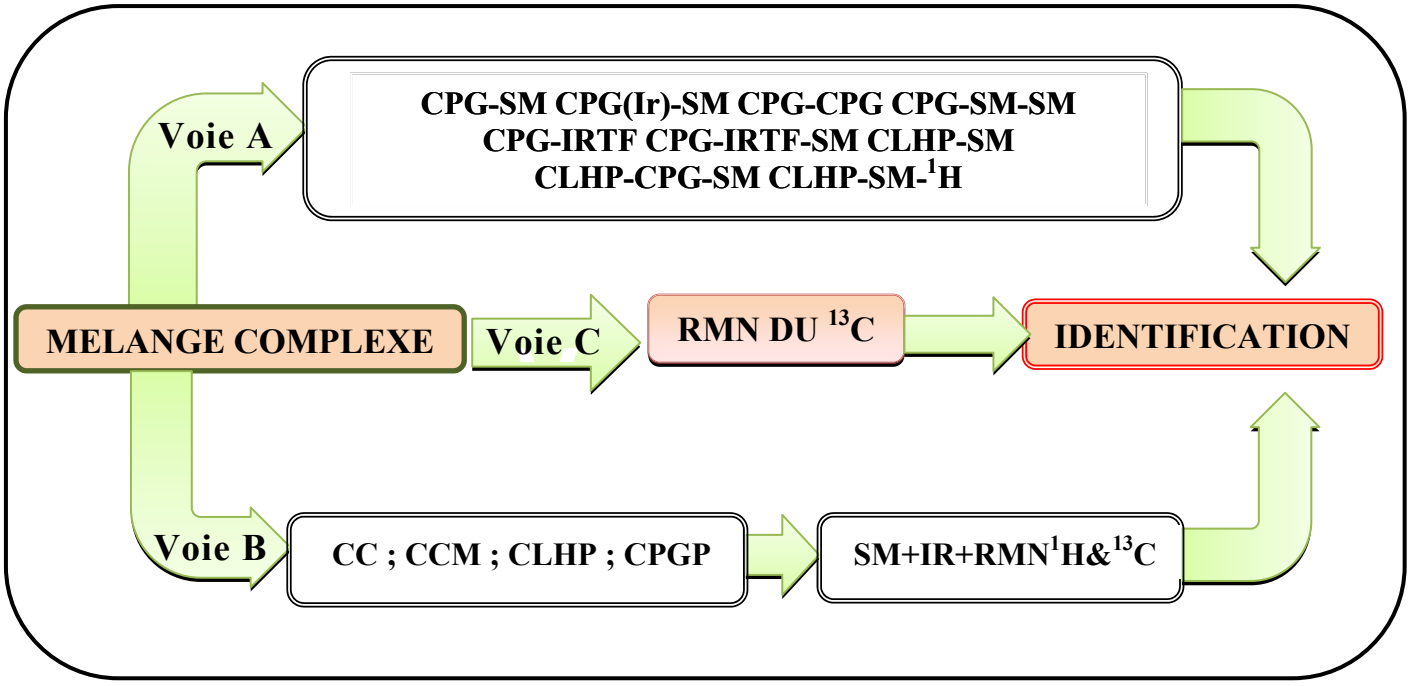


Figure 4 : les principales voies d'analyse d'un mélange complexe naturel

III.2.1 La CPG et les indices de rétention

Le concept de la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) a été introduit par Archer John Porter Martin et Richard Laurence Millington Synge, qui publient dès 1941 la théorie de la chromatographie de partage liquide-liquide. Ils reçoivent en 1952 le prix Nobel de chimie pour cette découverte qui bouleversera le monde de l'analyse. Depuis 1955, avec la mise sur le marché du premier appareil de chromatographie en phase gazeuse, grâce aux progrès de l'instrumentation (colonnes capillaires, détecteurs, etc.) et à sa relative facilité d'emploi, cette technique de séparation est l'une des plus indispensables et des plus répandues dans les laboratoires de chimie analytique.

Pour chaque composé séparé dans la colonne capillaire appropriée pour un mélange naturel (huiles essentielles, acides gras, pesticides, etc.), des indices de rétention (Ir), sur colonne apolaire ou/et colonne polaire, plus fiables que les temps de

rétention, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcanes linéaires à température constante (Indice de Kováts ou IK) (Kováts, 1965) ou en programmation de température par interpolation linéaire, indices de rétention (Ir). Il existe aussi d'autres méthodes de calcul d'indices de rétention utilisant une gamme d'étalon d'esters méthyliques d'acides gras (Herent M.-F. *et al.*, 2007 ; Marie D. *et al.*, 2007).

Bien que dans la grande majorité des cas, chaque molécule possède des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire qui lui sont propres, deux molécules peuvent fortuitement coéluer et présenter des indices de rétention identiques (par exemple, le limonène coélue avec le β-phellandrène sur colonne apolaire DB-1). Cependant, une reproductibilité parfaite des Ir est difficile à atteindre et ne peut en général être observée qu'avec des chromatogrammes des mélanges et des références réalisés dans les mêmes conditions expérimentales au sein d'un même laboratoire. Par ailleurs, des variations d'indice de rétention pouvant atteindre 5 et même 20 unités sont fréquemment observés pour un même composé, entre les données de la littérature et celles du laboratoire en particulier sur une colonne polaire (Grundschober, 1991).

Bien que la CPG reste l'une des techniques d'analyse la plus utilisée (car les indices de rétention donnent une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative) l'identification des constituants d'une huile essentielle ne peut rigoureusement pas être obtenue par CPG. De ce fait, l'indice de rétention qui dépend des conditions opératoires (nature de la phase stationnaire, programmation de la température, vieillissement de la colonne, etc.), ne représente pas une base suffisante pour une identification.

Ainsi, dans le but de rendre fiable l'identification des constituants des huiles essentielles, divers couplages de la CPG avec des techniques spectroscopiques ont été développés.

III.2.2 Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique

III.2.2.1 Les couplages CPG-SM

En chimie analytique, d'importants progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG-SM en mode impact électronique (IE), dit CPG-SM(IE), est la technique utilisée en analyse de routine dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder, à l'aide d'électrons, une molécule préalablement éluée sur la colonne capillaire qui sera ensuite fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement, constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux des composés contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales (Sandra et Bicchi, 1987 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1994; Adams, 1989 et 2001 ; Jennings et Shibamato, 1980 ; Masada, 1976 ; Joulain et König, 1998). En général, l'utilisation des bibliothèques élaborées avec des spectres de masse enregistrés dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques, demeurent les plus performantes et permettent des identifications plus fiables que les bibliothèques commerciales.

En fait, dans la pratique, l'utilisation conjointe de la SM (utilisation simultanément de bibliothèques de laboratoire et de littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles (Adio *et al.*, 2004 ; Lianga *et al.*, 2004 ; Maia *et al.*, 2004 ; Chericoni *et al.*, 2004; Senatore *et al.*, 2004 ; Verma *et al.*, 2010).

Dans le cas des huiles essentielles riches en sesquiterpènes et diterpènes, des problèmes d'identification peuvent persister en utilisant la SM(IE) associée aux indices de rétention mesurés sur deux colonnes de polarité différente. Des informations complémentaires peuvent être obtenues avec des techniques « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN)

(Schultze *et al*., 1992 ; Lange et Schultze, 1988). L'ICP et ICN produisent des ions quasi moléculaires correspondant à des ions qui ne sont pas visibles en mode impact électronique. La SM(IC) permet également de différencier les alcools et leurs esters par l'observation de leurs pics moléculaires. C'est le cas, par exemple, du (*E*)-nérolidol et de l'acétate de (*E*)-nérolidyle lorsque l'ammoniac est employé comme gaz réactif (Schultze *et al.*, 1992).

III.2.2.2 Les couplages CPG-SM-SM

Une amélioration de l'analyse spectrale est obtenue en utilisant la SM multidimensionnelle à double analyseur (SM-SM), qui est réputée pour sa sélectivité nettement supérieure à celle du spectromètre à un seul analyseur (Cazaussus *et al.*, 1988 ; Decouzon *et al.*, 1990). Cette technique a été utilisée dans le cadre d'analyses de certaines molécules à l'état de traces, de contrôles de fabrication de produits pharmaceutiques et polluants environnementaux (Cazaussus *et al.*, 1988), de détection de traces de pesticides dans les aliments (Zhao et Mao, 2011). Cette technique consiste à sélectionner les ions correspondant à un rapport m/z choisi au moyen d'un premier analyseur qui joue ainsi le rôle de filtre. Les fragments de l'ion secondaire constituent un deuxième spectre de masse qui diffère en fonction de l'origine de l'ion primaire (Rouessac et Rouessac, 2004).

Dans le domaine des huiles essentielles, Decouzon *et al.*, (1990) ont montré que la SM-SM(ICN) permet la différenciation des quatre stéréoisomères du dihydrocarvéol à partir des fragments caractéristiques obtenus, qui diffèrent en fonction de la stéréochimie axiale ou équatoriale des groupements hydroxyle et méthyle. Ce couplage a aussi permis de mettre en évidence dans l'huile essentielle de vétiver de Chine la présence de 20 composés, dont l'identification n'a pu être réalisée uniquement par CPG-SM. Ces auteurs ont identifié 118 composés dans cette huile essentielle dont l'α-cédrène, l'acoradiène et le khusimène (Sellier *et al.*, 1991).

III.2.2.3 Le couplage CPGxCPG-SM

La CPG bidimensionnelle (CPGxCPG) a été récemment mise en œuvre pour mieux séparer des constituants qui coéluent en CPG conventionnelle. Elle est utilisée dans le cas où la résolution des pics obtenus en CPG est insuffisante pour parvenir à une caractérisation complète de mélanges très complexes (Philipps et Beens, 1999 ; Dallüge *et al.*, 2003). Cette méthode est basée sur l'utilisation en ligne de deux colonnes capillaires, placées dans deux fours distincts. La première colonne est d'une longueur moyenne (25-30 m) avec une polarité apolaire, la deuxième est plus courte (0,5-0,8 m) et polaire. L'installation comporte deux détecteurs et une vanne d'introduction entre les deux colonnes. Le transfert est assuré par un modulateur dont les fonctions sont d'isoler, de concentrer et d'introduire continuellement des coupes d'effluents de la première colonne vers la deuxième colonne. Ainsi, la CPG bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse (CPGxCPG-SM), permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec des composés plus importants. Elle a aussi été utilisée pour la caractérisation des effluents pétrochimiques (Vendeuvre *et al.*, 2004), dans l'analyse des médicaments (Songa *et al.*, 2004) ou dans le domaine alimentaire (Tranchida *et al.*, 2004). En outre, la CPG-2D a été utilisée dans l'analyse fine des huiles essentielles complexes, qui par exemple contiennent de nombreux sesquiterpènes ou diterpènes, ou des sesquiterpènes oléfiniques qui coéluent avec des monoterpènes oxygénés. Ainsi, Marriott *et al.*, (2000) l'ont appliquée à l'analyse de l'huile essentielle de *Vetiveria zizanioïdes* qui s'est révélée très complexe. Mondello *et al.*, (2005) ont également utilisé cette technique pour éluer séparément le β-bisabolène, l'acétate de néryle et le bicyclogermacrène, présents dans l'huile essentielle de *Citrus limonum* et qui coéluent en CPG conventionnelle avec la phase et les conditions expérimentales utilisées.

Comme l'ont bien montré les exemples précédents, l'utilisation du couplage en ligne d'une ou plusieurs techniques chromatographiques avec une ou plusieurs techniques spectroscopiques est un procédé performant. Pourtant, toutes ces méthodes ont leurs limites, et l'identification des composants d'un mélange complexe tel qu'une

huile essentielle requiert souvent l'emploi de plusieurs de ces techniques. Ainsi, l'analyse par CPG-SM, en combinaison avec les indices de rétention sur deux colonnes de polarité différente, donne d'excellents résultats pour l'analyse de nombreuses huiles essentielles. De même, l'utilisation de deux techniques d'identification complémentaires est recommandée pour l'analyse d'une huile essentielle (Joulain, 1994).

Malgré tous ces perfectionnements, certains auteurs, confrontés à l'analyse des huiles essentielles extrêmement complexes (ciste, vétiver, etc.) ont opté pour une séparation de tous les constituants préalablement à leur identification. Cette stratégie est illustrée dans la voie B décrite ci-dessous.

III.3 Identification des constituants après purification : Voie B

L'identification des différents composés d'un mélange complexe peut également être réalisée selon le principe de la voie B basé sur la séparation des constituants préalablement à leur identification. Il s'agit d'un protocole analogue, ou presque, à celui mis en œuvre pour l'identification de molécules nouvelles. Le mélange est d'abord fractionné par différentes techniques chromatographiques, telles la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur colonne (CC), la CLHP et la CPG préparatives (CPGP) précédées ou non d'une distillation fractionnée ou d'une cristallisation. Les différents composés isolés ou présents dans des fractions enrichies sont ensuite identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles de produits de références : spectre de masse, spectre IR, spectres de RMN du ^{1}H ou du ^{13}C (lorsque la quantité de produit isolé est suffisante), éventuellement RMN bidimensionnelle. Cette voie est indispensable lorsqu'il s'agit d'élucider la structure d'un composé qui n'a jamais été décrit. Elle est d'une fiabilité et d'une efficacité indiscutable quand il s'agit de l'identification, dans le cas des huiles essentielles complexes, mais elle demande énormément de temps pour le fractionnement, la purification des produits et pour leur identification.

De ce fait, nous pouvons citer à titre d'exemple pour illustrer l'intérêt cette méthode les nombreux travaux de Weyerstahl et ses collaborateurs menés sur diverses huiles essentielles extrêmement complexes (Weyerstahl *et al*., 1996/1997/ 2000a/2000b/2000c ; Weyerstahl et Schlicht, 1997). Ainsi, l'huile essentielle de Vétiver d'Haïti est réputée pour être l'une des plus complexes du monde car elle est composée de très nombreux composés minoritaires sesquiterpéniques aux propriétés physico-chimiques et aux données spectroscopiques voisines. Il est par conséquent très difficile d'isoler ces composés et de les identifier. L'huile essentielle a été fractionnée suivant une partition acido-basique. La partie neutre a été soumise à une distillation fractionnée qui a permis de séparer les produits lourds des produits légers, puis les différents constituants ont été séparés par CC répétitives puis éventuellement par CCM. Ces constituants ont ensuite été analysés par CPG-SM, RMN ^{1}H, et quelquefois par RMN (-^{1}H et -^{13}C).

Kalemba (1999) a également utilisé cette voie pour analyser les huiles essentielles de la partie aérienne d'Artemisia *asiatica* Nakai. Après avoir fractionné l'huile essentielle et séparé la plupart de ses composés, l'auteur en a identifié 86 en utilisant généralement la CPG(IK), la CPG-SM et la RMN-^{1}H.

Au laboratoire à l'Université de Corse, de nouvelles molécules ont été isolées et caractérisées lors de l'analyse de certaines huiles essentielles. Après séparation et purification par chromatographies successives (colonnes de silice, Sephadex), ces molécules ont été caractérisées par les techniques spectroscopiques conventionnelles incluant la RMN 1D et 2D. Ainsi, le 4-*épi*-*cis*-dihydroagarofurane dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* de Madagascar (Cavalli *et al.*, 2004a), les esters de β-cyclolavandulyle et de β-isocyclolavandulyle dans l'huile essentielle de *Peucedanum paniculatum* de Corse (Vellutini *et al.*, 2005), le *cis*-*cis*-para-menthenolide dans l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* de Corse (Sutour *et al*., 2010) ou des vinylcyclohexènes dans l'huile essentielle de *Xylopia aethiopica* de Côte d'Ivoire (Yapi *et al.,* 2012a).

L'analyse des données de la littérature montre que la voie A, de par sa rapidité, est plus particulièrement bien adaptée aux analyses de routine, notamment dans le domaine des huiles essentielles. La voie B, plus longue, souvent privilégiée pour les mélanges non volatils, s'applique à l'analyse des huiles essentielles très complexes (renfermant des sesquiterpènes, des diterpènes, des molécules rares et nouvelles). L'utilisation de la RMN 1D ou 2D, qui constitue un formidable outil d'analyse structurale, rend cette voie plus intéressante. Etant donné l'importance de la RMN-^{13}C dans l'identification des molécules organiques, une autre voie (voie C) a été mise en œuvre pour l'analyse des mélanges complexes. Elle est basée sur l'identification et parfois la quantification des composés à partir du spectre de RMN-^{13}C des mélanges, sans séparation préalable. Cette technique a été développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse et fait l'objet de divers travaux depuis plusieurs années.

III.4 Analyse par RMN-^{13}C sans séparation préalable : Voie C

La RMN-^{13}C a été utilisée depuis le début des années quatre-vingt pour confirmer la présence d'un constituant dans un mélange complexe naturel, préalablement identifié par une autre technique, la SM par exemple. Le principe de cette méthode est simple : il s'agit d'observer dans le spectre du mélange, les raies de résonance appartenant à un composé donné et ce faisant identifier ce composé. Comme nous l'avons mentionné, l'objectif de cette méthode est donc d'éviter, ou tout au moins de réduire, les étapes fastidieuses de purification des constituants. C'est à la suite des travaux précurseurs de Formácek et Kubeczka (1982a, 1982b) qu'une méthode d'identification des constituants des mélanges naturels, basée sur l'examen du spectre de RMN ^{13}C, a été mise au point, développée et informatisée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse (Tomi *et al.*, 1995).

III.4.1 Intérêt de la RMN-^{13}C

Malgré sa faible abondance isotopique naturelle (1,1%) et son moment gyromagnétique qui le rendent environ 5700 fois moins sensible que le proton (Günther, 1994), le ^{13}C est malgré tout préféré aux autres noyaux dans le domaine de l'analyse des mélanges complexes car il présente les avantages suivants :

- le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents noyaux présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non équivalents. De ce fait, on observe, dans la très grande majorité des cas, autant de raies de résonance sur le spectre de RMN-^{13}C qu'il y a de carbones dans la molécule ;
- les spectres de RMN-^{13}C peuvent être simplifiés par irradiation totale des noyaux d'hydrogène, ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une seule raie de résonance par carbone ;
- le temps de relaxation transversal T_2 (temps de relaxation spin-spin) est plus important pour le carbone que pour le proton. Ainsi, la largeur à mi-hauteur du signal de résonance étant inversement proportionnelle à T_2, il en résulte un gain dans la finesse des pics et donc en résolution ;
- le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage de 240 ppm, beaucoup plus vaste que celle du proton (12 ppm). Ceci contribue à une meilleure dispersion spectrale. Un grand nombre de raies de résonance est observable dans le spectre du mélange en évitant un nombre rédhibitoire de superpositions.
- l'enregistrement des spectres de RMN-^{13}C est réalisé à température ambiante, sans changement d'état physique, évitant ainsi la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles ;

III.4.2 Identification des constituants en mélange par RMN-^{13}C

L'identification des constituants d'un mélange par RMN-^{13}C est réalisée par comparaison des déplacements chimiques du mélange avec ceux des composés de référence contenus dans une ou plusieurs bibliothèques de spectres. Il faut souligner que chaque constituant ne fait pas l'objet d'une individualisation. Pour identifier un

composé au sein d'un mélange, il faut être à même de pouvoir observer les signaux qui lui appartiennent et de les individualiser, puis d'attribuer les déplacements chimiques à une molécule donnée.

III.4.2.1 Observation et individualisation des signaux

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dans le spectre d'un mélange dépend de divers paramètres :

- la sensibilité de l'appareil qui s'exprime par le rapport signal sur bruit (S/B) ;
- la masse de produit disponible ;
- la solubilité du produit dans le solvant choisi ainsi que de sa viscosité ;
- le nombre d'acquisitions.

L'individualisation des raies de résonance dépend de la résolution de l'appareil de RMN elle même liée à l'intensité du champ magnétique. Plusieurs aspects doivent être considérés :

- grâce au développement des aimants supraconducteurs, la RMN voit sa sensibilité croître fortement avec l'intensité du champ magnétique des aimants. Il est donc possible d'utiliser des quantités de plus en plus faibles de produit. C'est pourquoi, il est aujourd'hui possible de réaliser des spectres de RMN de mélanges naturels avec des appareils de routine, 9,4 Tesla par exemple. Par ailleurs, certaines séquences impulsionnelles permettent d'augmenter la sensibilité. Ainsi, l'irradiation des protons liés aux noyaux de carbone, produit par l'intermédiaire de l'Effet Overhauser Nucléaire (NOE), une augmentation d'intensité pouvant s'élever à 200% (Günther, 1994 ; Hesse *et al.*, 1997). Cette technique est couramment utilisée lors de l'enregistrement des spectres de mélanges, ne serait ce que pour simplifier les spectres.

- l'amélioration du rapport S/B et l'observation du maximum de signaux dans le spectre, nécessitent d'augmenter le nombre d'acquisitions. Néanmoins, le rapport S/B étant proportionnel à la racine carrée du nombre d'acquisitions, au-delà d'un certain seuil, le temps d'analyse – et donc le temps d'occupation de l'appareil - devient prohibitif par rapport au gain. Si les composés sont en trop faible quantité (teneur trop

faible dans le mélange), il est difficile d'obtenir un rapport S/B correct, même en augmentant considérablement le nombre d'acquisitions.

Parallèlement à la sensibilité, il faut tenir compte de la résolution de l'appareil qui permet d'individualiser les signaux dans le spectre du mélange. On peut définir la limite de résolution comme la plus petite différence de fréquence entre deux signaux de résonance pouvant encore être enregistrés séparément (Williamson et Neuhaus, 1989). L'individualisation des signaux d'un composé pur pose rarement des problèmes, les superpositions fortuites des signaux de deux carbones étant assez exceptionnelles. En revanche, dans le cas du spectre d'un mélange complexe, le nombre de constituants et le nombre de carbones qui composent chaque molécule, sont autant de facteurs qui augmentent la probabilité de superposition de raies de résonance. La résolution est donc un facteur essentiel pour l'identification des constituants d'un mélange complexe. Elle croît avec le champ magnétique. Cette meilleure séparation des signaux de résonance des différents noyaux permet de limiter le nombre de superpositions se produisant fortuitement et donc de faciliter l'identification. La résolution peut aussi être améliorée par diverses techniques d'acquisition et/ou de traitement des données du signal (Claridge, 1999).

III.4.2.2 Attribution des signaux

L'identification d'un composé par RMN-^{13}C dans un mélange complexe est réalisée par comparaison des valeurs des déplacements chimiques des signaux du spectre du mélange avec celles des spectres de produits de référence. A la différence des spectres de masse, il est très peu probable que deux composés de structures différentes présentent des spectres de RMN-^{13}C superposables ou insuffisamment différenciés. En effet, la fréquence de résonance des carbones étant très sensible à l'environnement électronique et stérique, la moindre modification structurale se traduit par des variations plus ou moins importantes, mais généralement mesurables, des signaux de pratiquement tous les carbones de la molécule. De plus, les valeurs des déplacements chimiques d'une molécule sont indépendantes de la valeur du champ

magnétique B_0, des angles d'impulsion, des paramètres d'enregistrement des spectres mais aussi du traitement du signal. Cependant, selon la fonctionnalisation des molécules, ces valeurs peuvent être influencées par la nature du solvant mais surtout par la concentration et la présence d'autres molécules (par exemple, à cause de liaisons hydrogènes). Il est donc possible d'utiliser des données de la littérature pour l'identification des composés en mélange. Toutefois, afin d'obtenir une plus grande fiabilité des déplacements chimiques, les conditions d'analyse (dilution, nature du solvant, température) doivent être identiques. Cette méthode a ainsi été appliquée à l'analyse de différents types de mélanges complexes (hydrocarbures, lipides, sucres). Nous nous limiterons à ses applications aux huiles essentielles.

L'utilisation de la RMN-^{13}C pour l'identification des principaux constituants des huiles essentielles a fait l'objet des travaux précurseurs de Formácek et Kubeczka (Formácek et Kubeczka, 1982a, 1982b, 1982c ; Kubeczka et Formácek, 1984). Ces auteurs ont constitué leur propre bibliothèque de spectres enregistrée dans le C_6D_6 et en analysant les huiles essentielles dans les mêmes conditions expérimentales, ils ont montré qu'il était possible de confirmer la présence des terpènes dans une huile essentielle, par ailleurs mise en évidence par CPG-SM.

Par la suite, diverses études sur l'analyse des huiles essentielles par RMN-^{13}C ont été réalisées. La plupart des auteurs utilisent la RMN-^{13}C pour confirmer la présence des composés précédemment identifiés par CPG-SM :

- divers diesters de néryle dans l'huile essentielle d'*Eupathorium cannabinum* ssp *corsicum* (Paolini *et al.*, 2007) ;
- l'estragole et le linalol qui différencient les huiles essentielles d'*Ocimum forskolei* Benth et d'*Ocimum basilicum* L. (Fatope *et al.*, 2008).

Par ailleurs, Ferreira *et al.* (2001) ont mis au point une méthode d'identification des constituants d'un mélange complexe, basée sur l'étude du spectre de RMN-^{13}C du mélange et sa comparaison avec des spectres de mono et sesquiterpènes décrits dans la littérature. Un logiciel informatique prend en compte simultanément les valeurs des

différents déplacements chimiques observés dans le mélange et la multiplicité de chacun des carbones, préalablement déterminée par des séquences de DEPT. Après consultation de la bibliothèque de spectres, construite à partir des données de la littérature, le logiciel propose une identification. Cette méthode a été appliquée à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Piper cernum* et *P. regnellii*. Les auteurs ont identifié respectivement dix et cinq constituants, qui sont en fait les composés majoritaires de ces huiles essentielles.

III.4.3 La méthode d'analyse développée au laboratoire

Depuis le début des années 90, l'équipe « Chimie et Biomasse » utilise la RMN-^{13}C comme outil d'analyse des mélanges complexes naturels. L'objectif de cette méthode est l'identification, et éventuellement la quantification, des constituants de mélanges naturels sans étape préalable de purification ou avec un fractionnement réduit autant que possible.

Cette méthode est basée sur la comparaison des déplacements chimiques du spectre du mélange avec ceux de composés de référence contenus dans des bibliothèques de spectres (Figure 5). L'enregistrement des spectres de référence et des mélanges est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales (nature du solvant, concentration, paramètres d'enregistrement des spectres). Son originalité réside dans l'informatisation du traitement des données spectroscopiques, grâce à un logiciel d'aide à l'identification spécialement élaboré au laboratoire. Ce logiciel d'aide à l'identification permet l'édition des informations nécessaires à la caractérisation des constituants d'un mélange, à savoir :

- le nombre de signaux observés par rapport au nombre de signaux attendus pour chaque molécule ;
- les variations de déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence ($\Delta\delta$) ;
- le nombre de superpositions de signaux qui se produisent lorsque les différents effets stériques et électroniques font que des carbones appartenant à des molécules

différentes ont fortuitement le même déplacement chimique, ou lorsque des molécules présentent des structures très proches ;

- de plus, l'intensité des pics permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à tel ou tel composé.

Cette méthode a été appliquée à différentes familles de molécules (terpènes, lipides, sucres, phénols) selon un protocole expérimental spécifiquement adapté (Tomi et Casanova, 2000, 2006 ; Bighelli et Casanova, 2009).

Ainsi, différentes bibliothèques de spectres ont été construites au laboratoire, au départ à partir de produits commerciaux. Elles sont régulièrement enrichies avec les spectres de composés isolés à partir de mélanges naturels ou préparés par hémisynthèse. La bibliothèque la plus importante est celle des terpènes qui contient les données de près d'un millier de molécules (mono- sesqui- et diterpènes ainsi que des phénylpropanoïdes que l'on trouve dans les huiles essentielles). Par ailleurs, une deuxième bibliothèque contenant les données spectrales publiées dans la littérature récente, a été élaborée permettant ainsi de disposer de plusieurs centaines de spectres de référence. L'avantage de la RMN-^{13}C réside dans le fait que pour chaque molécule nouvelle isolée dont l'analyse structurale a été faite, son spectre de RMN-^{13}C est décrit dans sa totalité, contrairement à la description des autres spectres SM ou IR (seuls les principaux fragments ou les raies d'absorption les plus importantes sont décrits) ou encore RMN ^{1}H (divers signaux apparaissant sous forme de multiplets). De plus, les spectres étant actuellement enregistrés à partir d'une quantité minime (quelques milligrammes en général) de produit purifié, la concentration est faible et la reproductibilité des déplacements chimiques est très bonne.

La méthode d'identification des constituants des mélanges par RMN-^{13}C a été appliquée avec succès au laboratoire à différentes familles de produits naturels, huiles essentielles, extraits végétaux, résines, biocombustibles. Après enregistrement et traitement de plusieurs milliers de spectres, le bilan peut être établi comme suit :

- la teneur minimale des composés identifiables avec un spectromètre de routine (9,4 T) est de l'ordre de 0,3-0,4% ;

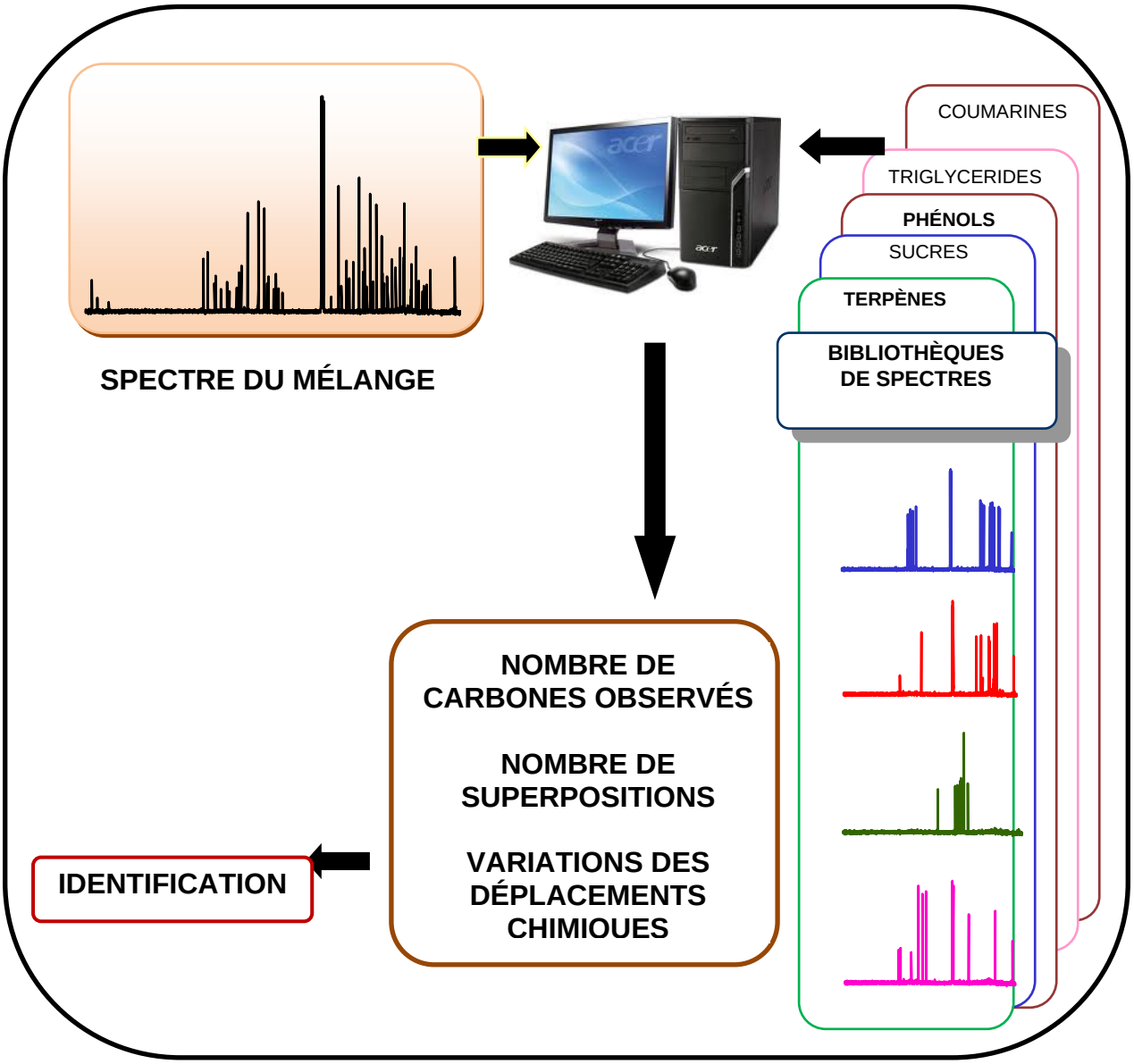


Figure 5 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN-^{13}C.

- en général, tous les carbones des molécules identifiées sont observés, à l'exception de certains carbones (notamment les quaternaires) appartenant aux produits minoritaires ;
- le nombre de superpositions est limité et n'empêche pas l'identification d'un composé ;

- les variations de déplacement chimique par rapport aux carbones de référence sont généralement inférieures à 0,05 ppm pour la très grande majorité des carbones. Il y a quelques exceptions, en particulier avec les composés phénoliques (thymol, carvacrol…) (Castola *et al.*, 1997).

III.4.3.1 Application à l'analyse d'huiles essentielles

L'analyse par RMN-^{13}C, qui unit rapidité et fiabilité, est complémentaire des techniques conventionnelles exposées précédemment dans les voies A et B. Nous rappelons aussi quelques études réalisées au sein du laboratoire.

III.4.3.2 Caractérisation d'huiles essentielles

La caractérisation des huiles essentielles – et d'ailleurs de tout mélange naturel– peut prendre plusieurs aspects en fonction du besoin et de l'objectif assigné. Ainsi, pour la très grande majorité des huiles essentielles, les 10-30 composés majoritaires représentent 80-96% de la composition chimique globale et sont donc suffisants pour caractériser cette huile essentielle. Il faut toutefois signaler que la connaissance des composés minoritaires est parfois un paramètre important de la qualité biologique ou organoleptique du produit et qu'en conséquence une analyse fine est souvent nécessaire. Il faut également souligner qu'une analyse peut être totalement faussée par la mauvaise identification d'un seul composé.

Au laboratoire de l'Université de Corse, la méthode d'analyse basée sur la RMN-^{13}C, utilisée en complément de la CPG(Ir) ou en combinaison avec la CPG(Ir) et la CPG-SM, a permis de caractériser un grand nombre d'huiles essentielles de plantes (spontanées ou cultivées) de Corse, de Sardaigne et du pourtour méditerranéen, d'Afrique, de Madagascar, d'Asie, d'Amérique Centrale et du Sud.

Dans une huile essentielle de *Piper bavinum* du Viêt-Nam (Lesueur *et al.*, 2009), 38 constituants présents avec des teneurs comprises entre 0,4 et 10% ont pu être identifiés sans aucune séparation préalable. Cette analyse ne présentait toutefois pas de

difficulté majeure, tous les composés étant présents dans notre bibliothèque de spectres construite au laboratoire. Dans cet exemple, la quantification des constituants, préalablement identifiés par RMN et repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention (colonnes apolaire et polaire) a été réalisée par CPG(FID).

Le persifiperfolan-9α-ol a été détecté pour la première fois dans l'huile essentielle d'*Artemisia vulgaris* du Viêt-Nam (Nguyen *et al.*, 2004), de même que de nombreux composés sesquiterpéniques possédant le squelette bicyclo [4.4.0] décanique : cadinanes, muurolanes, eudesmanes, sélinanes ont été identifiés dans l'huile essentielle de *Fokienia hodgibsii* du Viêt-Nam. Ces sesquiterpènes se différencient par la position des substituants méthyle et isopropyle, par la stéréochimie relative de ces substituants ainsi que par la stéréochimie *cis* ou *trans* de la jonction de cycles.

A l'aide de cette méthode, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse (UMR CNRS 6134 SPE) a mené de nombreuses études sur des huiles essentielles de plantes aromatiques de Madagascar. A titre d'exemple, nous pouvons citer :

- l'huile essentielle d'écorce de Katrafay ou *Cedrelopsis greveï*, riche en sesquiterpènes et dominée par l'ishwarane, le (*E*)-β-caryophyllène, l'α-copaène, le β-élémène et l'α-sélinène (Cavalli *et al.,* 2003) ;

- l'étude de variabilité interspécifique des huiles essentielles de six espèces du genre Helichrysum: *H. gymnocephalum, H. bracteiferum, H. faradifani, H. selaginifolium, H. hypnoïdes* et *H. cordifolium* (Cavalli *et al.*, 2001) ;

- la caractérisation chimique des huiles essentielles de cinq autres espèces, *Cinnamomum camphora*, *Cupressus lusitanicus*, *Eucalyptus citriodora*, *Lantana camara* et *Tagetes bipinata* (Cavalli, 2002).

- l'identification et la quantification de l'ascaridole et de l'isoascaridole dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* (Cavalli *et al.*, 2004b) ;

III.4.3.3 Identification de stéréo-isomères

La RMN-^{13}C constitue un bon moyen d'identification de certains stéréo-isomères dont l'analyse par les techniques conventionnelles s'avère délicate. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'identification d'un des quatre stéréo-isomères du dihydroagarofurane dans l'huile essentielle d'écorces de *Cedrelopsis greveï* de Madagascar (Cavalli *et al.*, 2004a).

III.4.3.4 Identification de molécules thermosensibles

La RMN-^{13}C a également pu être utilisée pour analyser des molécules thermosensibles dans des huiles essentielles. Ainsi, dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Madagascar, elle a permis d'identifier et de quantifier l'ascaridole, un monoterpène comportant un motif peroxyde qui se réarrange thermiquement durant l'analyse par CPG pour conduire à son isomère l'isoascaridole (Cavalli *et al.*, 2004b). Par combinaison de la RMN et de la CPG, la quantification de l'ascaridole et de l'isoascaridole a pu être obtenue.

III.4.3.5 Étude de la variabilité chimique

En permettant l'identification des composés jusqu'à une teneur de 0,3-0,5%, la RMN-^{13}C, combinée à une quantification par CPG (indices de rétention), est bien adaptée à l'étude de la variabilité chimique puisqu'elle permet d'identifier, à partir d'un spectre unique, les composés majoritaires d'une huile essentielle. Elle a été appliquée avec succès à de nombreuses huiles essentielles dont *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* ssp. *insularis* (Sutour *et al.*, 2010) et *Cedrus atlantica* de Corse (Paoli et al., 2011), *Myrtus communis* (Bouzabata *et al.*, 2013) et *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* d'Algérie *(*Bekhechi *et al.*, 2012*)*, *Xylopia villosa* et *Xylopia aethiopica* de Côte d'Ivoire (Yapi *et al.*, 2012b). Par ailleurs, plus de 200 variétés d'agrumes cultivées en Corse ont fait l'objet d'une étude (Lota *et al.*, 2000/2001a/2001b/2002) destinée à proposer une aide à leur classification taxonomique, sur la base de la composition chimique de leurs huiles essentielles.

En conclusion, il ressort de cette synthèse bibliographique, que la méthode mise au point et développée au laboratoire, d'identification (et éventuellement de quantification) des constituants des mélanges naturels, basée sur l'analyse informatisée du spectre de RMN-^{13}C du mélange, sans séparation préalable, est efficace et complémentaire des techniques conventionnelles. Elle a été appliquée avec succès aux huiles essentielles. Elle permet d'identifier et de quantifier des composés volatils ou non, des stéréo-isomères, des molécules thermolabiles, sans séparation ni dérivatisation préalable, après optimisation et validation des conditions expérimentales à chaque famille de composés.

CHAPITRE II

Caractérisation chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. var. *madagascariensis* (A. Camus)

I. DESCRIPTION BOTANIQUE

La famille des Poaceae est l'une des plus importantes du règne végétal et regroupe 620 genres, près de 7000 espèces dont le genre *Cymbopogon* (Boti, 2004). Ce genre comprend 56 espèces (Mabberley, 1999) à laquelle appartient *Cymbopogon giganteus* Chiov var. *madagascariensis*, autrefois nommé *Andropogon giganteus* qui fait l'objet de l'étude. Trois autres espèces sont présentes à Madagascar : *Cymbopogon citratus, C. flexosus* et *C. martinii*.

I.1. Biosystématique

La classification botanique est la suivante :

Règne :	VEGETAL
Embranchement :	ANGIOSPERMES
Classe:	MONOCOTYLEDONES
Ordre :	Graminales
Famille :	Graminées ou Poaceae Barnhart
Groupe :	Pooidées
Sous-groupe :	Andropogonées
Genre :	*Cymbopogon* Spreng
Espèce :	*giganteus*
Sub-espèce :	*madagascariensis*

1.2 Genre Cymbopogon Spreng (Bosser, 1969)

Ce genre est caractérisé par des inflorescences paniculées, en général denses et contrastées, les racèmes sont toujours géminés, plus ou moins inclus dans les spathéoles ou se dégageant latéralement. Il s'agit d'herbes souvent aromatiques, comptant surtout des espèces tropicales et subtropicales qui poussent en Afrique et en Asie. Il existe deux espèces cultivées assez communes à Madagascar : *C. citratus* (D.C. ex Nees) Stapf et *C.flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Wats.

1.3 Cymbopogon giganteus (Hochst) Chiov. var. madagascariensis (A. Camus)

Cymbopogon giganteus var. *madagascariensis* précédemment nommé *Cymbopogon caesinus* (Nees ex Hook & Arn.) Stapf (Stapf & Otto, 1906), illustrée par les figures 6 et 7, est connue sous le nom vernaculaire « Ahibero » dans la région où elle pousse. Cette plante se trouve le long de la côte ouest de Madagascar jusqu'au sud de Mahajanga Il s'agit d'une herbe annuelle, à chaumes fasciculés, moyennement robustes, dressés, parfois genouillés à la base et pouvant être radicants aux nœuds inférieurs, glabres, la hauteur peut varier de 40 cm à 1,5 m.



Figure 6 : photo d'Ahibero (cliché de l'auteur)

Les feuilles sont vertes glauques, glabres, à limbes plans, linéaires, peu ou pas arrondis à la base, rétrécis en longue pointe sétacée au sommet, ayant de 10-35 cm de long sur 4-15 cm de large ; ligule représentée par une membrane scarieuse, glabre, tronquée ou arrondie, de 1-3 mm de haut.

La figure 7 montre les inflorescences qui sont paniculées, oblongues, contractées et denses sur certains échantillons. Cependant, elles sont assez grêles et interrompues à la base, vert glauque, ayant de 5-30 cm de long. Les racèmes se désarticulent aisément,

courts et un peu inégaux, de 1-1,5 cm de long. Le racème est parfois sessile avec une paire d'épillets homogames à la base (Bosser, 1969).



Figure 7 : schémas de différentes parties de *Cymbopogon giganteus* (Hochst.) Chiov. Subsp *madagascariensis* (A. Camus) : f, fragment d'une souche ; g, portion d'inflorescence ; h, article de racème montrant l'épillet sessile vu de dos (long de 4-5 mm).

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 Propriétés naturelles et utilisations

La très grande majorité des espèces appartenant au genre *Cymbopogon* Spreng sont des plantes aromatiques (Bor, 1955). De nombreux auteurs ont étudié la composition chimique et certaines activités biologiques des huiles essentielles de ces espèces (Takaisi-Kikuni *et al.*, 2000 ; Cimanga *et al.*, 2002 ; Ketoh et al, 2002 ; Paranagama *et al,* 2003 ; Koba *et al.*, 2004). Plusieurs d'entre elles sont connues pour l'importance économique de leurs constituants tels le limonène, le citronellal, le citral (géranial + néral), le citronellol, le géraniol, l'acétate de géranyle, etc., qui sont utilisés dans divers secteurs d'activité (parfumerie, alimentaire, industrie, …) (Thapa *et al.,* 1971 ; Mabberley, 1999). Certaines espèces contribuent aussi à la conservation de la biodiversité à travers le monde (Bighelli etCasanova, 2009).

D'odeur agréable, *Cymbopogon giganteus* est utilisée dans la médecine traditionnelle africaine, le plus souvent seule, quelquefois en association avec d'autres plantes (Boti, 2004). Les indications thérapeutiques concernent plusieurs maladies :

- au Burkina Faso, les sommités fleuries réduites en poudre sont utilisées en cataplasme et en massage pour soulager la douleur des piqûres de scorpions (Fortin *et al.*, 1990) ;

- au Cameroun, les tradipraticiens considèrent la plante comme antipyrétiques. Les racines séchées et pulvérisées sont employées en inhalation nasale dans le traitement des maux de tête et du paludisme (Bello, 1984). Les Peuhls l'utilisent dans le traitement de certains maux de tête et des maladies mentales. Les européens l'ont utilisée au moment des épidémies de fièvre jaune (Tchuella, 1964) ;

- en Côte d'Ivoire, les décoctions des feuilles sont utilisées pour traiter la conjonctivite, le rhume et la migraine (Adjanohoun et Aké, 1979) ;

- au Mali, les décoctions des feuilles et des inflorescences constituent un remède pour le traitement des dermatoses (Adjanohoun *et al.*, 1979). Celles des inflorescences sont également utilisées sous forme de boisson et de bain dans le traitement des

hépatites (Adjanohoun et Aké, 1979). Les infusions des inflorescences de *Cymbopogon giganteus* et des feuilles de *Vepris heterophylla* R. sont utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle (Kéita, 1986). De même, l'infusion de la plante entière ou des inflorescences est prescrite pour le traitement de la bilharziose, de la fièvre jaune et de la jaunisse (Fortin *et al.*, 1990) ;

- au Niger, la partie aérienne est utilisée en décoction contre les douleurs rhumatismales et les toux émétisantes chez l'enfant (Adjanohoun et Aké, 1985) ;

- au Sénégal, *Cymbopogon giganteus* est employée pour ses propriétés antiseptiques pulmonaires, fébrifuges, anti-ictériques et antiamariles. En Casamance, les feuilles sèches servent souvent en masticatoire pour les gingivites, les aphtes et stomatites chez les enfants, et comme ingrédient stomachique. Le macéré de la plante entière est donné en boisson comme diurétique, anti blennorragique et tonifiant (Kerharo et Adam, 1974). La plante intervient également dans le traitement des problèmes mentaux (Dembelé, 1988 ; Bello, 1984),

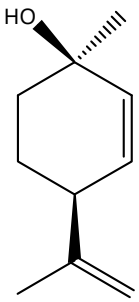
- à Madagascar, dans la région sud-ouest, une étude ethnobotanique, indique que la partie aérienne de *C. giganteus* est utilisée contre la toux, l'hypertension et aussi, par les femmes qui viennent d'accoucher.

En 2006, l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle des feuilles de *Cymbopogon giganteus* qui poussent au Bénin a été évaluée (Alitonou *et al.*, 2006).

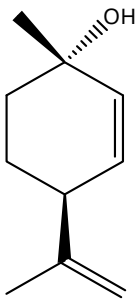
II.2 Etude bibliographique de l'huile essentielle de Cymbopogon giganteus Chiov

Par rapport à d'autres espèces de *Cymbopogon*, peu de travaux concernent la composition chimique des HE de *Cymbopogon giganteus*. L'étude bibliographique montre que les huiles essentielles sont caractérisées par la présence de molécules à squelette menthane et, en particulier, les p-menthadiénols (Figure 8). L'hydro distillation des inflorescences récoltées à Bamako (Mali) effectuée par Popielas *et al.* (1991) a donné un rendement de 1% environ. Ils ont identifié 18 composés représentant 97% de la composition totale. Cette huile essentielle est caractérisée par

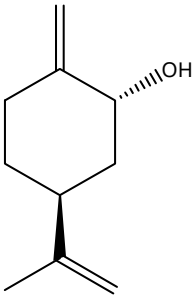
la prédominance des composés suivants : *trans*- et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols (20,4 et 17,2%), 1,2-époxyde de limonène (13,7%), p-mentha-2,8-dièn-1-ol (10,7%), *trans*-isopipériténol (10,1%) et carvone (7,1%).



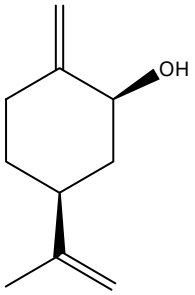
trans- p-mentha-2,8-dièn-1-ol



cis-p-mentha-2,8-dièn-1-ol



trans -p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol



cis- p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol

Figure 8 : Composés majoritaires dans les huiles essentielles de *C. giganteus :*

Ouamba *et al.*, en 1991, ont étudié les huiles essentielles des feuilles récoltées en Côte d'Ivoire et au Cameroun (Ouamba *et al.*, 1991). Les constituants majoritaires décrits dans l'huile essentielle de Côte d'Ivoire sont les *trans*- et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols (24,9 et 18,8%), les *trans*- et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ols (18,9 et 14,2%). On peut citer également les *cis*- et *trans*-isopipériténols (7,2 et 6,5%) puis la carvone (4,8%). L'huile essentielle du Cameroun se caractérise par la prédominance des isomères *trans* et *cis* du p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols, respectivement 32,4% et 16,8%, et des isomères *trans* et *cis* du p-mentha-2,8-dièn-1-ols, respectivement 14,3% et

9,0%. Viennent ensuite les isomères *cis* et *trans* de l'isopipériténols, respectivement 7,4% et 5,7%, et la carvone (3,9%).

En 1997, Ayedoun *et al* ont identifié 19 composés dans des huiles essentielles provenant de trois régions du Bénin. Le *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (13,9-22,5%), le *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (16,2-18,5%), le *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (14,4-18,4%), et le *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (7,6-8,6%) sont les composés majoritaires. Le limonène est présent avec des teneurs non négligeables (18,4-23,6%). Sont aussi détectés à des teneurs moins importantes, la carvone (2,3-3,2%), l'α-terpinéol (2,1-4,4%), le *trans*-isopipériténol (1,5-4,2%) et le *trans*-carvéol (0,6-3,1%).

Lors d'une étude de la composition chimique et des propriétés antioxydantes des huiles essentielles des feuilles récoltées à Ouagadougou (Burkina Faso), Menut *et al*. (2000) ont identifié 27 composés. Les principaux constituants sont le limonène (17,3%), le *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (17,0%), le *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (16,5%), le *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (13,8%), et le *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (9,3%). En plus de ces composés majoritaires, le *cis*-isopipériténol (4,5%) et la carvone (4,1%) sont présents à des teneurs appréciables.

Sidibé *et al.* ont identifié 27 composés en étudiant la composition chimique de huit échantillons d'huile essentielle des feuilles récoltées sur deux sites (Sotuba et Sindo) du Mali (Sidibé *et al.*, 2001). Ces échantillons d'huile essentielle se caractérisent par la prédominance des *trans*- et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols (24,0-35,2% et 16,0-24,0%) et des *trans*- et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ols (13,3-16,2% et 8,2-10,2%). Nous avons remarqué également la présence du limonène avec des proportions variables (0,5-13,2%), de la p-méthylacétophénone (3,2-6,0%) et de la carvone (0,1-2,9%).

Alitounou *et al*., en 2006, ont identifié quatorze constituants qui représentent 95% de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles qui ont été recueillies dans la région montagneuse de Savalou, au Bénin. Les quatre constituants

majoritaires sont identifiés : le *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (22,0%), le *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (19,9%), le *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (14,3%), et le *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (10,1%).

L'étude sur la composition chimique d'échantillons d'huiles essentielles provenant de Côte d'Ivoire, réalisée par Boti *et al.,* est sans doute la plus complète. Ils ont utilisé la technique d'identification par la RMN-^{13}C, en la combinant avec la spectrométrie de masse. 46 composés ont été identifiés, dont 25 observés pour la première fois dans les huiles essentielles de cette espèce (Boti *et al.*, 2006). Parmi ces nouveaux composés, nous citons les hydrocarbures sesquiterpéniques (β-élémène (*E*)-β-caryophyllene, β-sélinène, δ-cadinène), les monoterpènes oxygénés acycliques (citronellal, géraniol, géranial), dérivés oxygénés menthane (*cis* et *trans*-dihydropérylaldéhydes, thymol), phénylpropanoïde (safrole) et les oxydes ou peroxydes (ascaridole, précocène, oxyde de caryophyllène). Cette huile essentielle est caractérisée par une forte teneur en *trans* et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ols (18,4 et 8,7%), en *cis*- et *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols (16,0 et 15,7%) et en limonène (12,5%).

Enfin, des hydrodistillations ont été réalisées par Jirovezt *et al.*, en 2007, sur trois parties (inflorescences, feuilles et tiges) cueillies au Parc Waza (Province Nord du Cameroun). Elles ont donné des rendements de 0,4% (feuilles), 0,01% (tiges) et 1,4% (inflorescences). Plus de 55 composés ont été identifiés en combinant la CPG et CPG-SM. Les principaux constituants observés dans les différentes parties de la plante sont le cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (22,8 à 29,1%), le trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (21,6 à 28,1%), le trans-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (16,3 à 22,1%), le cis-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (4,6 à 9,7%) et le limonène (1,3 à 7,4%). Outre ces composés majoritaires, le trans-carvéol (1,9 à 4,8%), le trans-verbénol (1,4 à 1,8%) et la carvone (0,4 à 1,8%) sont identifiés à des teneurs appréciables.

Après une étude préliminaire réalisée en 2007 sur l'huile essentielle des parties aériennes de *C. giganteus* Chiov var. *madagascariensis* (A. Camus) poussant à l'état

spontané dans la région Sud-Ouest de Madagascar (Andojy, Toliara) dans le cadre d'un DEA, nous avons poursuivi en 2009 avec de meilleures conditions matérielles d'échantillonnage. Ainsi, nous avons durant deux années réalisé des échantillonnages dans la même région et étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. var. *madagascariensis* (A. Camus) qui n'a jamais fait l'objet d'une étude à Madagascar. Pour réaliser l'identification des constituants de l'huile essentielle, nous avons associé la CPG(Ir) et le couplage CPG-SM et la RMN-^{13}C.

III. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CYMBOPOGON GIGANTEUS* CHIOV. VAR. *MADAGASCARIENSIS* (A. CAMUS)

Le but de ce travail est double, d'une part, se familiariser avec la technique d'identification par RMN-^{13}C développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » (UMR 6134 SPE CNRS-Université de Corse) et d'autre part, caractériser chimiquement cette plante pour proposer une monographie à des acheteurs ou utilisateurs potentiels de cette huile essentielle.

III.1 L'huile essentielle de Cymbopogon giganteus var. madagascariensis

Le matériel végétal a été collecté entre mars et juillet 2009 et en mars, avril et mai 2010 à Befoly et Ampamata, dans la région sud-ouest de Toliara, grâce à la collaboration avec la société Soimanga dirigée par Dr. Pascal B. Rakotomanga. Deux types de distillation ont été réalisés :

- soit par hydro distillation avec un appareil de type Clevenger modifié (20 litres) durant trois heures au sein du laboratoire de Contrôle Qualité et Standardisation des Phytomédicaments à l'IMRA (Antananarivo) ;

- soit par entrainement à la vapeur d'eau durant trois heures dans une unité semi-industrielle (1500 litres) comportant un alambic en acier inoxydable, située au voisinage des sites d'échantillonnage (Toliara).

III.1.1 Analyse d'un échantillon d'huile essentielle par RMN-^{13}C et par CPG(Ir)

Un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes (inflorescence, feuilles et tiges) d'Ahibero a été analysé sans séparation préalable par CPG(Ir) et RMN-^{13}C. Ainsi, après enregistrement du spectre de RMN-^{13}C de l'huile essentielle, l'ensemble des valeurs des déplacements chimiques est introduit dans le logiciel d'aide à l'identification. L'interrogation de la banque « terpènes » nous a permis d'identifier 11 constituants, possédant le squelette menthane dont : *trans*-p-mentha-1,7(8)-dièn-2 ol, *cis*-p-mentha-1,7(8)-dièn-2 ol, *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol et *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol (figure 9). Tous les composés identifiés sont des monoterpènes représentant 86,2% de la composition totale. Nous observons la présence du limonène (14,5%) qui est le seul hydrocarbure terpénique présent en quantité importante.

Tous les constituants identifiés par RMN, sont ensuite repérés sur le chromatogramme en utilisant leurs indices de rétention sur les deux colonnes (apolaire et polaire), par comparaison avec ceux des produits de référence (tableau 3).

Le nombre de superpositions des signaux est limité à deux, ce qui est normal étant donné que le nombre de composés identifiés est faible. Ainsi, chaque composé est identifié par l'observation d'au moins 80% des signaux lui appartenant en propre ;

Les variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta$ ppm) observées entre les valeurs répertoriées dans le mélange et celles des spectres de référence sont inférieures ou égales à 0,05 ppm pour 85 signaux sur 105, comprises entre 0,06 et 0,09 ppm pour 11 signaux et enfin supérieures ou égales à 0,10 ppm pour les 09 signaux restants.

Tableau 3 : Composés identifiés à partir du spectre de RMN ^{13}C de l'huile essentielle brute de *Cymbopogon giganteus*

Composés	RMN	SUP	Ira	Irp	%a
Limonène	10/10	0	1019	1202	14,5
trans-p-mentha-2,8-dièn-1-ol	10/10	0	1101	1624	16,6
cis-p-mentha-2,8-dièn-1-ol	10/10	1	1113	1666	8,6
trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol*	10/10	0	1166	1794	16,6
3,9-oxy-mentha-1,8(10)-diène*	8/10	0	1166	1558	2,1
trans-isopipériténol	10/10	0	1177	1749	3,2
cis-isopipériténol*	10/10	0	1194	1744	2,3
trans-carvéol*	10/10	2	1194	1830	2,7
cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol	10/10	0	1201	1884	15,2
cis-carvéol	8/10	2	1205	1884	0,7
carvone	10/10	0	1211	1719	3,7
Total					**86,2**

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. RMN : nombre de signaux observés sur le spectre de RMN-^{13}C du mélange par rapport au nombre de signaux attendus. SUP : nombre de superpositions de signaux. Ir : indices de rétention sur colonnes apolaire (Ira) et polaire (Irp). CPG: pourcentage de chaque composé obtenu sur les colonnes apolaire (%a) excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire).

Les variations les plus importantes sont observées au niveau des carbones fonctionnalisés à savoir certains carbones portant une fonction hydroxyle ou cétone (0,10-0,15 ppm) et surtout le carbone C_2 de la carvone (0,21 ppm) mais également les carbones C_7 du *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (0,11 ppm), C_2 du *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (0,13 ppm), C_3 du *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (0,12 ppm) et C_4 du 3,9-oxy-mentha-1,8(10)-diène (0,14 ppm).

Ces variations importantes des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) sont probablement dues à des liaisons hydrogènes intermoléculaires, qui s'établissent entre les atomes d'oxygène des composés carbonylés et les atomes d'hydrogène de la fonction hydroxyle. Il faut signaler que ces variations, aussi importantes qu'inhabituelles, des déplacements chimiques de certains carbones ne gênent en rien l'identification des molécules.

III.1.2. Analyse de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* par combinaison de CPG(Ir), CPG-SM et RMN-^{13}C

L'analyse détaillée de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* a été réalisée par la combinaison de CPG(Ir) et de CPG-SM et la RMN-^{13}C (I1 dans tableau 5). Vingt composés qui représentent 88,8 % sont identifiés. Cependant, trois composés minoritaires demeurent non identifiés.

L'huile essentielle des parties aériennes est constituée essentiellement de monoterpènes. Les principaux constituants qui caractérisent l'huile essentielle possèdent le squelette carboné du p-menthane et excepté le limonène, il s'agit de composés oxygénés. Ainsi, les composés majoritaires observés possèdent la fonction alcool en position 1 (*trans*- et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ols) ou en position 2 (*trans*- et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols). Viennent ensuite des composés quantitativement moins importants qui possèdent la fonction alcool en position 3 (*trans*- et *cis*-isopipériténols) ou position 6 (*trans*- et cis-carvéols). Il a y aussi des composés carbonylés avec une fonction cétone en position 6 (carvone), une fonction aldéhyde en position 7 (périllaldéhyde, *trans*- et *cis*-dihydropérillaldéhydes) ou encore une fonction époxyde en position 1,2 (*trans*- et *cis*-époxyde de limonène) (figure 9).

III.1.3. Composition chimique des huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* distillées à l'échelle laboratoire et semi-industrielle

Dans le but de mieux caractériser *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* ou Ahibero de Madagascar, nous avons analysé huit échantillons d'huile essentielle des parties aériennes récoltées entre mars et juillet 2009. Quatre lots ont été distillés à l'échelle laboratoire (L1 à L4) et quatre autres distillés à l'échelle semi-industrielle (I1 à I4). A cause de contraintes techniques, les implantations du laboratoire et de l'unité semi industrielle étant séparées de plus de 1000 km, le matériel végétal conduisant à L1 et à I1 n'est pas le même.

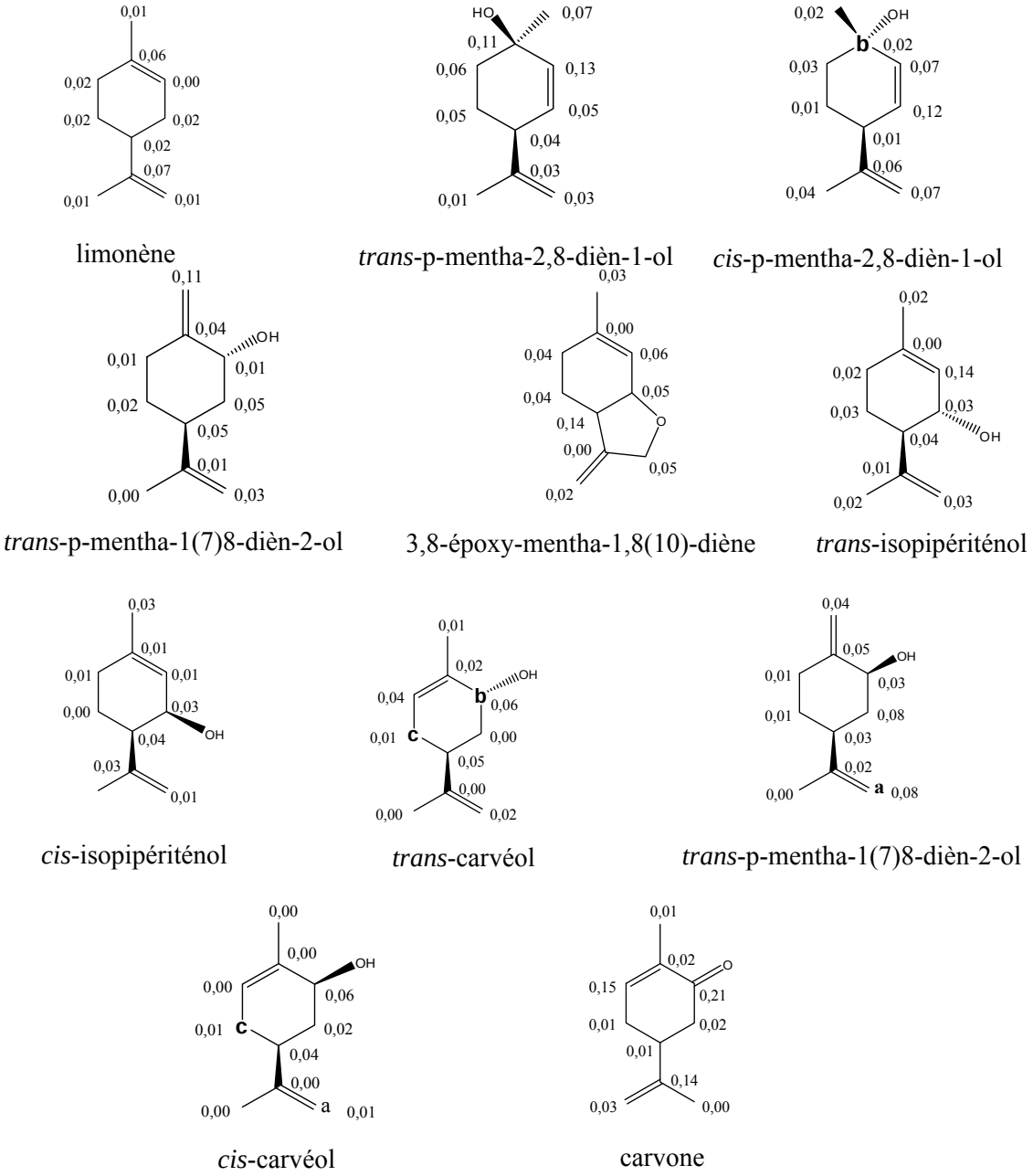


Figure 9 : principaux constituants de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* identifiés par RMN-^{13}C. Pour chaque carbone, l'écart entre la valeur expérimentale et la valeur de la banque est donnée (Δδ). Les lettres indiquent les superpositions.

Ainsi, nous avons analysé tous les échantillons, par combinaison des deux techniques habituelles CPG(Ir) et RMN-^{13}C et un échantillon par SM (I1). Vingt composés représentant 86,2 à 96,9% de la composition chimique des échantillons ont

été identifiés. Nous notons une grande homogénéité de l'échantillonnage. Tous les échantillons d'huile essentielle d'Ahibero sont caractérisés par la prédominance des squelettes menthadiénols : *trans*-p-mentha-1,7(8)-dièn-2 ol (L1 à L4 : 14,7-22,1% ; I1 à I4 : 16,6-22,4%), *cis*-p-mentha-1,7(8)-dièn-2 ol (L1 à L4 : 12,3-19,0% ; I1 à I4 : 13,7-16,2%), *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol (L1 à L4 : 11,2-18,3% ; I1 à I4 : 16,6-19,0%) et *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol (L1 à L4 : 8,3-8,7% ; I1 à I4 : 8,6-9,8%). Le limonène est présent à des teneurs importantes : 15,3 à 24,0% (laboratoire) et 11,6 à 17,3% (alambic). Le *trans*- isopipériténol (laboratoire : 2,3-8,9% et alambic : 3,2-3,9%) *cis*-isopipériténol (laboratoire : 2,1-3,8% et alambic : 2,3-2,7%), le *trans*-carvéol (laboratoire : 2,5-3,2% et alambic : 2,7-3,0%), la carvone (laboratoire : 3,1-4,1% et alambic : 3,4-3,7%) et le 3,9-oxy-mentha-1,8(10)-diène (laboratoire : 1,5-1,9% et alambic : 2,1-2,7%) sont présents dans tous les échantillons en quantités appréciables. Enfin, plusieurs constituants sont présents à des teneurs non négligeables dans tous les échantillons : *trans*- et *cis*-1,2-époxyde de limonène (laboratoire : 0,1-1,1% et alambic : 0,2-0,6%), *cis*- et *trans*-dihydropérillaldéhyde (laboratoire : 0,3-0,6% et alambic : 0,2-1,1%).

La composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes obtenue à l'échelle laboratoire est très proche de celle obtenue à l'échelle semi-industrielle quel que soit le moment de la récolte. L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau 5 et a fait l'objet d'une publication (Rabehaja *et al.*, 2010).

En comparant la composition chimique de nos échantillons avec les données bibliographiques, nous observons la similitude du profil de l'huile essentielle de Madagascar avec ceux de *Cymbopogon giganteus* Chiov d'autres pays. Ainsi les molécules à squelette p-menthane sont majoritairement présentes dans l'espèce poussant à l'état spontané dans la région Sud-Ouest de Madagascar : les *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (14,7-22,4%), *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (12,3-19,0%), suivis par les *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (11,2-19,0%) et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (8,3-9,8%). Le limonène est identifié avec une proportion importante (11,6-24%) pendant la période de mars au juin.

En tenant compte de la teneur des cinq constituants majoritaires (tableau 4), la similitude de la composition de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov de Madagascar avec celles des *Cymbopogon giganteus* des pays d'Afrique continentale, apparaît forte. Ainsi, les *trans*- et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols et *trans*- et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ols sont majoritairement présents quelle que soit l'origine des huiles essentielles. Le *cis*-p-mentha-2,8-dien-1-ol est toujours le moins abondant parmi les 4 alcools menthaniques. Le limonène présente des variations plus importantes et peut exceptionnellement être le composé majoritaire, par exemple dans l'échantillon L1 (Tableau 5).

La comparaison avec les données bibliographiques permettent de conclure que l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov de Madagascar présente une similitude avec celle des pays d'Afrique continentale (tableau 4), mais chaque échantillon a sa spécificité.

Tableau 4 : Teneur des cinq constituants majoritaires de l'HE de *C. giganteus* à Madagascar et en Afrique.

Constituants						
	Madagascar	Bénin	Burkina Faso.	Cam.	Côte. Ivoire.	Mali
Limonène	5,1-24,0	18,4-23,6	17,3	4,9	12,5-21,5	0,5-13,2
trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol	11,2-19,0	13,9-22,5	13,8	22,1	15,0-18,4	13,3-16,2
cis-p-mentha-2,8-dien-1-ol	8,3-9,8	7,6-8,6	9,3	5,4	8,6-8,7	8,2-10,2
trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	14,7-22,1	16,2-18,5	17,0	21,6	10,9-15,7	24,0-35,2
cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	12,3-19,0	14,4-18,4	16,5	27,7	14,4-18,4	16,0-24,0

Cam. : Cameroun (Jirovezt *et al.*, 2007 ; Côte d'Ivoire (Boti *et al.*, 2006) ; Mali (Sidibé *et al.*, 2001).

Par ailleurs, il y a de nombreux composés, certes minoritaires (*myrténal et acétate de myrtényle,* Bénin *; 4-isopropénylcyclohex-2-énone,* Burkina Faso *; camphre* et *p-menth-4(8)-èn-9-ol,* Cameroun *; precocène I,* Côte d'Ivoire ; *déca-2,4-dièn-1-ol* et *déca-2,4-diénal,* Mali) mais présents à des teneurs appréciables, qui sont détectés ou non dans les huiles essentielles de diverses origines. Les variations observées dans les différentes huiles essentielles sont probablement liées à différents facteurs (pédoclimatiques, environnementaux, génétiques).

III.1.4. Identification des hydroperoxydes possédant le squelette menthane

D'autres échantillons d'HE ont été aussi analysés successivement par CPG(Ir) et RMN ^{13}C. Dans un échantillon distillé à l'échelle du laboratoire, nous avons noté la présence en quantité assez importante de quatre composés qui avaient déjà été repérés en plus faible quantité dans les huiles essentielles étudiées dans le paragraphe 3.1.3. Ces composés, absents des bibliothèques des spectres du laboratoire, ont été identifiés par comparaison avec les données spectrales de la littérature. Il s'agit de molécules à squelette p-menthanique : *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-hydropéroxyde (A), *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-hydro-peroxyde (B), *trans-p*-mentha-1(7),8-dien-2-hydropéroxyde (C) et *cis-p*-mentha-1(7),8-dièn-2-hydropéroxyde (D). L'identification des quatre composés sera détaillée dans le paragraphe 4 « Identification de constituants par rapport aux données de la littérature ». Cet échantillon a été aussi analysé par CPG-SM, ce qui a permis de confirmer la présence de quatre constituants. Ces analyses ont conduit à l'identification de 24 composés qui représentent 92,5% de la composition globale (tableau 6).

Ces quatre composés n'ont jamais été décrits dans les huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* en Afrique continentale. Toutefois, ils ont été décrits dans une huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* du Japon (Kiuchi *et al.*, 2002). Compte tenu de l'éloignement des sites de collecte et de distillation, nous ne pouvons pas exclure que ces composés puissent se former avant la distillation puisque celle-ci

peut avoir lieu plusieurs jours après la récolte du végétal. Nous avons donc réalisé une série d'essais pour voir si ces composés ne sont pas des artéfacts.

Tableau 5 : Composition chimique des huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* (Befoly, 2009)

Composés	Ir a	Ir p	L1 % 19/03	L2 % 07/04	L3 % 20/04	L4 % 03/06	I1 % mars	I2 % avril	I3 % mai	I4 % juillet	Identification		
p-cymène	1011	1274	0,3	0,2	0,2	0,2	*0,3*	0,4	0,4	**0,5**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
limonène	1022	1205	**24,0**	**15,3**	**20,6**	**6,3**	***14,5***	**17,3**	**11,6**	**5,1**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
p-cyménène	1072	1440	0,3	0,3	0,2	0,3	*0,4*	**0,6**	**0,6**	**0,9**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
trans-*p*-mentha-2,8-dièn-1-ol	1103	1632	**16,3**	**15,7**	**18,3**	**11,2**	***16,6***	**17,9**	**18,1**	**19,0**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
cis-*p*-mentha-2,8-dièn-1-ol	1115	1673	**8,3**	**8,4**	**8,7**	**8,6**	***8,6***	**9,0**	**9,3**	**9,8**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
trans-1,2-époxyde de limonène	1119	1447	**1,1**	**0,8**	**0,8**	**0,5**	*0,4**	0,4*	0,2*	0,1*	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
cis-1,2-époxyde de limonène	1123	1459	0,4	0,3	0,2	0,4	*0,4*	0,4	**0,5**	**0,6**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
trans-*p*-mentha-1(7),8-dièn-2-ol	1169	1794	**14,9***	**14,7***	**14,9***	**22,1***	***16,6****	**17,3***	**19,5***	**22,4***	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
3,9-oxy-mentha-1,8(10)-diène	1169	1561	**1,5***	**1,8***	**1,9***	**1,9***	***2,1****	**2,1***	**2,4***	**2,7***	Ir		RMN-^{13}C
cis-dihydropérillaldéhyde	1172	1604	**0,6**	**0,8**	0,3	0,5	*0,3*	0,4	**0,5**	0,4	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
trans-dihydropérillaldéhyde	1175	1608	**0,7***	**1,1***	**0,9***	**0,9***	*0,3**	0,2*	**0,7***	**0,7***	Ir		RMN-^{13}C
trans-isopipériténol	1179	1751	**2,3**	**3,8**	**2,7**	**8,9**	***3,2***	**3,2**	**3,8**	**3,9**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
cis-isopiperiténol	1196	1745	**2,2***	**2,6***	**2,1***	**3,8***	***2,3****	**2,6***	**2,7***	**2,7***	Ir		RMN-^{13}C
trans-carvéol	1196	1828	**2,5***	**2,6***	**2,7***	**3,2***	***2,7****	**2,8***	**3,0***	**3,0***	Ir		RMN-^{13}C
cis-*p*-mentha-1(7),8-dièn-2-ol	1203	1886	**12,3**	**13,7**	**14,9**	**19,0**	***15,2***	**13,7**	**15,4**	**16,2**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
cis-carvéol	1208	1884	0,2	**0,6**	**0,6**	**0,8**	***0,7***	**0,8**	**0,6**	**0,5**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
carvone*	1214	1728	**3,9**	**3,9**	**3,1**	**4,1**	***3,7***	**3,4**	**3,5**	**3,6**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
périllaldéhyde	1244	1783	0,4	0,4	0,3	0,4	*0,3*	0,3	0,4	0,4	Ir,	SM,	RMN-^{13}C
ascaridole	1273	1886	0,1	0,1	0,1	0,2	*0,2*	0,1	0,1	0,3	Ir		RMN-^{13}C
hexanoate de phényléthyle	1610	2168	0,3	0,3	0,3	**1,0**	-	0,3	0,4	**0,5**	Ir,	SM,	RMN-^{13}C

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1), excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire).

Les composés dont les pourcentages sont en gras sont identifiés par CPG(Ir) et RMN-^{13}C. Les composés dont les pourcentages sont en italique dans l'échantillon I1 sont identifiés par CPG-SM. Les composés minoritaires (teneur inférieure à 0,5%) des échantillons sont identifiés par comparaison de leurs indices de rétention sur les deux colonnes avec ceux des composés déjà identifiés par CPG-SM dans l'échantillon I1 et par RMN ^{13}C. L1 à L4 : hydro distillation laboratoire. I1 à I4 : distillation par entrainement à la vapeur semi-industrielle.

Tableau 6 : Composition chimique d'huile essentielle obtenue par distillation à l'échelle laboratoire, riche en composés A, B, C et D (juin 2009).

Composés	Ira	Irp	%a	Identification
p-cymène	1011	1274	0,5	Ir, SM, RMN-^{13}C
limonène	1022	1205	5,6*	Ir, SM, RMN-^{13}C
p-cyménène	1072	1440	0,3	Ir, SM, RMN-^{13}C
trans-*p*-mentha-2,8-dièn-1-ol	1103	1632	9,6	Ir, SM, RMN-^{13}C
cis-*p*-mentha-2,8-dièn-1-ol	1115	1673	8,0	Ir, SM, RMN-^{13}C
trans-1,2-époxyde de limonène	1119	1447	0,5	Ir, SM, RMN-^{13}C
cis-1,2-époxyde de limonène	1123	1459	0,4	Ir, SM, RMN-^{13}C
trans-*p*-mentha-1(7),8-dièn-2-ol*	1169	1794	19,6	Ir, SM, RMN-^{13}C
3,9-oxy-mentha-1,8(10)-diène*	1169	1561	1,7	Ir, RMN-^{13}C
cis-dihydropérillaldéhyde	1172	1604	tr	Ir, SM
trans-dihydropérillaldéhyde*	1175	1608	0,8	Ir, RMN-^{13}C
trans-isopipériténol	1179	1751	1,0	Ir, SM, RMN-^{13}C
cis-isopipériténol*	1196	1745	1,5	Ir, RMN-^{13}C
trans-carvéol*	1196	1828	3,5	Ir, RMN-^{13}C
cis-*p*-mentha-1(7),8-dièn-2-ol	1203	1886	17,6	Ir, SM, RMN-^{13}C
cis-carvéol	1208	1884	0,7	Ir, SM, RMN-^{13}C
carvone	1214	1728	3,2	Ir, SM, RMN-^{13}C
périllaldéhyde	1244	1783	0,5	Ir, SM, RMN-^{13}C
ascaridole	1273	1886	-	
trans-*p*-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde (A)	1285	nd	**9,3**	Ir, SM, RMN-^{13}C
cis-*p*-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde (B)	1298	nd	**2,7**	Ir, SM, RMN-^{13}C
trans-*p*-mentha-1(7),8-dièn-2-hydropéroxyde (C)	1311	nd	**4,7**	Ir, SM, RMN-^{13}C
cis-*p*-mentha-1(7),8-dièn-2-hydropéroxyde (D)	1351	nd	**1,1**	Ir, SM, RMN-^{13}C
hexanoate de phényléthyle	1610	2168	0,5	Ir, SM, RMN-^{13}C
TOTAL			**92,5**	

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). % a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). nd : indices de rétention non définis.

III.1.5. Paramètres pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle et la teneur en peroxydes.

Nous avons réalisé plusieurs essais pour déterminer l'origine des hydroperoxydes. La première hypothèse est que la formation des peroxydes puisse se produire après la collecte ou bien pendant le transport entre Toliara et le laboratoire à Antananarivo (1000 Km). Vu l'éloignement des sites de collecte et les conditions

matérielles sur le terrain, il est difficile de mener des essais de distillation immédiatement après récolte (sur place).

III.1.5.1 Influence de la durée récolte/distillation

Un échantillon de parties aériennes d'Ahibero a été collecté à Befoly en juin 2009 et a été distillé à la fois en laboratoire et à l'échelle semi-industrielle (Alambic). La distillation par entraînement à la vapeur avec l'alambic a été faite le jour après la collecte tandis que celle à l'échelle laboratoire a été effectuée trois jours après. Les échantillons d'huile essentielle obtenus ont été analysés par CPG(Ir) et RMN ^{13}C (tableau 7).

Ainsi, trois hydroperoxydes à squelette p-menthanique sont présents dans l'huile essentielle distillée avec l'alambic : *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde, *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde et *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydropéroxyde. Ces trois composés sont également identifiés dans l'huile essentielle obtenue par la distillation à l'échelle laboratoire avec des proportions un peu plus importantes. La durée de temps écoulé entre la collecte et la distillation du végétal ne semble pas avoir d'influence sur la présence des peroxydes. L'hypothèse que ces composés se forment durant la distillation doit aussi être examinée. Nous avons donc procédé à d'autres essais pour étudier ce paramètre.

III.1.5.2 Influence du procédé de distillation

En 2010, nous avons effectué des collectes des plantes d'Ahibero dans deux endroits différents (Befoly et Ampamata) et les extractions ont été réalisées à l'échelle laboratoire. Chaque lot collecté a été partagé en deux : le premier a été distillé dans un ballon avec un appareil type Clevenger (hydro distillation) et l'autre moitié a été distillée par entraînement à la vapeur avec un petit montage artisanal (type cocotte-minute). Les échantillons ont été analysés par CPG(Ir) de façon à avoir leurs teneurs

relatives respectives et l'identification des composés a été réalisée par RMN-^{13}C (tableau 8).

Tableau 7 : Composition chimique de l'HE des parties aériennes en fonction du procédé de distillation.

Composés			**Laboratoire**		**Alambic**		**Identification**	
	Ira	Irp	%a	%p	%a	%p		
p-cymène	1011	1274	0,2	0,2	tr	0,5	Ir	
limonène	1020	1203	6,3	7,3	4,6	4,7	Ir,	RMN-^{13}C
p-cyménène	1071	1398	0,3	tr	0,8	tr	Ir,	RMN-^{13}C
trans-p-mentha-2,8-dièn-1-ol	1103	1627	11,2	13,9	19,4	20,5	Ir,	RMN-^{13}C
cis-p-mentha-2,8-dièn-1-ol	1115	1670	8,6	8,9	9,7	9,8	Ir,	RMN-^{13}C
trans-1,2-époxyde de limonène	1119	1447	0,5	0,1	0,8	0,1	Ir,	RMN-^{13}C
cis-1,2-époxyde de limonène	1122	1459	0,4	0,6	0,6	0,7	Ir,	RMN-^{13}C
trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol	1169	1798	21,8	19,9	24,6	22,4	Ir,	RMN-^{13}C
3,9-oxy-mentha-1,8(10)-diène	1169	1561		1,9		2,6	Ir,	RMN-^{13}C
cis-dihydropérillaldéhyde	1172	1605	0,5	0,5	0,6	0,4	Ir,	RMN-^{13}C
trans-dihydropérillaldéhyde	1175	1608	0,8	0,2	1,2	0,2	Ir,	RMN-^{13}C
trans-isopipériténol	1180	1748	8,9	9,4	3,5	2,6	Ir,	RMN-^{13}C
cis-isopipériténol	1197	1748	7,7	4,0	5,4	2,4	Ir,	RMN-^{13}C
trans-carvéol	1197	1833		3,6		3,0	Ir,	RMN-^{13}C
cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol	1205	1888	21,0	21,6	16,4	17,0	Ir,	RMN-^{13}C
cis-carvéol	1208	1864	0,8	0,3		0,6	Ir,	RMN-^{13}C
Carvone	1214	1734	4,1	3,4	3,5	3,3	Ir,	RMN-^{13}C
périllaldéhyde	1243	1784	0,4	tr	0,4	0,3	Ir	
ascaridole	1275	1864	0,2	0,6	0,1	0,6	Ir,	RMN-^{13}C
trans-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde	1286	nd	0,7	-	0,3	-	Ir,	RMN-^{13}C
cis-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde	1298	nd	tr	-	0,1	-	Ir	
trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydropéroxyde	1311	nd-	0,2	-	0,1	-	Ir	
TOTAL			94,6	96,4	92,1	91,7		

Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). % a et % p : pourcentages mesurés sur double colonne (apolaire et polaire). Laboratoire : distillation avec la cocotte-minute. Alambic : distillation à l'entraînement à la vapeur d'eau. nd : indices de rétention non définis.

Tableau 8 : Etude des paramètres : techniques de distillation et le mode de stockage de l'huile

Lieu de récolte Date de récolte	Ampamata 17/03/10		Befoly 17/03/10		Ampamata 23/04/10		Ampamata 21/05/10	
EV : entrainement à la vapeur HD : hydro distillation	EV	HD	EV	HD	EV	HD	Verre ambré	Verre
Composés	% a	% a	% a	% a	% a	% a	% a	% a
limonène	28,5	24,5	28,1	23,8	33,3	14,2	1,8	2,2
p-cyménène	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	1,1	0,2	0,2
trans-p-mentha-2,8-dièn-1-ol	9,0	12,0	9,2	11,1	13,2	12,8	11,7	11,1
cis-p-mentha-2,8-dièn-1-ol	6,5	6,8	6,5	6,3	7,0	6,9	8,2	8,1
trans-1,2-époxyde limonène	1,1	1,0	1,1	1,1	1,3	1,4	0,5	0,5
trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol	13,6*	11,41*	14,9*	11,7*	12,4*	17,1*	20,9*	21,0*
3,9-oxy-mentha-1,8(10)-diène	1,2*	1,4*	1,2*	1,3*	1,5*	1,3*	2,1*	2,1*
cis-dihydropérillaldéhyde	0,8	1,0	0,7	0,6	0,6	0,8	1,1	1,0
trans-dihydropérillaldéhyde	0,7	1,1	0,7	0,5	0,9	0,7	0,8	0,8
trans-isopipériténol	4,1	3,0	4,2	2,4	3,0	2,0	6,4	6,6
cis-isopipériténol	2,8*	2;3*	2,8*	2,0*	2,1*	2,0	3,7*	3,7
trans-carvéol	2,8*	2,7*	2,8*	2,9*	2,5*	3,8	3,8*	3,9
cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol	12,2	12,4	11,3	12,8	10,5	18,8	18,8	18,2
cis-carvéol	0,6	3,0	1,1	1,1	1,1	1,5	1,6	0,1
carvone	4,8	3,8	4,6	3,5	3,3	4,4	4,2	4,1
périllaldéhyde	0,4	0,4	tr	0,4	0,3	0,4	0,7	0,6
trans-p-mentha-2,8-dièn-1-hydroperoxyde	1,6	5,2	1,6	7,7	1,4	4,7	3,9	4,8
cis-p-mentha-2,8-dièn-1-hydroperoxyde	0,6	1,3	0,6	1,9	0,4	1,4	1,1	1,4
trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydroperoxyde	0,8	2,2	0,8	3,6	0,5	2,7	2,2	2,8
cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydroperoxyde	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	-	-
hexanoate de 2-phényléthyle	0,4	0,6	0,4	0,6	0,2	0,7	1,2	1,3

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ir a et Ir p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). % a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). nd : indices de rétention non définis. Flacon P

Ainsi, nous avons obtenu les résultats suivants :

les teneurs des *trans*- et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxydes et le *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydropéroxyde ont plus que doublé, voire plus dans les trois lots distillés avec le Clevenger (hydrodistillation) par rapport à ceux distillés par entraînement à la vapeur. Le taux du limonène diminue quand les taux des composés à squelettes p-menthadiénols et ses hydroperoxydes augmentent. Il semblerait donc que l'hydrodistillation génère une plus grande teneur en hydroperoxydes. Il faut souligner que les caractéristiques physico-chimiques de l'eau utilisée n'ont malheureusement pas pu être mesurées.

Certains auteurs ont rapporté que l'oxydation du limonène par l'oxygène singulet produit des hydroperoxydes (Kiuchi *et al.,* 2002). Ils ont montré aussi que la dégradation des hydroperoxydes est évidente quand les parties aériennes fraîches de *Chenopodium ambrosoïdes* sont distillées par entraînement à la vapeur. Par rapport à nos résultats obtenus avec les deux types de distillation (tableau 8), nous avons constaté une nette diminution de la teneur des peroxydes à squelette p-menthaniques lorsque l'extraction est réalisée par l'entraînement à la vapeur. Il est probable que les peroxydes « naturellement présents » soient partiellement détruits lors de l'entraînement à la vapeur.

III.1.5.3 Influence du mode de conservation de l'huile essentielle

Parallèlement à ces expériences, nous avons aussi étudié l'évolution de la composition chimique durant une période de six mois. Un lot d'huile essentielle d'Ahibero a été partagé en deux : le premier stocké dans un flacon en verre ambré rempli à ras de bord et l'autre stocké aussi dans un flacon en verre et rempli à moitié.
Les teneurs des hydroperoxydes varient peu avec le mode de stockage de l'huile essentielle. La formation de ces composés n'est pas corrélée au mode de stockage. La difficulté à réaliser les échantillonnages ne nous a permis de réaliser une nouvelle campagne de récolte et de distillation. A ce stade, nous pouvons cependant émettre

l'hypothèse que ces composés ont une origine naturelle mais que le mode d'extraction influe fortement sur les teneurs en hydroperoxydes à squelette p-menthanique.

IV. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS PAR RAPPORT AUX DONNEES DE LA LITTERATURE

Dans ce paragraphe, nous portons une attention particulière aux molécules absentes de la bibliothèque « Terpènes » et qui ont été identifiées à partir de la bibliothèque « Littérature ». Nous présentons pour chaque molécule la structure, l'attribution des déplacements chimiques de chaque carbone observé dans l'échantillon cité dans le tableau 6. L'analyse du spectre de RMN-^{13}C d'huile essentielle brute a permis de repérer une série de quarante raies de résonance qui correspondent aux composés *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydroperoxyde (A, Ira = 1285) et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde (B, Ira = 1298), *trans*- p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydro-peroxyde (C, Ir = 1311) et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydro-peroxyde (D, Ir = 1351).

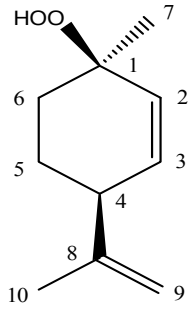
IV.1 trans- et cis p-mentha-2,8-dièn-1-hydroperoxyde (A et B)

Les valeurs de déplacements chimiques du trans-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde observées dans l'huile essentielle (respectivement 9,3 et 2,7%), sont conformes à celles publiées par Kiuchi *et al*. en 2002 malgré l'observation de la valeur d'écart pour le C_7 du composé A ($\Delta\delta$ = 1,69 ppm). (figures 10 et 11).

IV.2 trans- et cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydroperoxydes (C et D)

Les figures 12 et 13 montrent les valeurs de déplacements chimiques des trans- et cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydropéroxydes observées dans l'huile essentielle (respectivement 4,7 et 1,1%).

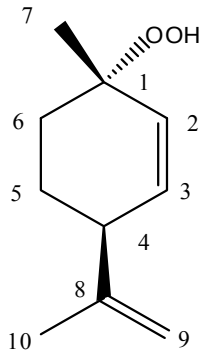
Les valeurs obtenues sont aussi conformes avec celles publiées par Kiuchi *et al*. (2002) excepté pour le C_5 du *trans-p*-mentha-1(7),8-dièn-2-hydroperoxyde ($\Delta\delta$ =7,21 ppm) . Mais il s'agit probablement d'une erreur.



trans-p-Mentha-2,8-diène-1-hydroperoxyde

C	δ (ppm) Kiuchi *et al.*, 2002	δ (ppm) **A**
1	79,4	79,18
2	129,3	129,57
3	135,9	135,61
4	43,9	43,59
5	24,5	24,50
6	31,0	31,01
7	26,4	24,71
8	147,7	147,81
9	111,0	110,95
10	20,8	20,82

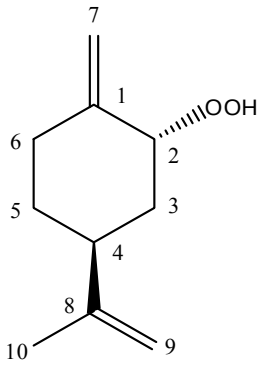
Figure 10 : Structure et déplacements chimiques du *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydroperoxyde décrits par Kiuchi *et al., (*2002) et observés dans l'HE de *C. giganteus* var. *madagascariensis*.



cis-p-Mentha-2,8-diène-1-hydroperoxyde

C	δ (ppm) Kiuchi *et al.*, 2002	δ (ppm) **B**
1	80,8	80,57
2	130,0	130,32
3	134,6	134,28
4	42,6	42,68
5	24,8	24,90
6	30,0	30,19
7	24,3	24,38
8	147,2	147,25
9	111,0	110,95
10	21,2	21,25

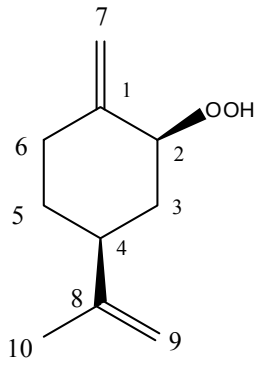
Figure 11 : Structure et déplacements chimiques du cis-p-mentha-2,8-dièn-1-hydropéroxyde décrits dans la littérature (Kiuchi *et al.*, 2002) et observés dans l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis*.



trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydropéroxyde

C	δ (ppm) Kiuchi *et al.*, 2002	δ (ppm) **C**
1	145,20	145,52
2	85,50	85,27
3	35,50	35,55
4	38,60	38,62
5	32,40	39,61
6	30,40	30,42
7	114,00	113,66
8	149,00	149,14
9	109,00	109,33
10	20,70	20,73

Figure 12 : Structure et déplacements chimiques du *trans*-p-mentha-1(7),8-diène-2-hydropéroxyde décrits dans la littérature (Kiuchi *et al.*, 2002) et observés dans l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis*.



cis-p-Mentha-1(7),8-dièn-2-hydropéroxyde

C	δ (ppm) Kiuchi *et al.*, 2002	δ (ppm) **D**
1	146,70	146,66
2	85,20	85,25
3	37,00	37,14
4	43,90	43,89
5	32,70	32,77
6	34,10	34,16
7	105,30	105,35
8	148,40	148,45
9	109,40	109,33
10	20,70	20,73

Figure 13 : Structure et déplacements chimiques du *cis*-p-mentha-1(7),8-diène-2-hydropéroxyde décrits dans la littérature (Kiuchi *et al.*, 2002) et observés dans l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis*.

V. PROPOSITION DE MONOGRAPHIE D'HUILE ESSENTIELLE D'AHIBERO

Dans l'intérêt des utilisateurs et acheteurs, il est indispensable de proposer une monographie de l'huile essentielle d'Ahibero ou *Cymbopogon giganteus* Chiov. var *madagascariensis* (A. Camus).

Après la caractérisation de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C, en considérant les études comparatives de sa composition chimique par rapport aux différents types de distillation (laboratoire et alambic), nous suggérons une monographie de cette huile essentielle pour mieux la faire connaître aux utilisateurs et acheteurs et pour la situer parmi les huiles essentielles qui sont déjà connues. Ainsi, nous proposons la présentation de la monographie de l'huile essentielle de Ahibero conformément à celle donnée par AFNOR (AFNOR-CD-ROM, 2007),

Définition **: Huile essentielle de la partie aérienne d'Ahibero :** Huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d´eau de la partie aérienne de *Cymbopogon giganteus* Chiov. var. *madagascariensis* (A. Camus), de la famille de Poaceae.

Spécifications

- **Aspect** : Liquide mobile, limpide
- **Couleur** : de jaune pâle à jaune brun
- **Odeur :** caractéristique

Caractères physiques (Rabehaja, 2007)

- **Densité** d_D^{20}

Minimum: 0,940

Maximum: 0,950

- **Indice de réfraction à 20 °C**

Minimum: 1,459 0

Maximum: 1,467 0

- **Pouvoir rotatoire à 20 °C**

Comprise entre +50° et + 51°

- **Miscibilité à l'éthanol à 80% (V/V) à 20 °C**

V/3V : 3 Volume d'éthanol pour obtenir une solution limpide avec 1 volume d 'huile essentielle

Caractères chimiques (Rabehaja, 2007)

- **Indice d'Acide**

Minimum 19,83

- **Indice d'Ester**

Minimum 23,62

Profil chromatographique

L´analyse de l´huile essentielle doit être réalisée par chromatographie en phase gazeuse (conditions opératoires : partie expérimentale). Sur le chromatogramme obtenu, les constituants représentatifs et caractéristiques dont la liste est présentée dans le tableau 9 doivent être identifiés.

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure que la composition chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* de Madagascar est comparable avec celle des espèces africaines décrites dans la littérature. Elle est dominée par les squelettes p-menthadiénols, et du limonène.

Tableau 9 : Composés à identifier dans l'huile essentielle d'Ahibero

Constituants	**Minimum %**	**Maximum %**
limonène	2,0	33,0
trans-p-mentha-2,8-dièn 1-ol	11,2	20,5
cis-p-mentha-2,8-dièn 1-ol	6,3	9,6
trans-p-mentha-1(7),8-dièn 2-ol	11,5	24,6
3,9-oxy-mentha-1,8(10)-diène	1,5	2,7
trans-isopipériténol	2,3	9,4
trans-carvéol	2,5	3,2
cis-carvéol	0,2	7,7
cis-p-mentha-1(7),8-dièn 2-ol	14,4	21,6
carvone	3,4	4,1
ascaridole	tr	0,6

tr : trace > 0,1%

La variété malgache poussant à l'état spontané dans la région sud-ouest de Madagascar présente beaucoup de similitude avec l'espèce poussant en Côte d'Ivoire si l'on se réfère aux cinq constituants majoritaires, le 3,9-oxy-mentha-1,8(10)-diène et l'ascaridole.

CHAPITRE III

Caractérisation chimique des huiles essentielles de *Tana bojeriana* Baker et de *Vepris madagascarica* (Baill.) H.

I. TANA BOJERIANA

I.1. Description botanique

Tana bojeriana (Baker, 1890 ; Van Wyk *et al.*, 1999), qui appartient à la famille Apiaceae, est une plante endémique de Madagascar. Cette herbe, du nom vernaculaire Tsingerahera (Figure 14) a été nommée pour la première fois *Peucedanum bojerianum* Baker en 1890 (Baker, 1890) ; elle peut se rencontrer en petites colonies dans les savanes ou en adventice dans les cultures. Sa taille est 20 à 45 cm. L'entre-nœud étroitement espacé de 1 à 10 mm à la base pour une hauteur de 2 à 3 cm du sol, puis s'allonge progressivement de 1 à 7 cm jusqu'à l'inflorescence. Les feuilles sont alternes, glabres composés, de forme pennatiséquées à segments linéaires. Fleurs hermaphrodites à 5 pétales libres ; 5 étamines à anthère fendue longitudinalement. Pétiole de 2 à 4 cm avec une partie engainante à la moitié inférieure ; l'inflorescence en ombelle d'ombelle dont l'axe primaire long de 5 à 7 cm de long avec 1 mm de diamètre, portant 8 à 12 ombellules à 10 à 12 fleurs ; le pédoncule de 2,5 à 3 cm de long et de 0,3 à 0,5 mm de diamètre ; pédicelle aux environs de 5 à 7 mm de long.



Figure 14 : Photo de *Tana bojeriana* (cliché de l'auteur)

I.2 Composition chimique de l'huile essentielle de Tana bojerana

Pour poursuivre notre investigation en vue de produire de nouvelles huiles essentielles, nous nous sommes intéressés à la composition chimique de l'huile essentielle de *Tana bojeriana,* qui, à notre connaissance, n'a fait l'objet d'aucune étude. Pour cela, nous avons mis en œuvre l'association de la CPG(Ir), le couplage CPG-SM et la RMN-^{13}C ainsi qu'une technique de séparation : la chromatographie sur colonne.

Le matériel végétal a été collecté à Ankilifolo (Toliara) dans la région Sud-Ouest de Madagascar. Les huiles essentielles ont été obtenues à partir de différentes parties aériennes par hydrodistillation à l'échelle laboratoire avec un appareil type Clevenger avec des rendements qui varient de 0,65 à 0,75% (m/m). Un exemplaire a été déposé au département de l'Herbarium de l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA) sous le numéro LAHE 010.

Nous avons réalisé :

✓ l'étude approfondie de la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne, par l'analyse des fractions hydrocarbonées et oxygénées après fractionnement sur colonne de silice;

✓ l'étude de la composition chimique de quatre autres échantillons d'huile essentielle sans fractionnement.

I.2.1 Analyse d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes

L'analyse directe par CPG(Ir) et RMN-^{13}C de l'huile essentielle brute a permis d'identifier neuf composés représentant 86,2% de la composition chimique globale. La composition chimique est caractérisée par une forte teneur en monoterpènes oléfiniques majoritairement représentés par l'α-phellandrène (30,4%) (Figure 15).

Tous les composés identifiés sont présents dans notre bibliothèque de spectres « Terpènes » constituée au laboratoire. Pour l'identification de chaque constituant, nous avons successivement pris en compte les trois paramètres habituels, à savoir :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus : tous les pics des carbones de toutes les molécules identifiées sont repérés à l'exception des carbones quaternaires de quelques composés minoritaires ;
- le nombre de superpositions des raies de résonnance pouvant appartenir à deux ou plusieurs composés. Ce nombre varie entre 1 et 4. Il en résulte que toutes les molécules sont identifiées par l'observation de plus des deux tiers de leurs carbones non superposés avec ceux d'autres molécules ;
- la variation des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) de chacun des carbones de chaque molécule par rapport aux valeurs de référence. Ces variations sont très faibles, inférieures ou égales à 0,05 ppm pour environ 90% des carbones. En ce qui concerne les composés non identifiés, ils ont tous des teneurs inférieures ou égales à 0,5% de la composition chimique de l'huile essentielle totale.

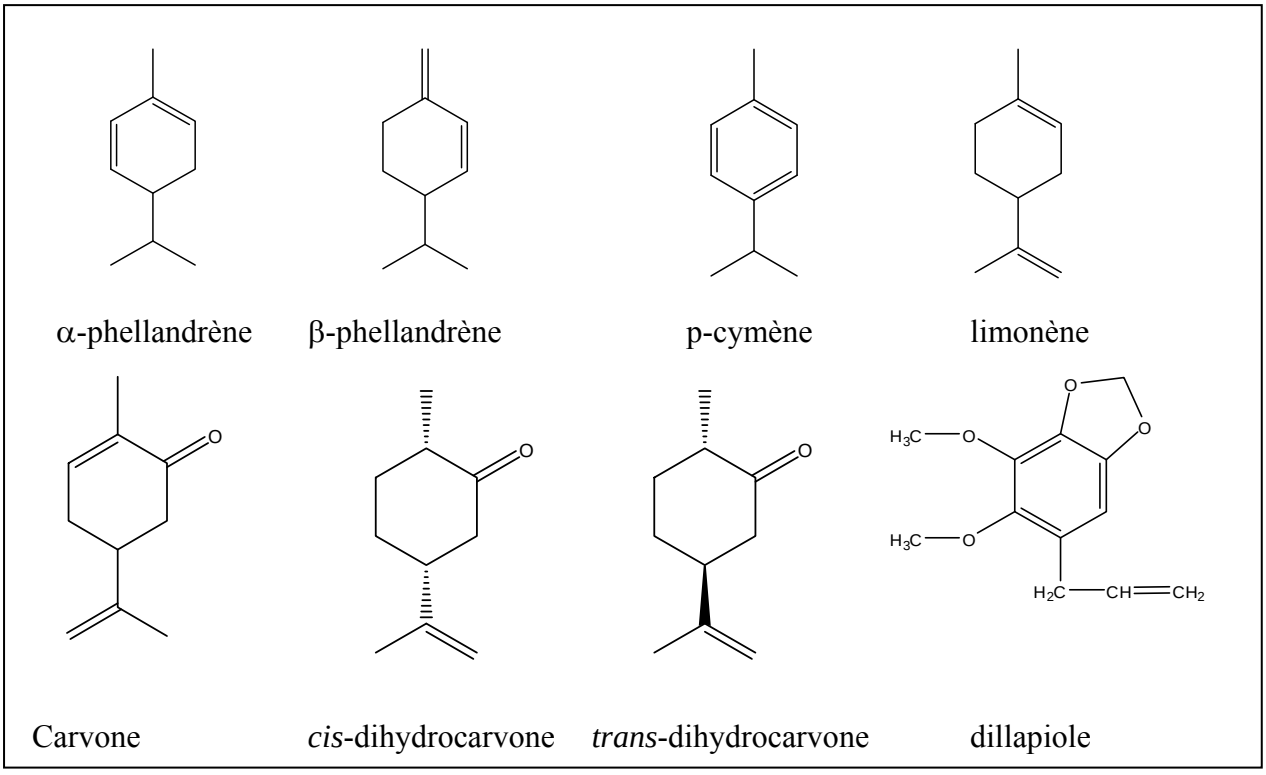


Figure 15 : Structures des composés identifiés par RMN-^{13}C de l'huile essentielle

Une fois identifiés par RMN-^{13}C, les constituants, numérotés suivant leur ordre d'élution sur colonne apolaire, sont aisément repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonne apolaire et polaire ; ce qui permet de les quantifier (Tableau 10).

Tableau 10 : Composés identifiés à partir du spectre RMN-^{13}C de l'huile essentielle de *Tana bojeriana* Baker.

N°	Constituants	Ira	Irp	%a	RMN	SUP
2	α-pinène	927	1024	1,2	9/10	4
7	α-phellandrène	994	1167	30,4	10/10	0
8	p-cymène	1008	1272	4,3	7/7	1
9	Limonène*	1017	1202	12,3	10/10	0
10	β-phellandrène*	1017	1211	5,0	10/10	0
15	*trans*-dihydrocarvone	1166	1605	1,1	8/10	3
16	*cis*-dihydrocarvone	1173	1624	5,8	10/10	0
19	carvone	1211	1730	22,3	10/10	0
21	dillapiole	1584	2350	3,7	12/12	1
	TOTAL			**86,2**		

RMN : nombre de carbones observés dans le spectre de RMN-^{13}C par rapport au nombre de pics attendus. SUP : nombre de superpositions. L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire, sauf pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). ♦ : numérotation associée à chaque constituant faisant référence au Tableau 12.

I.2.2. Fractionnement de l'huile essentielle de *T. bojeriana*

Afin de réaliser une étude détaillée de la composition chimique de cette huile essentielle, nous avons soumis l'échantillon d'huile essentielle précédent de *Tana bojeriana* (513 mg) à un fractionnement sur colonne ouverte de silice de « type flash » : quatre fractions ont été obtenues, deux éluées au pentane contiennent les composés hydrocarbonés (80 mg et 127 mg), et deux autres en utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante, regroupent les composés oxygénés (Figure 16).

L'analyse de la fraction hydrocarbonée (207 mg) conduit à l'identification de 7 constituants supplémentaires par rapport à l'huile essentielle brute (Tableau 11) : l'α-thujène, le camphène, le sabinène, le β-pinène, le myrcène, le γ-terpinène et le terpinolène.

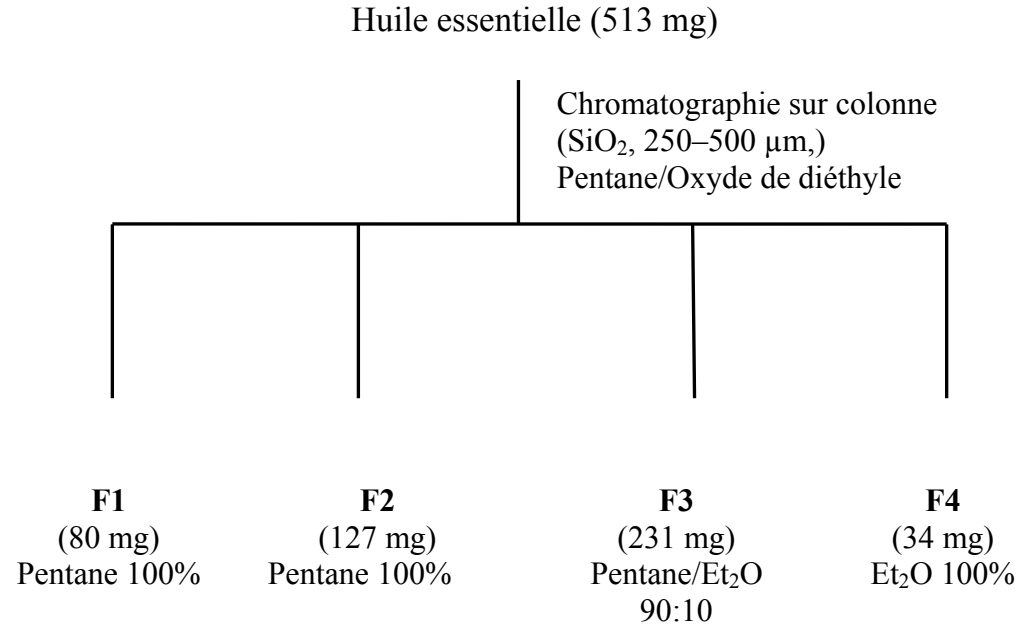


Figure 16 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *Tana bojeriana*

L'analyse de la fraction oxygénée F4 (34 mg) a permis d'identifier trois constituants supplémentaires qui n'avaient pas été identifiés par le couplage CPG-SM. Il s'agit du p-mentha-1(7),2-dièn-6-ol, de l'iso-dihydrocarvéol et du *trans*-p-menth-2-ène-1,6-diol. Les deux premiers ont été identifiés grâce aux données de la banque terpènes. Le *trans-p*-menth-2-ene-1,6-diol (8.8%% dans la fraction F4 et 0,1 % dans l'huile totale), pour lequel les données SM sont absentes dans les banques commerciales ou construites dans les laboratoires à notre disposition a été identifié par rapport à des données de la littérature. En effet, la série de déplacements chimiques observés dans le spectre RMN de la fraction F4 correspondent parfaitement à celles décrites par Ahmed et Mahmoud, en 1997.

Tableau 11 : Composés identifiés du CC à partir des spectres CPG-SM et RMN-^{13}C de l'huile essentielle de *Tana bojeriana* Baker

			HE	F1	F2	F3	F4
	Masse (mg)		513	80	127	231	34
	Pentane/Ether			100/0	100/0	90/10	0/100
	Solvant (ml)			50	100	200	100
Composés	IR						
	Apolaire	Polaire					
α-thujène	919	1022	*0,1*	0,5	0,2		
α-pinène	927	1022	***1,2***	3,7	0,2		
camphène	940	1069	*tr*	0,1			
sabinène	961	1122	*0,1*	0,1	0,2		
β-pinène	966	1112	*0,1*	0,2	0,1		
myrcène	976	1161	*0,5*	0,4	1,3		
α-phellandrène	994	1167	***30,4***	**66,7**	**48,3**		
p-cymène	1008	1272	***4,3***	1,8	**11,1**		
Limonène*	1017	1202	***12,3***				
β-phellandrène*	1017	1211	***5,0***	**24,0**	**36,0**		
γ-terpinène	1044	1245	*0,1*		0,1		
terpinolène	1074	1284	*0,2*	0,1	0,2		
isobornéol	1140	1665	tr				*0,2*
dill éther	1163	1512	***7,7***			**17,8**	*0,5*
trans-dihydrocarvone	1166	1605	***1,1***			**3,1**	*0,4*
cis-dihydrocarvone	1173	1624	***5,8***			**13,1**	*0,7*
p-mentha-1(7),2-dièn-6-ol	1177	1801	0,6				**6,5**
iso-dihydrocarvéol	1193	1777	*0,1*				***3,6***
carvone	1211	1730	***22,3***			**53,8**	
trans-p-menth-2-ène-1,6-diol	1284	2183	0,1				**8,8**
dill apiole	1584	2350	***3,7***		0,1	**9,5**	*0,9*
TOTAL			**95,7**	**97,6**	**97,7**	**97,2**	**21,5**

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1), excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque* (colonne polaire BP-20). Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire et polaire. Les pourcentages en gras sont ceux des composés identifiés par RMN-^{13}C et ceux en italique par CPG-SM.

I.2.3. Bilan de l'analyse détaillée

Au terme de notre étude sur l'huile essentielle de *Tana bojeriana* Baker réalisée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN-^{13}C, nous avons mis en évidence 21 composés représentant 95,7% de la composition chimique de l'huile essentielle (Tableau 12). Parmi ces constituants, neuf ont été identifiés directement par interrogation de la

bibliothèque « Terpènes », deux à partir de la bibliothèque « Littérature » et dix par CPG-SM.

Tableau 12 : Bilan de l'analyse d'huile essentielle aérienne de *Tana bojeriana*

N°	Constituants	Ira	Irp	%a	Identification
1	α-thujène	919	1022	0,1	Ir, SM
2	α-pinène	927	1022	1,2	Ir, SM, RMN-^{13}C
3	camphène	940	1069	tr	Ir, SM
4	sabinène	961	1122	0,1	Ir, SM
5	β-pinène	966	1112	0,1	Ir, SM
6	myrcène	976	1161	0,5	Ir, SM
7	α-phellandrène	994	1167	30,4	Ir, SM, RMN-^{13}C
8	p-cymène	1008	1272	4,3	Ir, SM, RMN-^{13}C
9	Limonène*	1017	1202	12,3	Ir, SM, RMN-^{13}C
10	β-phellandrène*	1017	1211	5,0	Ir, SM, RMN-^{13}C
11	γ-terpinène	1044	1245	0,1	Ir, SM
12	terpinolène	1074	1284	0,2	Ir, SM
13	iso-bornéol	1140	1665	tr	Ir, SM
14	dill éther	1163	1512	7,7	Ir, SM, RMN-^{13}C
15	*trans*-dihydrocarvone	1166	1605	1,1	Ir, SM, RMN-^{13}C
16	*cis*-dihydrocarvone	1173	1624	5,8	Ir, SM, RMN-^{13}C
17	p-mentha-1(7),2-dièn-6-ol	1177	1801	0,6	Ir, RMN-^{13}C
18	iso-dihydrocarvéol	1193	1777	0,1	Ir, , RMN-^{13}C
19	carvone	1211	1730	22,3	Ir, SM, RMN-^{13}C
20	*trans*-p-menth-2-ène-1,6-diol	1284	2183	0,1	Ir, SM
21	dill apiole	1584	2350	3,7	Ir, SM, RMN-^{13}C
	Total :			95,7	

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1), excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque* (colonne polaire BP-20). Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP-20).

L'huile essentielle de *Tana bojeriana* Baker est caractérisée par la présence majoritaire de l'α-phellandrène (30,4%), de la carvone (22,3%), du limonène 13,3%) et du dill éther (7,7%). D'autres composés présentent une teneur supérieure à 1%. Il s'agit de :

- trois monoterpènes oléfiniques : l'α-pinène (1,2%), le p-cymène (4,3%) et le β-phellandrène (5,0%),

- deux cétones monoterpéniques: la *trans*-dihydrocarvone (1,1%) et la *cis*-dihydrocarvone (5,8%),
- un phenylpropanoïde : dillapiole (3,7%).

En comparant avec les études déjà décrites dans la littérature pour des HE de la famille des Apiaceae, la composition chimique de cette huile essentielle de *Tana bojeriana* Baker, endémique de Madagascar, se rapproche de celles décrites dans les « Dill oil ou l'Aneth» (*Anethum graveolens* L.) (Góra *et al*., 2002). On note l'abondance en α- et β-phellandrène, limonène, carvone et aussi la présence des dill éther et dill apiole. Par contre, la présence du *trans*-p-menth-2-ène-1,6-diol et du p-mentha-1(7),2-dièn-6-ol, confère une certaine originalité à l'huile essentielle de *Tana bojeriana*.

Ainsi, l'huile essentielle des fleurs d'*Anethum graveolens* L. de Roumanie (Rãdulescu *et al.*, 2010) contient essentiellement l'α-phellandrène (30,26%), le limonène (33,22%), le dill éther (22,00%) et la carvone (10,29%). Amin et Sleem (2007) ont décrit les constituants d'*Anethum graveolens L.* de l'Egypte. La composition chimique est dominée par l'α-phellandrène (63,0%), le β-phellandrène (7,13%) et le dill éther (6,20%). Par contre, la carvone est absente, mais on détecte la présence de dill apiole mais avec une faible teneur.

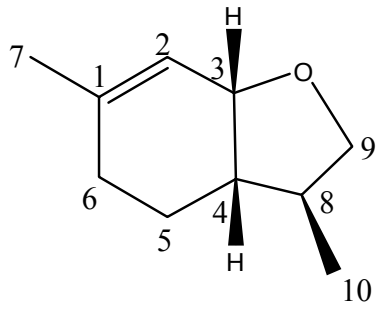
I.3. Identification des constituants à partir des données de la littérature

I.3.1. Identification du dill Ether

L'analyse du spectre de RMN-^{13}C de l'huile essentielle brute, a permis de repérer 10 raies de résonance appartenant à un constituant absent de la bibliothèque de spectre « terpènes ». L'interrogation de la bibliothèque de spectres « Littérature » avec les données spectrales, nous suggère la structure du dill éther (Figure 17). Nos valeurs de déplacements chimiques sont en accord avec celles publiées dans la littérature (Serra et Fuganti, 2004). Ce composé est également identifié par SM, et il a déjà été décrit dans

les huiles essentielles appartenant à la famille d'Apiaceae : *Anethum graveolens* L. var. *corso* de Pologne (Góra *et al.*, 2002), *Anethum graveolens* L. de Cuba, de l'île de La Réunion, de l'Egypte, des Etats Unis et de la Roumanie (Apiaceae) (Pino *et al.,* 1995a ; Vera et Chane-Ming, 1998 ; Amin et Sleem, 2007 ; Callan *et al.,* 2007 ; Rãdulescu *et al.*, 2010).

D'après la littérature, l'odeur de l'huile essentielle de feuilles et de tiges d'Aneth (*Anethum graveolens* L.) avant la formation des fruits est due à la présence du phellandrène et du dill éther (Pino *et al.,* 1995b). Ainsi, l'odeur du phellandrène était décrite comme « l'Aneth ou Dill », parfumée et fraîche tandis que l'odeur de la carvone, caractéristique de l'huile essentielle de graines, a été définie comme « carvi », rafraichissante ; enfin, celle du dill éther défini comme « l'Aneth ou Dill », florale et parfumée.



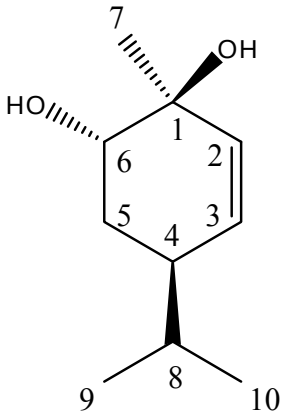
C	δ (ppm) Serra *et al.*, 2004	δ (ppm) **14**
1	138,80	138,94
2	121,10	120,93
3	75,10	75,09
4	44,00	43,90
5	24,20	24,11
6	28,20	28,19
7	23,70	23,80
8	37,80	37,94
9	74,10	74,03
10	17,70	17,70

Figure 17 : Structure et déplacements chimiques du dill éther **14** (tableau 12) décrits dans la littérature (Serra *et al.,* 2004) et observés dans la fraction F4 (8.8%).

I.3.2. Identification du *trans*-p-menth-2-ène-1,6-diol

Dans la fraction F4, un composé a été concentré à 8,8% selon les valeurs de la CPG(Ir). Les indices de rétention sur colonnes, apolaire et polaire sont respectivement 1284 et 2183, correspondant à un composé inconnu, qui est aussi absent des

bibliothèques de spectres de masse. L'analyse des données spectrales de RMN-^{13}C nous orientent vers un diol avec un squelette menthanique. Les recherches bibliographiques nous orientent vers le *trans*-*p*-menth-2-ène-1,6-diol. Les valeurs de déplacements chimiques de RMN-^{13}C observées dans la fraction F4 (Tableau 11) sont en accord avec celles décrites par Ahmed et Mahmoud en 1997 (Figure 18).



C	δ (ppm) Ahmed et Mahmoud	δ (ppm) **20**
2	132,10	132,24
3	132,00	131,92
6	73,50	73,49
1	71,20	70,94
4	38,60	38,41
8	32,00	31,93
5	28,80	28,74
7	23,50	23,65
10	20,00*	19,95*
9	19,90*	19,81*

* : *valeurs interchangeables*.

Figure 18 : Structure et déplacements chimiques du *trans*-p-menth-2-ène-1,6-diol **20** décrits dans la littérature (Ahmed et Mahmoud, 1997) et observés dans la fraction F4

I.4. Etude comparative de la composition chimique des HE des différentes parties de la plante

L'étude comparative à différents stades de développement de la plante a été effectuée durant trois années successives : 2008 à 2010. Des parties aériennes (feuilles et tiges) ont été collectées avant la floraison N°1 et N°2 (mars 2008 et mars 2009) et pendant la pleine floraison N°3 et N°4 (novembre 2009 et août 2010) ; des boutons floraux ont été collectés aussi en août 2010 N°5 (Tableau 13). Cependant les conditions climatiques ont été assez exceptionnelles durant l'année 2010 avec de très faibles précipitations qui ont totalement perturbé le stage végétatif. Ainsi toute récolte s'est avérée impossible au mois de mars 2010.

Nous notons une nette stabilité du rendement qui n'est pas influencée par le stade végétatif. Nous observons aussi une grande stabilité des teneurs des quatre composés majoritaires : α-phellandrène, limonène, dill éther et carvone**.** L'échantillon de 2010 se singularise avec une teneur plus élevée de l'α-phellandrène qui atteint (50,0%) et en dill éther (17,8%), associée à une diminution considérable de la teneur en carvone (1,7%). Une des explications de ces variations est sans doute liée la faiblesse des précipitations en 2010.

Tableau 13 : Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles de différentes parties de la plante en fonction l'état végétatif.

Date de récolte			03/2008	03/2009	11/2009	08/2010	08/2010
Lots			N°1	N°2	N°3	N°4	N°5
Rendement (%)			0,65	0,7	0,75	0,73	0,75
Constituants	Ira	Irp	AF	AF	PF	PF	BF
α-thujène	919	1022	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
α-pinène	927	1022	1,3	1,2	1,2	1,2	1,1
camphène	940	1069	-	tr	tr	tr	tr
sabinène	961	1122	tr	0,1	0,1	0,1	0,2
β-pinène	966	1112	0,1	0,1	0,1	0,1	tr
myrcène	976	1161	0,6	0,6	0,5	0,7	0,6
α-phellandrène	994	1167	28,3	39,2	30,5	50,0	31,5
p-cymène	1008	1272	6,1	2,1	4,3	3,6	2,9
Limonène*	1017	1202	19,7	17,7	12,3	10,5	23,1
β-phellandrène*	1017	1211	5,5	5,1	5,0	7,0	4,5
γ-terpinène	1044	1245	0,4	0,4	tr	tr	tr
terpinolène	1074	1284	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
isobornéol	1140	1665	-	-	tr	tr	tr
dill éther	1163	1512	10,6	9,9	7,7	17,8	16,2
trans-dihydrocarvone	1166	1605	1,4	1,3	1,1	0,4	0,7

cis-dihydrocarvone	1173	1624	1,3	-	5,8	0,7	1,8
p-mentha-1(7),2-dien-6-ol	1177	1801	-	-	0,6	0,1	0,9
iso-dihydrocarvéol	1193	1777	-	-	0,1	0,1	tr
carvone	1211	1730	18,0	15,9	22,8	1,7	7,9
p-menth-2-ène-1,6-diol	1284	2183	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1
dill apiole	1584	2350	4,5	4,5	3,7	2,1	5,3
TOTAL :			**98,4**	**98,7**	**96,3**	**96,7**	**97,0**

AF : Avant Floraison ; PF : Pleine Floraison ; BF : Boutons Floraux

L'échantillon de boutons floraux ne présente pas une composition très différente mais le taux de carvone est assez bas (7,9%). Une étude effectuée sur *Anethum graveolens* (Apiaceae) par Porter *et al.* (1983), a montré que ce composé présente une teneur très importante de même que l'α-phellandrène et le limonène dans les feuilles et les tiges plutôt que dans les boutons floraux. Nous notons aussi l'absence de trois composés: isobornéol, p-mentha-1(7),2-dièn-6-ol et iso-dihydrocarvéol durant la période d'avant floraison. Compte tenu des rendements un peu plus élevés pendant la période de pleine floraison, il serait souhaitable de réaliser l'obtention de l'huile essentielle durant cette période.

Au terme de notre étude sur les caractéristiques des huiles essentielles de *Tana bojeriana* Baker, nous pouvons conclure que cette plante aromatique possède de nombreux constituants communs aux autres plantes appartenant à la famille des Apiaceae notamment *Anethum graveolens* L. et *Anethum graveolens* L. var. *corso*. Elle pourrait donc constituer une alternative à ces deux huiles essentielles qui sont bien implantées sur le marché des plantes aromatiques et médicinales.

II. *VEPRIS MADAGASCARICA* H.

II.1. Description botanique

II.1.1 Le Genre *Vepris* Comm. Ex A. Juss (Humbert, 1950)

Le genre *Vepris* Comm. contient environ 80 espèces d'arbustes et arbres dont 23 espèces endémiques de Madagascar (Humbert, 1950), poussant principalement dans les climats tropicaux d'Afrique, les îles Comores et Mascareignes et peut s'étendre en Arabie et Sud-Est de l'Inde (Matu, 2011). Les Vepris sont des arbres ou arbustes inermes (Chaturvedula *et al.*, 2003) ; ses feuilles sont alternes ou rarement subopposées, composées unifoliées ou composées-palmées à 3-9 folioles.

Vepris madagascarica (Baill.) H. Perrier, endémique de Madagascar, se trouve dans la forêt de formation bioclimatique semi-humide ou sèche de 0 à 500 m d'altitude. Il est connu localement sous les noms de Lamposenty ala, d'Anzéty, Voatolongoala, Tolongoala manitra anisette (Figure 19). Il faut noter que cette plante comporte trois synonymes : *Humblotiodendron madagascaricum* (Baill.) H. St. John, *Pelea madagascarica* Baill. et *Pelea madagascarica* var. *tolongoala* (Hedberg *et al.*, 1983 ; Matu, 2011). Son aire d'implantation est très limitée puisqu'il n'est répertorié que dans 2 à 5 localités, uniquement dans la région Nord-Est de Madagascar (ex. Province d'Antsiranana).



Figure 19 : *Vepris madagascarica* (Schatz & Gentry 1991)

II.2. Etude bibliographique

II.2.1. Utilisations

L'huile essentielle de *Vepris madagascarica* (Baillon) H. Perr. a été vendue en Extrême-Orient, Japon et Chine pour la préparation des eaux dentifrices (Billet et Favre-Bonvin, 1973). Les espèces du genre *Vepris* sont utilisées traditionnellement pour traiter des diverses maladies incluant le traitement des maux de l'estomac et les coliques (Kan-Fan *et al.*, 1970), la pneumonie, les maladies pulmonaires et les troubles rénaux (Hedberg et *al.*, 1983). Elles sont aussi utilisées contre les troubles des yeux, les douleurs cardiaques, la toux, le rhume et la grippe (Chhabra et *al*., 1991 ; Gurib-Fakim et *al*., 1993), les maux de tête (Arnold et Gulumian, 1984), la ménorragie et l'infertilité (Steenkamp, 2003) , et comme aphrodisiaque (Poitou *et al.,* 1995), diurétique et antipyrétique (Gomes et *al*., 1994) , astringent et fortifiant (Vera et *al*., 1990), tonique pour angine rhumatisme (Gurib-Fakim *et al*., 1993), la malaria par voie orale et usage externe (Gessler *et al*., 1994, 1995 ; Cheplogoi *et al*., 2008).

II.2.2. Travaux antérieurs

A notre connaissance, une étude relative à la composition chimique d'un extrait de *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Perr. a été décrite dans la littérature. (Billet *et al.*, 1973). Les parties aériennes (feuilles et tiges séchées), broyées sont extraites par l'éther de pétrole, puis par $CHCl_3$; l'extrait chloroformique concentré est soumis à un entrainement à la vapeur d'eau, ce qui permet la séparation d'une huile odorante. La technique de couplage CPG-SM a été utilisée mais seuls cinq composés ont pu être identifiés : l'α-pinène, le p-cymène, l'eugénol, le méthyleugénol et l'estragole. D'autre part, l'huile essentielle de fruits est constituée essentiellement d'estragole (30,0%), de (*Z)*-anéthole (31,0%) et de (*E)*-anéthole (33,0%) (Matu, 2011).

II.2.3 Les huiles essentielles du genre *Vepris* de Madagascar

Nous citons ici les compositions chimiques d'huiles essentielles issues des Vepris endémiques de Madagascar. L'huile essentielle obtenue par entrainement à la vapeur d'eau de feuilles de *Vepris elliotii* H. Perr. est constituée essentiellement de terpinolène (49,7%), de (*E)*-anéthole (23,5%) et de limonène (6,2%) (Bouchet *et al.*, 1989 ; Poitou *et al.*, 1995). Les principaux constituants de l'huile essentielle de feuilles de *Vepris nitida* Verdoorn sont l'estragole (58,5%) et le (*E)*-anéthole (30,0%) (Rakotondraibe, 1998). Le citronellol (33,6%), le géranial (27,0%) et le néral (19,7%) sont les constituants majoritaires de l'huile de feuilles de *Vepris leandriana* H. Perr. (Rakotondraibe *et al.* 2001).

II.3. L'huile essentielle de feuilles de Vepris madagascarica

Un échantillon collecté en mars 2010 près de Vohémar a été identifié par Mr Benja Rakotonirina (Département Herbarium, IMRA). Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation et entraînement à la vapeur d'eau (cf. détail partie expérimentale) de feuilles de *Vepris madagascarica* (Baillon.) H. Perr. Le rendement calculé en fonction de la masse de feuilles séchées varie de 0,8 à 1,2 % (masse/masse).

II.3.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle de *Vepris madagascarica*

L'analyse directe par RMN-^{13}C et CPG(Ir) de l'huile essentielle a permis d'identifier six composés représentant 96,6% de la composition chimique globale. La composition chimique de l'huile essentielle est caractérisée par une forte teneur de (*E)*-anéthole (78,2%) (Tableau 14). Ce composé est responsable de l'odeur aromatique des plantes anisées (Le Bourhis, 1973 ; Carteau, 2006).

Tableau 14 : Composés identifiés à partir du spectre RMN-^{13}C de l'huile essentielle de *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Pierr.

N°♦	Constituants	Ira	Irp	%a	RMN	SUP
1	α-pinène	927	1023	1,2	8 / 10	0
9	(Z)-β-ocimène	1021	1232	0,8	10 / 10	2
11	estragole	1171	1669	15,6	10 / 10	1
14	(*E)*-anéthole	1260	1827	78,2	8 / 8	1
18	méthyleugenol	1364	2006	0,4	8 / 11	2
19	*(E)*-méthyl isoeugénol	1364	2006	0,4	9 / 11	2
	TOTAL			96,6		

RMN : nombre de carbones observés dans le spectre de RMN-^{13}C par rapport au nombre de pics attendus. SUP : nombre de superpositions. L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ir ^{a} et Ir^{p} : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^{a} : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, ♦ : numérotation associée à chaque constituant faisant référence au Tableau 15.

II.3.2. Fractionnement de l'huile essentielle de *Vepris madagascarica*

Nous avons soumis 2 g d'huile essentielle (HE) à un fractionnement sur colonne ouverte de gel de silice de type « flash » (200-500 µm). Deux fractions (F1 et F2) sont obtenues (Figure 20). Ces deux fractions ont été analysées par combinaison de la CPG(Ir), CPG-SM et RMN-^{13}C. Vingt et un composés qui représentent 98,5% de la composition globale ont été identifiés (Tableau 15). Seize nouveaux composés (Figure 21) n'avaient pas été décrits dans l'étude antérieure effectuée par Billet et Favre-Bonvin (1973) camphène, sabinène, β-pinène, myrcène, limonène, β-phellandrène et *cis* et *trans*-β-ocimène, linalol, (*Z)* et (*E)*-anéthole, *trans*-époxyde anéthole, (*E*)-méthyl isoeugénol, élémicine, p-anisaldéhyde et acétate de géranyle.

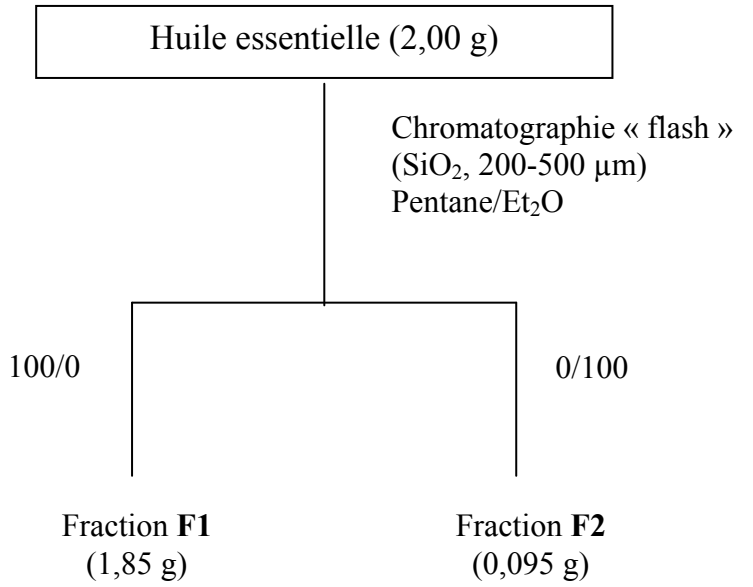


Figure 20 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de feuilles de *Vepris madagascarica*.

Des études bibliographiques ont montré l'existence des huiles essentielles de feuilles de deux plantes aromatiques, qui sont riches en *(E)*-anéthole (70 à 90%), à savoir *Clausena anisata* Hook. (Meijer, 1947) et *Clausena anisum-olens* (Blanco) Merr. var. *anisum-olens* (Molino *et al.*, 1993). Aussi, dans l'huile essentielle de fruits de *Fœniculum vulgare* var. *dulce*, des auteurs ont identifié le *(E)*-anéthole à des teneurs variant de 64 à 71% (Akgül et Bayrak, 1988). De même, l'HE des parties aériennes de *Pimpinella anisetum* Boiss. et Ball. contient 82,8% de *(E)*-anéthole (Tepe *et al.*, 2006). Des teneurs encore plus importantes ont été décrites dans l'huile essentielle d'*Heracleum persicum* d'Iran (82,6%) et de *Croton zehntneri* du Brésil (85,7%).

Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Pierr.

N°♦	Composés	Ira	Irp	% HE	HE, Fractions	identification
1	α-pinène	927	1023	1,2	HE, F1	Ir, SM, RMN-^{13}C
2	camphène	940	1068	tr	HE	Ir, SM
3	sabinène	961	1122	tr	HE	Ir, SM
4	β-pinène	966	1111	0,1	HE	Ir, SM
5	myrcène	976	1160	0,1	HE	Ir, SM
6	p-cymène	1007	1270	tr	HE	Ir, SM
7	Limonène*	1017	1201	0,1	HE	Ir, SM
8	β-phellandrène*	1017	1210	0,1	HE	Ir, SM
9	(*Z*)-β-ocimène	1021	1232	0,8	HE, F1	Ir, SM, RMN-^{13}C
10	(*E*)-β-ocimène	1032	1249	0,3	HE	Ir, SM, RMN-^{13}C
11	linalol	1078	1541	0,2	HE	Ir, SM
12	estragole	1171	1669	15,6	HE, F1, F2	Ir, SM, RMN-^{13}C
13	p-anisaldehyde	1208	2018	0,2	F2	Ir, SM
14	*(Z)*-anéthole	1222	1754	0,5	HE, F1, F2	SM
15	*(E)*-anéthole	1260	1827	78,2	HE, F1, F2	Ir, SM, RMN-^{13}C
16	eugénol	1337	2174	0,1	F2	Ir, SM
17	*trans*-époxyde anéthole	1340	2147	0,1	HE	SM
18	acétate de géranyle	1354	1752	0,1	F2	Ir, SM
19	méthyleugenol	1364	2006	0,4	HE, F2	Ir, SM, RMN-^{13}C
20	(*E*)-méthyl-isoeugénol	1455	2174	0,4	HE, F2	Ir, SM, RMN-^{13}C
21	élémicine	1511	2219	tr	F2	Ir, SM
	TOTAL			98,5		

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire).

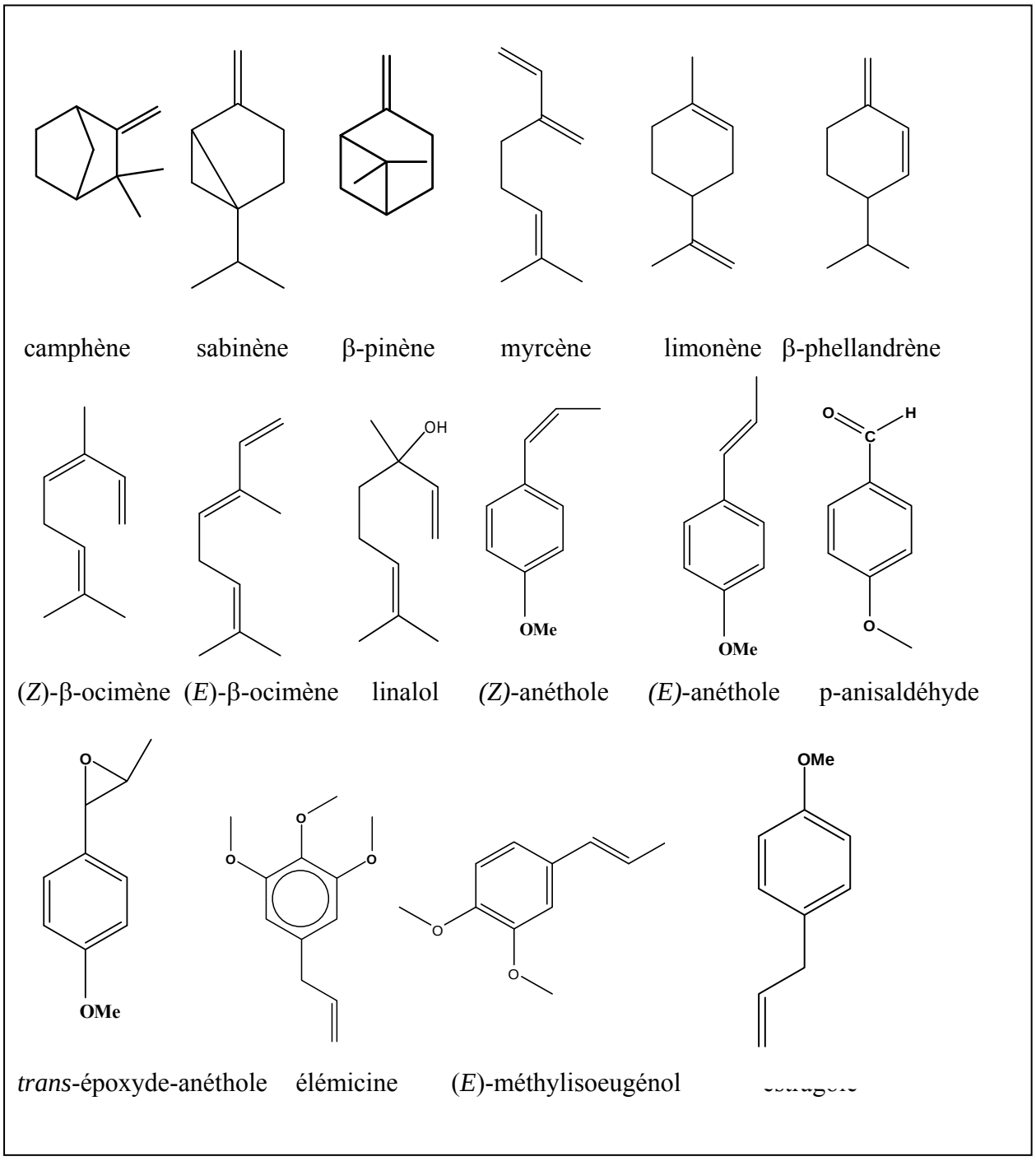


Figure 21 : Structures de constituants identifiés dans l'huile essentielle de *Vepris madagascarica*

II.4. Etude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles (2008, 2009 et 2010) et d'écorces de tronc

L'objectif de cette étude est de comparer d'une part les compositions chimiques i) des huiles essentielles de feuilles fraîches (A) et séchées (B) obtenues à l'échelle laboratoire par hydrodistillation, ii) les huiles essentielles de feuilles fraîches obtenues par entraînement à la vapeur d'eau (C), iii) de l'huile essentielle des écorces de tronc (Tableau 16). Le rendement calculé en fonction de la masse des écorces séchées est de 1,5 % (masse/masse).

D'une manière générale, nous avons constaté qu'il n'y a pas de différence entre la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles fraîches (A) obtenue par hydrodistillation à l'échelle laboratoire et celle distillées par l'entraînement la vapeur d'eau (C). Si l'on compare l'huile essentielle de feuilles fraîches (A) avec celle obtenue avec les feuilles séchées (B), nous observons une légère baisse du taux de *(E)*-anéthole dans l'huile essentielle des feuilles séchées (69,5%) et une augmentation de l'estragole (25,9%).

La composition chimique de l'HE d'écorces de tronc diffère peu de celles des feuilles fraîches, mais nous notons cependant que celle-ci est légèrement plus riche en *(E)*-anéthole (84,6%). De plus, nous identifions trois composés supplémentaires dans l'huile essentielle d'écorces de tronc : *trans*-α-bergamotène : (0,8 %), γ-cadinène (1,0 %) et 1,10-di-épicubénol (1,0 %). Compte tenu de la répartition restreinte de cette plante aromatique et la nécessité d'une gestion raisonnée de cette espèce, l'huile essentielle d'écorces du tronc ne présente que peu d'intérêt. Son exploitation potentielle se limiterait aux huiles essentielles de feuilles (fraiches ou séchées) obtenues sur site avec des systèmes utilisant l'entrainement à la vapeur (alambics). Ainsi, il serait possible d'associer les habitants dans l'exploitation de cette huile essentielle à la fois d'un point de vue économique mais aussi pour la préservation de la biodiversité.

Tableau 16 : Etude comparative de la composition chimique de trois huiles essentielles de feuilles obtenues par entrainement à la vapeur et hydrodistillation

Composés	Ira	Irp	%a A 2010	%a B 2008	%a C 2010	**%** Ecorces 2009
α-pinène	927	1023	1,2	0,5	1,1	tr
camphène	940	1068	tr	-	tr	-
sabinène	961	1122	tr	tr	tr	-
β-pinène	966	1111	0,1	tr	0,1	-
myrcène	976	1160	0,1	-	0,1	-
p-cymène	1007	1270	tr	-	tr	-
limonène*	1017	1201	0,1	0,1	0,1	-
β-phellandrène*	1017	1210	0,1	-	0,1	-
(*Z*)-β-ocimène	1021	1232	0,8	0,5	0,7	tr
(*E*)-β-ocimène	1032	1249	0,3	0,1	0,3	-
linalol	1078	1541	0,2	0,3	0,2	0,2
estragole	1171	1669	**15,6**	**25,9**	**15,4**	**7,5**
p-anisaldehyde	1208	2018	0,2	1,1	0,2	1,0
(Z)-anéthole	1222	1754	0,5	0,5	0,5	0,2
(E)-anéthole	1260	1827	**78,2**	**69,5**	**78,6**	**84,6**
eugénol	1337	2174	0,1	tr	tr	0,1
trans-epoxyde d'anéthole	1340	2147	0,1	0,1	tr	0,3
acétate de géranyle	1354	1752	0,1	tr	0,1	0,1
méthyleugenol	1364	2006	0,4	0,5	0,4	1,2
trans-α-bergamotene	1430	1584				0,8
(*E*)-méthyl isoeugénol	1455	2174	0,3	0,2	0,3	0,7
γ–cadinène	1503	1758				1,0
élémicine	1511	2219	0,0	0,1	0,1	0,2
1,10-diepicubenol						1,0
Total :	**98,2**	**99,4**	**98,3**	**98,9**		98,9

A : Feuilles fraîches (laboratoire, hydrodistillation) ; B : Feuilles séchées (laboratoire, hydrodistillation). C : Feuilles fraîches distillées à l'échelle semi-industrielle (Alambic, entraînement à la vapeur d'eau).

L'identification des constituants des huiles essentielles de *Tana bojeriana* Baker et *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Perrier, réalisée par RMN-^{13}C, CPG-SM et par CPG(Ir), a montré que la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles *Tana bojeriana* est caractérisée par l'association de quatre composés : α-phellandrène, limonène, carvone, dill éther. L'huile essentielle de feuilles de *Vepris madagascarica* est caractérisée par une très forte teneur en *(E)*-anéthole atteignant 78,6% pour l'échantillon de feuilles fraiches distillées par entrainement à la vapeur. Cette huile essentielle pourrait constituer une source pour ce composé très utilisé en agro-alimentaire.

CHAPITRE IV

Caractérisation chimique de deux espèces de *Croton*, *Croton kimosorum* Leandri et *Croton* sp.

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Description botanique

Le genre *Croton* L., qui appartient à la Famille d'Euphorbiaceae, constitue l'un des plus grands genres de plantes à fleurs, avec près de 1300 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres. Ces espèces sont écologiquement importantes et constituent souvent des éléments importants de végétation secondaire dans les régions tropicales et subtropicales dans le monde (Webster, 1993). A Madagascar, même si la flore de la Famille d'Euphorbiaceae n'est pas encore totalement établie, le genre *Croton* qui regroupe 200 espèces dont 150 espèces endémiques contribue fortement à la biodiversité (Radcliff-Smith, 1988, 2001).

Les deux échantillons de Croton étudiés sont des arbustes rencontrés dans les fourrés semi-arides dans la région sud-ouest de Madagascar. Ils ont été déposés au département botanique à l'IMRA. Mr. Benja Rakotonirina, botaniste a pu identifier la première espèce *Croton kimosorum* et a procédé à la description botanique de la deuxième espèce qui demeure encore inconnue à ce jour

I.1.1 *Croton kimosorum* Leandri ou Zanapoly (Napoly)

Cette espèce appartient à la section *Boinensis* qui contient deux espèces : *Croton boinensis* et *Croton kimosorum.* Cette dernière est un arbuste d'environ 100 à 120 cm de hauteur qui pousse spontanément dans le fourré sub-aride sur le sol pauvre ou rocher, formant une touffe plus ou moins sphérique d'environ 50 à 100 cm de haut. Ses feuilles sont petites (limbe de 1-2 cm ; pétiole de 3-4 mm) ; une seule glande supérieure à la base du limbe, possède deux glandes pétiolaires latérales (Leandri, 1939). Nous avons pu observer sur notre herbier des boutons floraux de 5 à 9 par inflorescence de grappe terminale.

I.1.2 *Croton* sp.

La deuxième espèce appelée localement Andriambolamena ou Riamena est un arbrisseau d'environ 100 à 150 cm de hauteur, souvent rencontré en association avec *C. kimosorum,* sur des sols pauvres, formant une touffe plus ou moins sphérique d'environ 40 à 100 cm de haut. Les rameaux de section arrondie sont de couleur gris-clair avec un entre-nœud de 2,5 à 3 cm tandis que les ramilles distiques présentent un axe principal rapidement défeuillé. Les jeunes ramifications et les axes portent 1 à 2 feuilles épanouies et 2 à 3 en état de jeunesse se collant en pli. Sur ces jeunes ramilles, les pétioles et les feuilles sont couvertes d'écailles circulaires à bord étoilé. Les feuilles pétiolées présentent un pétiole long de 3 à 6 mm, muni de deux formes d'écailles : les unes plus denses, de couleur blanc-argentée et de diamètre 0,3mm ; les autres moins nombreuses, de plus petite taille et de couleur marron-roux au milieu (diamètre 0,2mm). Les deux types d'écaille ont une bordure découpée-étoilée. Deux glandes à la base du limbe foliaire de forme ovoïde (de 7 mm x 10 mm à 13 mm x 15mm). La face inférieure de couleur argentée densément couverte d'écailles superposées : les externes au cercle central plus élargi et les internes devenant plus petites, rapprochant l'aspect des poils stellés. A la face inférieure du limbe vert pale se trouvent des poils stellés épars.



Figure 22 : Photo de *Croton kimosorum* Zanapoly (cliché de l'auteur)



Figure 23 : Photo de *Croton* sp. (Andriambolamena) (cliché de l'auteur)

I.2. Propriétés et utilisations

I.2.1 Propriétés naturelles et utilisations

Le genre *Croton* est caractérisé par la production d'un latex clair à rougeâtre ou jaune, qui est riche en métabolites secondaires tels que des alcaloïdes et des terpénoïdes. Les huiles essentielles et les sèves de couleur de sang appelées « Sang du Dragon » de plusieurs espèces sont utilisées par les guérisseurs dans divers pays (Radcliff-Smith, 1988) et plusieurs utilisations dans la médicine traditionnelle sont décrites:

- des décoctions (ou infusions) des différentes parties de la plante de plusieurs espèces du genre *Croton* comme *C. lechleri*, *C. palanostigma*, *C draconoides* et *C. urucurana* sont des remèdes traditionnels bien connus pour leurs vertus curatives et largement utilisées par les autochtones du fleuve Amazone pour le traitement des plaies infectées (Simionatto *et al.*, 2007);
- les feuilles et l'écorce de tige de *C. cajura* Benth, plante populaire au Brésil et dans la région d'Amazonie, sont utilisées sous forme de thé ou pilés pour traiter le diabète, le taux élevé du cholestérol dans le sang et les troubles gastro-intestinaux (Campos *et al.*, 2002) ;
- au Venezuela et au Nord de la Colombie, l'infusion de l'écorce de *C. malambo* Karst. a été utilisée pour traiter le diabète, la diarrhée, le rhumatisme, l'ulcère gastrique et en tant qu'anti-inflammatoire et analgésiques (Suárez *et al.*, 2004);
- *C. zambesicus* Müll. Arg., originaire des régions tropicales de l'ouest et de Centrafrique, est utilisée pour traiter la fièvre, la dysenterie et les convulsions (Ngadjui *et al.*, 2002). Au Bénin, la décoction des feuilles, est connue comme anti-hypertensive, antimicrobienne et utilisée aussi pour traiter le paludisme lié à la fièvre (Block *et al.*, 2002 ; Block *et al.*, 2004) ;
- en médicine traditionnelle chinoise, *C. tiglium* L. est utilisée comme plante laxative (Tsai *et al.*, 2004) ;

- les feuilles séchées de *C. tonkinensis* Gagnep. sont décrites pour traiter les maux d'estomac et ont été utilisées dans la médecine traditionnelle vietnamienne pour traiter les brûlures, abcès, la dermatose, la dyspepsie et les problèmes gastriques duodénaux (Giang *et al.*, 2003) ;
- à Madagascar, les feuilles de *C. kimosorum* Leandri constituent un remède important contre la toux et un antispasmodique (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2008).

I.2.2 Extraits et huiles essentielles du genre *Croton*

Les extraits au solvant de plusieurs des espèces du genre *Croton* ont fait l'objet d'un nombre très important de travaux et nous ne décrivons ici que quelques exemples dans lesquels des composés ont été isolés :

- des diterpènes dans les espèces de *C. cajucara* (Maciel *et al.*, 1998), *C. zambezicus* (Ngadjui *et al.*, 1999), *C. oblongifolius* (Roengsumran *et al.*, 1999) et *C. stipuliformis* (Franco *et al.*, 2011) ;

- des triterpénoïdes pentacycliques et stéroïdes dans *C. draco* (Hernandez et Delgado, 1992), *C. urucurana* (Peres *et al.*, 1997), *C. hieronymi* (Catalán *et al.*, 2003) et *C. zambezicus* (Block *et al.*, 2004) ;

- des alcaloïdes dans *C. palanostigma* (Itokawa, 1991), *C. lechleri* (Carlin *et al.*, 1996) et *C. flavens* (Charris et Dominguez, 2000) ;

- des proanthocyanidines dans *C. urucurana* (Gurgel *et al.*, 2001), C. *panamensis* (Kostava *et al.*, 1999) et *C. celtidifolius* (Dalbó *et al.*, 2005) ;

- des flavonoïdes et autres substances phénoliques dans *C. draco* (Tsacheva *et al.*, 2004), *C. hovarum* (Krebs et Ramiarantsoa, 1997) et *C. hutchinsonianus* (Athikomkulchai *et al.*, 2006) ;

- des coumarines dans *C. draco* (Murillo *et al.*, 2001) ;

- des phenyl butanoïdes dans *C. schiedeanus* (Puebla *et al.*, 2005) et *C. cuneatus* (Suárez *et al.*, 2004) ;

- des cembranolides dans *C. gratissimus* (Mulholland *et al.*, 2010).

Outre l'isolement des molécules, des tests pharmacologiques ont été effectués sur différentes parties de plantes ou sur des extraits bruts. Ainsi, sur divers genres de *Croton,* beaucoup de propriétés curatives ont été rapportées : activités antilipidémiques, guérisons des plaies, des effets gastriques et de ses protections, anti-diarrhéique, antibactérien, antifongique, antiviral, antimalarial, anticancer, antioxydant ; myorelaxant, antispasmodique, anti-hypertenseur et anti-inflammatoire. De plus, plusieurs produits purs isolés ont aussi des effets pharmacologiques antidiabétiques, anti-hyper lipidiques, anti-hyper- cholestérolémie, anti-cancer, antidépressif central, vasorelaxant, hypotensive et brachycardiaque et anti-œstrogénique (Salatino *et al.*, 2007).

Plusieurs dizaines de publications décrivent la composition chimique des huiles essentielles du genre Croton. Aussi, nous nous sommes limités aux données les plus récentes. Il faut cependant noter les études très complètes (Hagedorn et Brown, 1991, Weyerstalh et al 1989), qui ont été réalisées pour l'identification des molécules sesquiterpèniques présentes dans la complexe huile de *Croton elutaria* Bennett plus connus sous le nom de cascarilla oil.

L'analyse des données bibliographiques fait clairement ressortir la très grande diversité de ce genre puisque de nombreuses compositions chimiques ont été décrites. Elles sont caractérisées par :

- des monoterpènes oléfiniques : l'huile essentielle des rameaux de *C. palanostigma*, originaire du Nord du Brésil, est caractérisée par l'α-pinène (41,4%), le limonène (29,0%) et le sabinène (11,5%) (Brasil *et al.*, 2009) ; Usman *et al.* (2009) ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *C. zembecus* du Nord central du Nigéria qui est constituée essentiellement du limonène (40,3%), du γ-terpinène (12,1%) et du β-pinène (10,4%) ;
- des monoterpènes oxygénés
  - alcools : l'huile essentielle des fruits de *C. palanostigma* est riche en linalol (42,7%) (Brasil *et al.*, 2009) tandis que l'huile de l'écorce de tronc de *C.*

oligandrum du Gabon présente une teneur encore plus élevée (53,5%) (Agnaniet *et al.*, 2005).

- oxydes : l'oxyde de caryophyllène est le composé majoritaire des huiles essentielles de feuilles (46,8%) et de tiges (26,5%) de *C. sellowii* du Brésil (Palmeira *et al.*, 2004) ; le 1,8-cinéole (37,5%) est le composé majoritaire dans *C. nepetaefolius* (Craveiro *et al.*, 1981) ;
- esters : le benzoate de benzyle (51,5%) est un composé marqueur de l'huile essentielle de baies de *C. macrostachyus* d'Ethiopie (Belay *et al.*, 2011). La composition de l'huile essentielle de feuilles de *C. matourensis* est dominée par la présence de l'acétate de fenchyle à 19,5%, et l'huile essentielle des fleurs de *C. micans*, originaire de Venezuela, est caractérisée par une teneur élevée en acétate de fenchyle (41,6%) que l'on retrouve aussi dans l'huile de feuilles de la même plante (25,3%) (Compagne *et al*., 2010) ;
- l'ascaridole, monoterpène comportant un peroxyde a été détecté avec des taux de 17,0 et 33,9% respectivement dans deux échantillons de l'huile essentielle de feuilles de *C. regelianus* du Brésil. Son isomère l'isoascaridole (2,9 et 7,5%) a aussi été identifié (Torres *et al.*, 2008) ;

- des sesquiterpènes oléfiniques :

L'huile essentielle de tiges de *C. pulegoides* du Brésil est dominée par les hydrocarbures sesquiterpéniques (56,5%) dont l'α-calacorène (12,9%), β-calacorène et cis-β-guaiène (6,5% chacun) (Neves et da Camara 2012) Le bicyclogermacrène (13,9%), le *trans*-caryophyllène (10,2%) et le germacrène D (10,1%) sont les composés majoritaires de l'huile essentielle de feuilles de *C. adenocalyx* de l'état de Ceará (Brésil) (de Lima *et al,* 2010). L'huile essentielle de feuilles de *C. heterocalyx* du-Brésil (Moreno et Lima ; 2009) est caractérisée par le germacrène D (12,5%), le bicyclogermacrène (11,2%), le δ-élémène (9,2%) et le spathulénol (6,9%) ;

- des sesquiterpènes oxygénés

L'huile essentielle de feuilles de *C. hirtus* récoltées à Simões - état de Piauí (Brésil) est dominée par les sesquiterpènes oxygénés (50,1%) dont le spathulénol (26,8%) (de

Lima *et al.*, 2012). L'huile essentielle de *C. rhamnifolius* var. *heliotropiifolius*, originaire du Brésil, est riche en spathulénol (16,4% dans les feuilles), oxyde de caryophyllène (8,3% dans les feuilles), guaiol (18,4% dans les tiges) et valérianol (10,6% dans les tiges) (Neves et da Camara, 2012). Les composés majoritaires des HE de feuilles et de tiges de *C. jacobinensis* du Nord-Est du Brésil sont respectivement la (*Z*)-α-atlantone (24,3%) et la *trans*-isolongifolanone (22,8%), (Neves et da Camara, 2011). Enfin, Suárez *et al.* (2011) ont étudié l'huile essentielle de feuilles de *C. gossypiifolius* du Venezuela et ont identifié l'oxyde d'α-cedrène (18,6%), le spathulénol (16,3%), le pentanoate de géranyle (5,3%) et l'α-cadinol (4,0%).

Concernant plus spécifiquement les huiles essentielles de Croton de Madagascar, une seule étude sur 4 espèces a été menée (Radulović *et al.*, 2006). La composition chimique des huiles essentielles est dominée par les hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques :

- l'huile essentielle des feuilles et tiges du *Croton antanosiensis* Leandri (section *Monguia*) est dominée par l'α-pinène (32,8%), le β-pinène (16,4%), le limonène (6,1%) et le *(E)*-nérolidol (5,6%) ;
- Dans l'huile essentielle de feuilles du *Croton decaryi* Leandri (section *Anisophyllum*) le *(E)*-β-caryophyllène (26,7%), l'α-pinène (21,2%) et l'α-humulène (19,0%) sont les composés majoritaires tandis que la composition chimique de l'huile essentielle de tiges est marquée par la prédominance de l' α-pinène (26,1%), du bornéol (13,3%), du camphène (11,5%) et du *(E)*-β-caryophyllène (8,6%).
- les composés majoritaires de l'huile essentielle de feuilles et tiges du *Croton geayi* Leandri (section *Argyrocroton*) sont le 1,8-cinéole (15,7%), le β-caryophyllène (14,8%), l'α-terpinéol (14,1%) et le τ-muurolol (6,6%) ;
- enfin pour la quatrième espèce, *Croton sakamaliensis* Leandri, le *(E)*-β-caryophyllène (28,3%), et son oxyde (12,5%) sont les composés majoritaires des huiles essentielles de feuilles tandis que celle des tiges est dominée par le 1,8-cinéole (37,9%) et le β-phellandrène (14,7%).

A notre connaissance, aucune étude concernant la composition chimique des huiles essentielles de *Croton kimosorum* et de *Croton* sp. n'a été décrite dans la littérature. Dans ce chapitre, nous avons réalisé l'identification des constituants des huiles essentielles des parties aériennes de *Croton kimosorum* et *Croton* sp., en utilisant l'association CPG (Ir), CPG-SM et RMN-^{13}C.

Pour chacune des huiles essentielles des deux espèces de *Croton, Croton kimosorum* et *Croton* sp., nous avons réalisé l'analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN-^{13}C. Ensuite, compte tenu de la complexité de l'huile essentielle, nous avons procédé à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice. Nous détaillons chacune des analyses dans les paragraphes suivants, ainsi que l'étude comparative des échantillons distillés à l'échelle laboratoire avec ceux distillés à l'échelle semi-industrielle avec un alambic de 1500 litres. Enfin, nous évaluerons l'activité antimicrobienne des huiles essentielles obtenues des différentes parties (aérienne, feuilles et/ou tiges) de *Croton kimosorum*.

II. L'HUILE ESSENTIELLE DES PARTIES AERIENNES DE *C. KIMOSORUM*

Un échantillon des parties aériennes (feuilles et tiges) de *Croton kimosorum* a été récolté au mois de janvier 2011 sur le site d'Andatabo-Toliara dans la région Sud-Ouest de Madagascar. Au sein du laboratoire, les feuilles et les tiges ont été séparées, puis elles ont été soumises à l'hydrodistillation durant 3h dans un appareil de type Clevenger. Les rendements en huile essentielle calculés par rapport à la masse du matériel végétal frais sont de 0,64% pour la partie aérienne, 0,61% pour les feuilles et 0,45% pour les de tiges.

II.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes

Un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes a été analysé par CPG(Ir), CPG/SM et par RMN-^{13}C (Tableau 17). Vint-sept composés qui représentant 92,9% de la composition globale ont été identifiés par la RMN du carbone-13. Les deux composés majoritaires sont le linalol (21,6%) et le sabinène (10,4%). Cinq composés ont une teneur comprise entre 4,0 à 10,0%, il s'agit d'un monoterpène hydrocarboné (β-pinène 6,2%) de trois monoterpènes oxygénés (1,8-cinéole 6,3%, terpinèn-4-ol 4,8% et géraniol 4,5%) ainsi que le (*E*)-β-caryophyllène (5,9%). Une dizaine des composés identifiés présentent des teneurs voisines de 1% tandis que les composés non identifiés ne dépassent pas des teneurs de 0,7%.

En raison de la complexité de l'huile essentielle, de nombreuses incertitudes sur les identifications de composés minoritaires subsistent même avec le couplage CPG-SM.

Tableau 17: Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. kimosorum*

Constituants	Ira	Irp	%a	identification
α-thujène	924	1029	2,5	Ir, RMN-^{13}C
α-pinène	932	1027	2,5	Ir, RMN-^{13}C
sabinène	967	1126	10,4	Ir, RMN-^{13}C
β-pinène	973	1115	6,2	Ir, RMN-^{13}C
myrcène	982	1163	2,0	Ir, RMN-^{13}C
α-phellandrène	999	1168	0,7	Ir, RMN-^{13}C
α-terpinène	1011	1184	1,1	Ir, RMN-^{13}C
p-cymène	1013	1274	3,7	Ir, RMN-^{13}C
Limonène*	1022	1204	1,5	Ir, RMN-^{13}C
1,8-cinéole*	1022	1212	6,3	Ir, RMN-^{13}C
(*E*)-β-ocimène	1038	1252	1,9	Ir, RMN-^{13}C
γ-terpinène	1050	1248	3,3	Ir, RMN-^{13}C
terpinolène	1080	1286	0,7	Ir, RMN-^{13}C
linalol	1086	1545	21,6	Ir, RMN-^{13}C
terpinéol-4	1163	1599	4,8	Ir, RMN-^{13}C
α-terpinéol	1173	1692	1,4	Ir, RMN-^{13}C
géraniol	1234	1842	4,5	Ir, RMN-^{13}C
acétate de géranyle	1360	1754	2,9	Ir, RMN-^{13}C

(*E*)-β-caryophyllène	1419	1598	5,9	Ir, RMN-^{13}C
α-humulène	1451	1668	0,8	Ir, RMN-^{13}C
allo-aromadendrène	1459	1638	0,6	Ir, RMN-^{13}C
germacrène-D	1477	1707	2,3	Ir, RMN-^{13}C
bicyclogermacrène	1492	1731	1,2	Ir, RMN-^{13}C
γ-cadinène	1506	1757	0,6	Ir, RMN-^{13}C
δ-cadinène	1515	1754	0,9	Ir, RMN-^{13}C
τ-cadinol	1626*	2179	1,2	Ir, RMN-^{13}C
épi-α-bisabolol	1669	2232	1,4	Ir, RMN-^{13}C
TOTAL			92,9	

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ira et Irp: indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20).

II.2. Fractionnement de l'huile essentielle de C. kimosorum

Afin d'obtenir la composition chimique la plus complète possible et de lever les ambigüités pour de nombreuses identifications, nous avons soumis 1,00 g d'huile essentielle à un fractionnement sur colonne ouverte de gel de silice de type « flash » (63-200μm). Quatre fractions ont été obtenues, une éluée au pentane contenant les composés hydrocarbonés (359 mg), et trois autres en utilisant un gradient de solvant pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante, contenant les composés oxygénés (tableau 18.

Huit constituants supplémentaires ont été identifiés lors de l'analyse du spectre de RMN-^{13}C de la fraction hydrocarbonée F_1 : deux monoterpènes (β-phellandrène 0,6%, et sept sesquiterpènes hydrocarbonés: α-copaène (0,9%), β-élémène (0,5%), (*E*)-β-farnésène (1,0%), γ-muurolène (0,8%), α-muurolène (0,5%), β-bisabolène (0,4%) et (*E*)-α-bisabolène (0,8%). Une faible partie des composés monoterpéniques très volatils a probablement disparu au cours de l'évaporation du solvant.

L'analyse du spectre de RMN-^{13}C de la fraction oxygénée F_2 a permis d'identifier sept composés supplémentaires par interrogation directe de la bibliothèque de spectres « Terpènes » : nonan-3-one (0,6%), oxyde de méthyle et de thymyle (0,8%), oxyde de méthyle et de carvacryle (1,1%), acétate de bornyle (1,4%), *trans*-

acétate de sabinyle (0,5%), géraniate de méthyle (1,7%) et oxyde de caryophyllène (0,8%) (Tableau 18).

L'étude du spectre de RMN-^{13}C de la fraction F_3 a permis l'identification de deux sesquiterpènes oxygénés : le 1,10-di-épi-cubénol (0,7%) et l'épi-α-bisabolol (5,1%) qui est impossible à identifier par CPG-SM. En effet, il présente le même spectre de masse que son épimère l'α-bisabolol et des indices de rétention très peu différents. L'identification de l'épi-α-bisabolol sera décrite dans le paragraphe 3.

Enfin, dans la fraction F_4, nous avons identifié huit nouveaux composés : *cis*- et *trans*-oxyde de linalol THF (1,1 et 1,0%), bornéol (0,6%), élémicine (0,9%), β-élémol (0,6%), spathulénol (1,2%), τ-muurolol (0,6%) et β-eudesmol (2,0%). En ce qui concerne l'(*E*)-isoélémicine (0,8%), ce composé est absent de la bibliothèque de spectres « Terpènes » et nous l'avons identifié en utilisant les données de la littérature. L'identification de cette dernière molécule sera décrite dans le paragraphe 3.

L'ensemble des fractions a été soumis à une analyse par CPG/SM qui a permis de confirmer les identifications réalisées par RMN et d'identifier une vingtaine de constituants supplémentaires à l'exception de l'(*E*)-isoélémicine et de l'épi-α-bisabolol.

II.3. Bilan de l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle

L'analyse de l'huile essentielle de partie aérienne de *C. kimosorum* par les techniques chromatographiques (chromatographie sur colonne et CPG(Ir)) et les techniques spectroscopiques (SM et RMN-^{13}C), a conduit à l'identification de 79 constituants qui représentent 97,6% de sa composition chimique (tableau 18). L'huile essentielle de *Croton kimosorum* est très riche en composés monoterpéniques (78,9%) avec une prédominance des oxygénés (42,1%). Elle est dominée par le linalol (21,6%), le 1,8-cinéole (6,3%), le terpinèn-4-ol (4,8%) et le géraniol (4,5%). Deux composés monoterpéniques, le sabinène (10,4%), le β-pinène (6,2%), et un composé

sesquiterpènique, le (*E*)-β-caryophyllène (5,9%) ont été identifiés à des teneurs appréciables. Une dizaine de sesquiterpènes oxygénés ont été identifiés parmi lesquels le τ-cadinol (1,2%) et l'α-épi-bisabolol (1,4%) mais leurs teneurs restent faibles avec moins de 4%.

Tableau 18 : Fractionnement de l'huile essentielle de *C. kimosorum*

			HE	F1	F2	F3	F4
Masse (mg)			1000	359	95	266	190
pentane/oxyde de diéthyle				100/0	95/5	90/10	0/100
Constituants	Ira	Irp	%a	%a	%a	%a	%a
α-thujène	924	1029	**2,5**	**3,0**	-	-	-
α-pinène	932	1027	**2,5**	**3,0**	-	-	-
sabinène	967	1126	**10,4**	**15,9**	-	-	-
β-pinène	973	1115	**6,2**	**9,7**	-	-	-
myrcène	982	1163	**2,0**	**3,6**	-	-	-
α-phellandrène	999	1168	**0,7**	**0,8**	-	-	-
α-terpinène	1011	1184	**1,1**	**1,2**	-	-	-
p-cymène	1013	1274	**3,7**	**9,6**	-	-	-
Limonène*	1022	1204	**1,5**	**3,0**	-	-	-
1,8-cinéole*	1022	1212	**6,3**	-	**48,7**	-	-
β-phellandrène*	1022	1213	tr	**0,6**	-	-	-
(*E*)-β-ocimène	1038	1252	**1,9**	**3,6**	-	-	-
γ-terpinène	1050	1248	**3,3**	**5,8**	-	-	-
cis-oxyde de linalol THF	1058	1440	0,2	-	-	-	**1,1**
nonanone-3	1066	1357	0,1	-	0,6	-	-
trans-oxyde de linalol THF	1073	1468	0,1	-	-	-	**1,0**
terpinolène	1080	1286	**0,7**	**1,3**	-	-	-
linalol	1086	1545	**21,6**	-	-	**67,9**	**30,4**
bornéol	1148	1697	0,1	-	-	-	**0,6**
terpinéol-4	1163	1599	**4,8**	-	-	**18,2**	**1,0**
α-terpinéol	1173	1692	**1,4**	-	-	-	**10,4**
oxyde de méthyle et de thymyle	1215	1594	0,1	-	**0,8**	-	-
oxyde de méthyle de carvacryle	1226	1604	0,1	-	**1,1**	-	-
géraniol	1234	1842	**4,5**	-	-	-	**38,8**
acétate de bornyle	1270	1579	0,1	-	**1,4**	-	-
trans-acétate de sabinyle	1273	1652	0,2	-	**0,5**	-	-
géraniate de méthyle	1301	1689	0,1	-	**1,7**	-	-
acétate de géranyle	1360	1754	**2,9**	-	**34,3**	-	-
α-copaène	1377	1493	0,3	**0,9**	-	-	-
β-élémène	1388	1590	0,2	0,5	-	-	-
(*E*)-β-caryophyllène	1419	1598	**5,9**	**15,1**	-	-	-
(E)-β-farnésène	1447	1665	**0,4**	**1,0**	-	-	-
α-humulène	1451	1668	**0,8**	**2,0**	-	-	-

allo-aromadendrène	1459	1638	**0,6**	**1,5**	-	-	-
γ-muurolène	1471	1686	0,3	**0,8**	-	-	-
germacrène-D	1477	1707	**2,3**	**4,6**	-	-	-
bicyclogermacrène	1492	1731	**1,2**	**1,9**	-	-	-
α-muurolène	1493	1722	0,1	**0,5**	-	-	-
β-bisabolène	1501	1724	0,1	0,4	-	-	-
γ-cadinène	1506	1757	**0,6**	**1,5**	-	-	-
δ-cadinène	1515	1754	**0,9**	**2,3**	-	-	-
élémicine	1517	2239	0,1	-	-	-	**0,9**
(*E*)-α-bisabolène	1531	1771	tr	**0,4**	-	-	-
β-élémol	1533	2072	0,1	-	-	-	**0,5**
spathulénol	1564	2113	0,2	-	-	-	**1,2**
oxyde de caryophyllène	1570	1976	0,2	**0,6**	**0,8**	-	-
1,10-di-épi-cubénol	1603	2052	0,2	-	-	**0,7**	-
(*E*)-isoélémicine	1611	2394	0,1	-	-	-	**0,8**
τ-cadinol	1626*	2159	**1,2**	-	-	**3,7**	**1,8**
τ-muurolol	1626*	2198	0,1	-	-	0,1	**0,6**
β-eudesmol	1638	2218	0,3	-	-	-	**2,0**
épi-α-bisabolol	1669	2211	**1,4**	-	-	**5,1**	**1,0**
TOTAL			96,9	96,6	89,9	95,7	93,1

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1), excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque* (colonne polaire BP-20). Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire et polaire. Les pourcentages en gras sont ceux des composés identifiés par RMN ^{13}C.

Parmi les espèces de Croton dont la composition chimique est décrite dans la littérature, nous avons identifié plusieurs espèces dont les huiles essentielles sont riches en linalol :

- HE d'écorces de tronc de *Croton oligandrum* Pierre ex Hutch du Gabon (linalol, 53,5%) *(*Agnaniet *et al., 2005)*
- HE de *C. cajucara* d'Amazonie linalol (3,0 à 28,6%) (Azevedo *et al.,* 2012),
- HE d'écorces de *C. aubrevillei* qui pousse en République de Centrafricaine (34,6%) (Menut *et al.*, 1995),
- HE des inflorescences de *C. lanjouwensis* originaire du Brésil : linalol 26,7% (Leao *et al*., 1998)
- HE d'écorce de tronc de *C. zambezicus*, linalol (33,8%) (Fekam *et al.*, 2002).
- HE de *Croton stellulifer* de Sao Tomé e Principe (Martins *et al*., 2000) (12,6%)

Tableau 19 : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. kimosorum*

N°	Constituants	Ira	Irp	%a	g/100g	Identification
1	α-thujène	924	1029	**2,5**	2,09	Ir, SM, RMN-^{13}C
2	α-pinène	932	1027	**2,5**	2,21	Ir, SM, RMN-^{13}C
3	camphène	945	1071	0,2	0,18	Ir, SM
4	oct-1-èn-3-ol	961	1446	tr	0,06	Ir, SM
5	sabinène	967	1126	**10,4**	9,10	Ir, SM, RMN-^{13}C
6	β-pinène	973	1115	**6,2**	5,34	Ir, SM, RMN-^{13}C
7	myrcène	982	1163	**2,0**	1,72	Ir, SM, RMN-^{13}C
8	α-phellandrène	999	1168	**0,7**	0,66	Ir, SM, RMN-^{13}C
9	α-terpinène	1011	1184	**1,1**	0,83	Ir, SM, RMN-^{13}C
10	p-cymène	1013	1274	**3,7**	3,27	Ir, SM, RMN-^{13}C
11	Limonène*	1022	1204	**1,5**	1,32	Ir, SM, RMN-^{13}C
12	1,8-cinéole*	1022	1212	**6,3**	6,87	Ir, SM, RMN-^{13}C
13	β-phellandrène*	1022	1213	tr	0,01	Ir, SM, RMN-^{13}C
14	(*Z*)-β-ocimène	1026	1235	0,2	0,14	Ir, SM
15	(*E*)-β-ocimène	1038	1252	**1,9**	1,58	Ir, SM, RMN-^{13}C
16	γ-terpinène	1050	1248	**3,3**	2,69	Ir, SM, RMN-^{13}C
17	*cis*-oxyde de linalol THF	1058	1440	0,1	0,20	Ir, SM, RMN-^{13}C
18	nonanone-3	1066	1357	0,1	0,07	Ir, SM,
19	nonanone-2	1070	1389	0,1	0,07	Ir, SM
20	*trans*-oxyde de linalol THF	1073	1468	0,1	0,13	Ir, SM, RMN-^{13}C
21	terpinolène	1080	1286	**0,6**	0,52	Ir, SM, RMN-^{13}C
22	cis-hydrate de sabinène	1080	1541	tr	0,02	Ir, SM
23	linalol	1086	1545	**21,6**	24,10	Ir, SM, RMN-^{13}C
24	acétate d'octèn-3-yle	1093	x	tr	-	Ir, SM
25	α-thujone	1099	1441	tr	-	Ir, SM
26	pinocarvone	1139	1555	tr	-	Ir, SM
27	bornéol	1148	1697	0,1	0,07	Ir, SM, RMN-^{13}C
28	cis-oxyde de linalol THP	1150	x	tr	-	Ir, SM
29	trans-oxyde de linalol THP	1152	x	tr	-	Ir, SM
30	terpinéol-4	1163	1599	**4,5**	5,37	Ir, SM, RMN-^{13}C
31	decan-2-one	1173	x	tr	-	Ir, SM
32	α-terpinéol	1173	1692	**1,4**	1,59	Ir, SM, RMN-^{13}C
33	nérol	1200	1787	tr	-	Ir, SM
34	néral	1212	1678	tr	-	Ir, SM
35	oxyde de méthyle et de thymyle	1215	1594	0,1	0,12	Ir, SM, RMN-^{13}C
36	oxyde de méthyle de carvacryle	1226	1604	0,1	0,13	Ir, SM, RMN-^{13}C
37	géraniol	1234	1842	**4,5**	5,22	Ir, SM, RMN-^{13}C

38	acétate de linalyle	1239	1567	tr	-	Ir, SM
39	acétate de bornyle	1270	1579	0,1	0,14	Ir, SM, RMN-^{13}C
40	*trans*-acétate de sabinyle	1273	1652	0,2	0,18	Ir, RMN-^{13}C
41	méthyle de géraniate	1301	1689	0,1	0,18	Ir, SM, RMN-^{13}C
42	δ-élémène	1335	1473	tr	0,03	Ir, SM
43	acétate de néryle	1342	1722	tr	0,02	Ir, SM
44	α-cubébène	1349	1458	tr	0,02	Ir, SM
45	acétate de géranyle	1360	1754	**2,9**	3,21	Ir, SM, RMN-^{13}C
46	α-copaène	1377	1493	0,3	0,29	Ir, SM, RMN-^{13}C
47	β-bourbonène	1384	1519	0,1	0,07	Ir, SM
48	β-élémène	1388	1590	0,2	0,18	Ir, SM, RMN-^{13}C
49	α-gurjunène	1411	1530	0,1	0,09	Ir, SM
50	(*E*)-β-caryophyllène	1419	1598	**5,9**	4,95	Ir, SM, RMN-^{13}C
51	β-copaène	1427	1590	tr	0,01	Ir, SM
52	aromadendrène	1442	1606	0,1	0,07	Ir, SM
53	(*E*)-β-farnésène	1447	1665	0,4	0,32	Ir, SM, RMN-^{13}C
54	α-humulène	1451	1668	**0,8**	0,71	Ir, SM, RMN-^{13}C
55	allo-aromadendrène	1459	1638	**0,6**	0,52	Ir, SM RMN-^{13}C
56	γ-muurolène	1471	1686	0,3	0,22	Ir, SM, RMN-^{13}C
57	γ-curcumène	1472	1689	0,2	0,13	Ir, SM
58	germacrène-D	1477	1707	**2,3**	1,87	Ir, SM, RMN-^{13}C
59	β-selinène	1482	1712	tr	0,02	Ir, SM
60	bicyclogermacrène	1492	1731	**1,2**	0,85	Ir, SM, RMN-^{13}C
61	α-muurolène	1493	1722	0,1	0,14	Ir, SM, RMN-^{13}C
62	β-bisabolène	1501	1724	0,1	0,12	Ir, SM, RMN-^{13}C
63	γ-cadinène	1506	1757	**0,6**	0,59	Ir, SM, RMN-^{13}C
64	calaménène	1510	1828	0,1	0,07	Ir, SM
65	δ-cadinène	1515	1754	**0,9**	0,77	Ir, SM, RMN-^{13}C
66	élémicine	1517	2239	0,1	0,07	Ir, SM, RMN-^{13}C
67	(*E*)-γ-bisabolène	1529	1760	0,1	0,08	Ir, SM
68	(*E*)-α-bisabolène	1531	1771	tr	-	Ir, SM, RMN-^{13}C
69	β-élémol	1533	2072	0,1	0,11	Ir, SM, RMN-^{13}C
70	spathulénol	1564	2118	0,2	0,30	Ir, SM, RMN-^{13}C
71	oxyde de caryophyllène	1570	1976	0,2	0,37	Ir, SM, RMN-^{13}C
72	1,10-di-épi-cubénol	1603	2052	0,2	0,19	Ir, SM, RMN-^{13}C
73	(*E*)-isoélémicine	1611	2394	0,1	0,10	Ir, RMN-^{13}C
74	τ-cadinol*	1626	2159	**1,2**	1,29	Ir, SM, RMN-^{13}C
75	τ-muurolol*	1626	2179	0,1	0,07	Ir, SM, RMN-^{13}C
76	β-eudesmol	1637	2218	0,3	0,31	Ir, SM, RMN-^{13}C
77	α-bisabolol	1666	2229	0,1	0,06	Ir, SM
78	épi-α-bisabolol	1669	2232	1,4	1,54	Ir, RMN-^{13}C

79	cembrène A	1956	2266	0,1	0,18	Ir, SM
	TOTAL			97,6	96,04	
	Monoterpènes hydrocarbonés			36.8	31,66	
	Monoterpènes oxygénés			42.1	47,55	
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			14.4	12,10	
	Sesquiterpènes oxygénés			3,8	4,24	
	Autres oxygénés			0.4	0,31	
	diterpènes			0.1	0,18	

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP-1) et sur polaire (BP-20). %a : pourcentage mesuré sur colonne apolaire, excepté les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Trace : tr<0,1%.

II.4. Quantification par CPG avec utilisation des facteurs de réponse (FR)

La CPG est la méthode classique de quantification des constituants d'huile essentielle. Dans le souci de fiabilité et de reproductibilité des résultats, habituellement exprimé en pourcentage, notamment pour le contrôle qualité des huiles essentielles, il apparaît nécessaire d'utiliser des facteurs de réponses (FR). Ces derniers peuvent être assimilés à des facteurs de correction pour quantifier par CPG des constituants préalablement identifiés et améliorer ainsi la fiabilité des résultats obtenus (Bicchi *et al.*, 2008). Par ailleurs, les signaux générés au niveau des détecteurs en CPG dépendent notamment de la concentration des échantillons et la structure chimique des molécules (en particulier du nombre d'oxygènes qui ne subissent pas la combustion). Par conséquent, si la réponse des détecteurs aux analyses est différente, un FR doit être appliqué dans le but de normaliser les résultats obtenus.

Pour les échantillons de deux espèces de *Croton*, nous avons appliqué la méthode de calcul des FR proposée par Costa *et al.* (2008) (tableaux 19 et 23) avec utilisation du nonane comme référence interne. Les valeurs des FR sont les suivantes : oléfines monoterpéniques (1,03 ± 0,01) et sesquiterpéniques (0,98 ± 0,03), cétones (1,30 ± 0,01), alcools (1,30 ± 0,02), aldéhydes (1,30 ± 0,02) et acétates (1,59 ± 0,02).

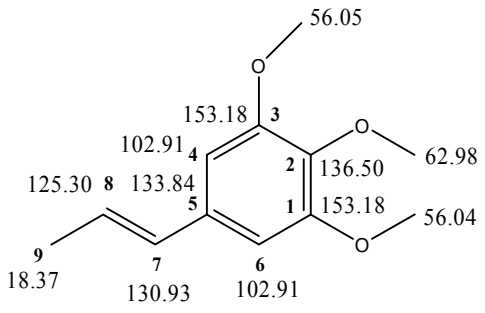
L'analyse quantitative avec l'application des FR conduit à une caractérisation différente de la composition chimique. Ainsi si les composés oléfiniques sont majoritaires en quantification relative, 51,3 % *vs* 46,3%, la quantification massique conduit elle à un rapport inverse avec 43,94 g/100g de composés oléfiniques *vs* 52,10 g/100g pour les composés oxygénés. Nous constatons, par la quantification avec une référence interne, un rapport inversé. Ces inversions ont été signalées aussi par Bicchi *et al*. (2008) en appliquant cette méthode aux huiles essentielles de *Tarchonanthus camphoratus* L. et *Pistacia lentiscus* L. Ils ont observé des différences importantes entre les résultats obtenus par quantification relative et absolue en ce qui concerne les proportions des différentes familles chimiques. Dans l'huile de *Tarchonanthus camphoratus*, ils ont identifié 43,09 g/100 g des composés oxygénés (37,9% en quantification relative) et de 33,73 g/100 g de composés oléfiniques contre 38,7% en quantification relative.

II.5. Identification de molécules

II.5.1 Identification de l'(*E*)-isoélémicine à partir des données de la littérature

Les déplacements chimiques des carbones de (*E*)-isoélémicine repérés dans le spectre de RMN de la fraction F_4 à une teneur de 0,8% correspondent à ceux décrits par Lee *et al* .(1999) (Figure 24).

(*E*)-isoélémicine



N° C	δ (ppm) Lee *et al.*, 1999	δ (ppm) F4
1, 3	153,2	153,18
2	136,5	136,50
5	133,7	133,84
7	130,8	130,93
8	125,2	125,30
4, 6	102,9	102,91
10	63,2	62,98
12	55,9	56,05
11	55,9	56,04
9	18,2	18,37

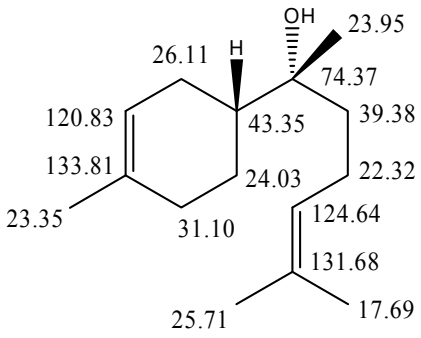
Figure 24 : Structures et déplacements chimiques de (*E*)-isoélémicine

Compte tenu de la précision des deux mesures (au dixième et au centième), l'écart entre les déplacements chimiques n'est pas significatif.

II.5.2 Identification de l'épi-α-bisabolol

L'épi-α-bisabolol est identifié dans les deux espèces de *Croton*. Il a été identifié initialement dans l'huile essentielle de *Rosa rugosa* (Hashidoko *et al.*, 1994), puis dans celle de *Juniperus communis* d'Estonie (Orav *et al.*, 2010). Ce sesquiterpène oxygéné est identifié dans la fraction F_3 (5,1%,) et les valeurs de déplacements chimiques sont similaires à celles décrites dans la bibliothèque de spectres « Terpènes ». Il faut souligner que ce composé et son épimère l'α-bisabolol présentent des spectres de masse identiques et des indices de rétention (1167 *vs* 1165 et 2208 *vs* 2211) tellement proches que leurs identifications ne sont fiables que par utilisation de la RMN du carbone-13 (Figure 25).

épi-α-bisabolol



N° C	δ (ppm) F3	δ (ppm) A	δ (ppm) B
4	133,81	133,76	134,10
11	131,68	131,61	131,64
10	124,64	124,67	124,68
3	120,83	120,84	120,62
7	74,37	74,36	74,30
1	43,35	43,37	43,07
8	39,38	39,42	40,17
5	31,10	31,12	31,10
2	26,11	26,12	26,97
12	25,71	25,68	25,71
6	24,03	24,09	23,35
15	23,95	24,04	23,35
14	23,35	23,36	23,24
9	22,32	22,34	22,13
13	17,69	17,66	17,68

Figure 25 : Structure et déplacements chimiques de l'épi-α-bisabolol

F3 : Déplacements chimiques repérés dans la fraction F3.A et B: déplacements chimiques de la bibliothèque « Terpènes » de l'épi-α-bisabolol et l'α-bisabolol.

III. L'HUILE ESSENTIELLE DES PARTIES AERIENNES DE *CROTON* SP. (ANDRIAMBOLAMENA)

Un échantillon des parties aériennes (feuilles et tiges) de *Croton* sp. dénommé localement Andriambolamena a été récolté durant le mois de janvier 2011. L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation pendant une durée de 3h. Le rendement en huile essentielle, calculé par rapport à la masse de végétal frais est de 0,54%.

III.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes

L'huile essentielle a été analysée par les techniques habituelles (CPG (Ir), CPG-SM et RMN-^{13}C). Trente-six composés ont été identifiés et représentent 92,4% de la composition chimique globale. Le limonène (21,6%), le β-pinène (11,0%) et le 1,8-cinéole (8,7%) et le (*E*)-β-caryophyllène (8,1%) sont les constituants majoritaires.

Comme précédemment, nous avons procédé à une chromatographie sur colonne ouverte de silice avec un gradient d'élution pentane/oxyde de diéthyle à partir d'un échantillon d'HE de *Croton* sp. (1,00 g). Quatre fractions ont été obtenues, une fraction éluée au pentane et les trois autres fractions par des mélanges pentane/oxyde de diéthyle 95/5, 90/10 et 0/100.

III.2. Fractionnement de l'huile essentielle de Croton sp.

L'analyse du spectre de RMN-^{13}C de la fraction hydrocarbonée (580 g) conduit à l'identification de neuf nouvelles oléfines par rapport à l'huile essentielle totale (tableau 22). L'étude des trois autres fractions (96 mg, 159 mg et 140 mg) a permis d'identifier de nombreuses molécules sesquiterpéniques oxygénées supplémentaires qui présentaient des teneurs faibles dans l'huile totale. Tous ces constituants sont présents dans les bibliothèques de spectres « terpènes ». A titre d'exemple :

- épi-cubénol (0,5%), 1,10-di-épicubénol (1,6%), palustrol (1,8%), oxyde d'humulène (1,2%) et germacra-1(10),5-dièn-4β-ol (1,0%) dans la fraction F2;
- caryophylla-4(14),8(15)dièn-5α-ol (1,3%) dans la fraction F4.

L'ensemble des fractions a été soumis à une analyse par CPG/SM qui a permis de confirmer les identifications réalisées par RMN à l'exception de l'épi-α-bisabolol mais aussi de quelques sesquiterpènes oxygénés (palustrol, caryophylla-4(14),8(15)dièn-5α-ol,….) et d'identifier une dizaine de constituants supplémentaires présents en très faible pourcentage. Cette étude constitue encore un exemple de la nécessité d'utiliser plusieurs techniques pour réaliser l'identification des constituants d'une huile essentielle.

Tableau 20 : Fractionnement de l'huile essentielle de *Croton* sp.

			HE	F1	F2	F3	F4
Masse (mg)			1000	580	96	159	140
Pentane/oxyde de diéthyle				100/0	95/5	90/10	100/0
Constituants	Ira	Irp	%a	%a	%a	%a	%a
α-thujène	922	1028	**0,7**	**0,8**			
α-pinène	930	1026	**2,6**	**2,7**			
camphène	943	1066	**0,4**	**0,4**			
oct-1-èn-3-ol	959	1144	0,1			**1,0**	
sabinène	965	1124	**2,4**	**2,8**			
β-pinène	970	1114	**11,0**	**12,9**			
myrcène	980	1162	**2,2**	**2,8**			
α-phellandrène	997	1167	**2,1**	**2,8**			
α-terpinène	1009	1182	0,3	**0,4**			
p-cymène	1011	1274	**1,9**	**2,5**			
1,8-cinéole*	1020	1211	**8,7**		**69,0**	0,1	
limonène*	1021	1203	**21,6**	**30,5**			
β-phellandrène	1021	1211	**0,6**	**0,6**			
γ-terpinène	1048	1246	**1,4**	**1,9**			
trans-hydrate de sabinène	1052	1459	0,1			0,1	**1,5**
cis-oxyde de linalol THF	1056	1438	tr				**0,6**
trans-oxyde de linalol THF	1071	1467	tr				**0,5**
terpinolène	1078	1284	0,3	**0,4**			
linalol	1082	1542	**5,9**			**41,2**	**2,8**
bornéol	1148	1697	0,1			0,3	**2,9**
terpinène-4-ol	1161	1597	**1,2**			**8,7**	0,2
α-terpinéol	1171	1690	**2,3**				**31,5**
α-copaène	1375	1491	**1,6**	**2,3**			
β-élémène	1387	1590	**0,5**	**0,6**			
α-gurjunène	1409	1529	0,3	**0,4**			
(*E*)-β-caryophyllène	1417	1595	**8,1**	**12,1**			
(*E*)-β-farnésène	1445	1663	**0,7**	**1,2**			

α-humulène	1450	1666	**1,3**	**2,0**			
allo-aromadendrène	1457	1636	**0,8**	**1,2**			
γ-muurolène	1470	1685	**0,3**	**1,8**			
germacrène-D	1475	1705	**2,2**	**3,1**			
4-épi-cubébol	1486	1880	0,3			**0,6**	**0,5**
bicyclogermacrène	1490	1729	**1,8**	**2,6**			
α-muurolène	1492	1720	0,4	**0,5**			
β-bisabolène	1499	1723	0,2	**0,5**			
cubébol	1505	1931	**0,9**			**1,1**	**1,2**
γ-cadinène	1508	1755	0,1	**1,2**			
δ-cadinène	1513	1753	**1,8**	**2,9**			
β-sesquiphellandrène	1519	1766	**0,5**	**0,6**			
α-calacorène*	1524	1912	0,3	**0,6**			
(*E*)-γ-bisabolène	1527	1759	0,2	**0,4**			
(*E*)-α-bisabolène	1531	1771	**0,4**	**0,6**			
β-élémol	1533	2071	**0,7**			tr	**7,3**
spathulénol*	1563	2113	**0,6**			**3,3**	**2,7**
palustrol*	1563	1920	tr		**1,8**	0,3	
oxyde de caryophyllène*	1568	1975	**0,8**		**8,1**	**1,2**	
germacra-1(10),5-dièn-4β-ol	1568	2020	0,1		**1,0**	**0,8**	0,2
épi-cubénol	1583	2059	tr		0,5	**0,6**	
oxyde humulène	1592	2030	0,2		**1,2**	**1,0**	0,3
1,10-di-épi-cubénol	1601	2050	0,2		**1,6**	**0,6**	
γ-eudesmol	1620	2159	0,1				**1,4**
τ-cadinol	1624	2161	**0,8**			**6,5**	0,1
τ-muurolol	1624	2176	0,3			**1,9**	**0,9**
caryophylla-4(14),8(15)dièn-5α-ol	1628	2286	tr				**1,3**
β-eudesmol*	1634	2218	**0,4**				**9,3**
cubénol*	1634	2065	tr				0,4
α-cadinol	1637	2221	**0,5**			0,4	**7,4**
α-eudesmol	1639	2210	0,3			0,2	**4,8**
β-bisabolol	1648	2139	0,1				**1,8**
épi-α-bisabolol	1667	2211	**2,6**			**21,4**	**0,6**
TOTAL			96,3	96,0	83,6	91,3	80,2

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1), excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque* (colonne polaire BP-20). Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire et polaire. Les pourcentages en gras sont ceux des composés identifiés par RMN-^{13}C.

III.3. Bilan de l'analyse détaillée de l'HE de Croton sp.

L'analyse de l'huile essentielle des parties aériennes de *Croton* sp. par les techniques chromatographiques : Chromatographie sur colonne et CPG(Ir) et les

techniques spectroscopiques : CPG-SM et RMN-^{13}C, nous a conduit à l'identification de 68 constituants qui représentent 96,9% de la composition chimique globale (tableau 23).

La composition chimique de cette huile essentielle est dominée par les composés oléfiniques (69,7%) et s'avère riche en hydrocarbures monoterpéniques (47,9%). Elle est dominée par le limonène (21,6%) et le β-pinène (11,0%). Le 1,8-cinéole (8,7%), le (*E*)-β-caryophyllène (8,1%) et le linalol (5,9%) présentent des teneurs supérieures à 5%. Cette huile essentielle est aussi caractérisée par un grand nombre de composés sesquiterpéniques oxygénés dont la teneur est par contre faible (8,8% au total) rendant ainsi leur identification difficile. On peut citer par exemple le germacra-1(10),5-diène-4β-ol (0,1%) ou le caryophylla-4(14),8(15)dièn-5 (traces). Comme pour l'HE de *C. kimosorum*, nous avons procédé à une analyse quantitative par CPG en utilisant les facteurs de rétention et le nonane comme référence interne.

Tableau 21 : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *Croton sp.* (Andriambolamena)

N°	Constituants	Ira	Irp	%a	g/100g	Identification
1	α-thujène	922	1028	0,7	0,59	Ir, SM, RMN-^{13}C
2	α-pinène	930	1026	2,6	2,27	Ir, SM, RMN-^{13}C
3	camphène	943	1066	0,4	0,33	Ir, SM, RMN-^{13}C
4	oct-1-èn-3-ol	959	1144	0,1	0,15	Ir, SM, RMN-^{13}C
5	sabinène	965	1124	2,4	2,12	Ir, SM, RMN-^{13}C
6	β-pinène	970	1114	11,0	9,46	Ir, SM, RMN-^{13}C
7	myrcène	980	1162	2,2	1,88	Ir, SM, RMN-^{13}C
8	α-phellandrène	997	1167	2,1	1,88	Ir, SM, RMN-^{13}C
9	α-terpinène	1009	1182	0,3	0,28	Ir, SM, RMN-^{13}C
10	p-cymène	1011	1274	1,9	1,51	Ir, SM, RMN-^{13}C
11	1,8-cinéole*	1020	1211	8,7	9,45	Ir, SM, RMN-^{13}C
12	limonène*	1021	1203	21,6	19,49	Ir, SM, RMN-^{13}C
13	β-phellandrène	1021	1211	0,6	0,56	Ir, SM, RMN-^{13}C
14	(*Z*)-β-ocimène	1024	1233	0,2	0,17	Ir, SM
15	(*E*)-β-ocimène	1036	1250	0,2	0,17	Ir, SM
16	γ-terpinène	1048	1246	1,4	1,22	Ir, SM, RMN-^{13}C
17	*trans*-hydrate de sabinène	1052	1459	0,1	0,13	Ir, SM, RMN-^{13}C
18	*cis*-oxyde de linalol THF	1056	1438	tr	-	Ir, SM, RMN-^{13}C
19	*trans*-oxyde de linalol THF	1071	1467	tr	-	Ir, SM, RMN-^{13}C
20	terpinolène	1078	1284	0,3	0,28	Ir, SM, RMN-^{13}C

21	*cis*-hydrate de sabinène	1078	1537	tr	0,01	Ir, SM
22	linalol	1082	1542	5,9	6,55	Ir, SM, RMN-^{13}C
23	bornéol	1148	1697	0,1	0,18	Ir, SM, RMN-^{13}C
24	terpinène-4-ol	1161	1597	1,2	1,34	Ir, SM, RMN-^{13}C
25	α-terpinéol	1171	1690	2,3	2,64	Ir, SM, RMN-^{13}C
26	α-cubébène	1348	1457	tr	0,05	Ir, SM
27	α-copaène	1375	1491	1,6	1,32	Ir, SM, RMN-^{13}C
28	β-bourbonène	1383	1518	0,1	0,12	Ir, SM
29	β-élémène	1387	1588	0,5	0,41	Ir, SM, RMN-^{13}C
30	α-gurjunène	1409	1529	0,3	0,22	Ir, SM, RMN-^{13}C
31	(*E*)-β-caryophyllène	1417	1595	8,1	6,78	Ir, SM, RMN-^{13}C
32	aromadendrène	1440	1606	0,1	0,06	Ir, SM
33	(*E*)-β-farnésène	1445	1663	0,7	0,67	Ir, SM, RMN-^{13}C
34	α-humulène	1450	1666	1,3	1,14	Ir, SM, RMN-^{13}C
35	allo-aromadendrène	1457	1636	0,8	0,68	Ir, SM, RMN-^{13}C
36	γ-muurolène	1470	1685	0,3	0,21	Ir, SM, RMN-^{13}C
37	germacrène-D	1475	1705	2,2	1,84	Ir, SM, RMN-^{13}C
38	β-sélinène	1481	1710	0,1	0,05	Ir, SM
39	4-épi-cubébol	1486	1880	0,2	0,3	Ir, SM, RMN-^{13}C
40	bicyclogermacrène	1490	1729	1,8	1,54	Ir, SM, RMN-^{13}C
41	α-muurolène	1492	1720	0,4	0,30	Ir, SM, RMN-^{13}C
42	β-bisabolène	1499	1723	0,2	0,18	Ir, SM, RMN-^{13}C
43	cubébol	1505	1931	0,9	1,17	Ir, SM, RMN-^{13}C
44	γ-cadinène	1508	1755	0,1	0,11	Ir, SM, RMN-^{13}C
45	δ-cadinène	1513	1753	1,8	1,55	Ir, SM, RMN-^{13}C
46	β-sesquiphellandrène	1519	1766	0,5	0,44	Ir, SM, RMN-^{13}C
47	α-calacorène	1524	1912	0,3	0,25	Ir, SM, RMN-^{13}C
48	(*E*)-γ-bisabolène	1527	1759	0,2	0,19	Ir, SM, RMN-^{13}C
49	(*E*)-α-bisabolène	1531	1771	0,4	0,34	Ir, SM, RMN-^{13}C
50	β-élémol	1533	2071	0,7	0,81	Ir, SM, RMN-^{13}C
51	spathulénol*	1563	2113	0,6	0,66	Ir, SM, RMN-^{13}C
52	Palustrol*	1563	1920	tr	0,05	Ir, RMN-^{13}C
53	oxyde de caryophyllène*	1568	1975	0,8	1,09	Ir, SM, RMN-^{13}C
54	germacra-1(10),5-diène-4β-ol*	1568	2020	0,1	0,11	Ir, RMN-^{13}C
55	épi-cubénol	1583	2059	tr	0,01	Ir, SM, RMN-13C
56	oxyde d'humulène	1592	2030	0,2	0,31	Ir, SM, RMN-^{13}C
57	1,10-di-épi-cubénol	1601	2050	0,2	0,17	Ir, SM, RMN-^{13}C
58	γ-eudesmol*	1620	2159	0,1	0,10	Ir, SM, RMN-^{13}C
59	τ-cadinol*	1624	2161	0,8	1,06	Ir, SM, RMN-^{13}C
60	τ-muurolol*	1624	2176	0,3	0,36	Ir, SM, RMN-^{13}C
61	caryophylla-4(14),8(15)dièn-5α-ol	1628	2286	tr	0,01	Ir, RMN-^{13}C
62	cubénol*	1634	2065	tr	0,01	Ir, SM
63	β-eudesmol*	1634	2218	0,4	0,52	Ir, SM, RMN-^{13}C
64	α-cadinol	1637	2221	0,5	0,57	Ir, SM, RMN-^{13}C
65	α-eudesmol	1639	2233	0,3	0,28	Ir, SM, RMN-^{13}C
66	β-bisabolol	1648	2139	0,1	0,12	Ir, SM, RMN-^{13}C

67	α-bisabolol	1665	2208	tr	0,16	Ir, SM
68	épi-α-bisabolol	1667	2211	2,6	2,99	Ir, SM, RMN-^{13}C
	TOTAL			96,9	91,95	
Monoterpènes hydrocarbonés				47.9	42.21	
Monoterpènes oxygénés				18,3	20,39	
Sesquiterpènes hydrocarbonés				21,8	18,40	
Sesquiterpènes oxygénés				8,8	10,82	
Autres (acycliques)				0,1	0,15	

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). %a : pourcentage mesurés sur colonne apolaire, excepté les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Trace tr<0,1%.

III.4 Comparaison de la composition chimique en fonction du mode d'extraction

Nous avons comparé la composition chimique de deux échantillons. Le premier obtenu par hydrodistillation et étudié ci-dessus et le second obtenu par entrainement à la vapeur à l'échelle semi-industrielle sur le site de collecte afin d'étudier les variations de la composition liées au mode d'obtention de l'HE (Tableau 22).

Pour chaque espèce, nous constatons une absence de variations qualitatives mais plutôt des variations quantitatives surtout pour l'HE de *Croton* sp. Ces variations concernent surtout le (*E*)-β-caryophyllène (5,9%, HD vs 1,3%, EV pour *Croton kimosorum*) et (8,1%, HD vs 1,2%, EV pour *Croton* sp.). Pour l'HE de *Croton* sp., il y des variations fortes pour le limonène (21,6%, HD vs 11,1%, EV) et le linalol (5,9%, HD vs 0,6%, EV).

Dans le cas de *Croton kimosorum,* nous pouvons conclure que les deux modes d'obtention de l'huile essentielle conduisent à des compositions chimiques similaires. Par contre, dans le cas de l'huile essentielle de *Croton* sp., il y a des différences inexplicables. Les conditions de l'hydrodistillation par l'alambic semblent poser des problèmes et mériteraient d'être approfondies car le caractère parfois très empirique des méthodes de travail conduit probablement à un manque de reproductibilité.

Tableau 22 : Composition chimique de l'HE des parties aériennes de *Croton* sp. obtenue par hydrodistillation (HD) et par entraînement à la vapeur d'eau (EV).

Plante			*Croton kimosorum*		*Croton* sp.	
Distillation			HD 01/2011	EV 12/2010	HD 01/2011	EV 06/2010
Composé	Ira	Irp	%a	%a	%a	%a
α-pinène	932	1027	2,5	3,6	2,6	2,8
sabinène	967	1126	10,4	7,4	2,4	1,7
β-pinène	973	1115	6,2	6,9	11,0	5,8
myrcène	982	1163	2,0	1,1	2,2	0,3
p-cymène	1013	1274	3,7	8,5	1,9	3,3
limonène*	1022	1204	1,5	3,0	21,6	11,1
1,8-cinéole*	1022	1212	6,3	11,7	8,7	2,9
(*E*)-β-ocimène	1038	1252	1,9	0,9	-	-
γ-terpinène	1050	1248	3,4	0,8	1,4	0,1
linalol	1086	1545	21,6	21,0	5,9	0,6
terpinèn-4-ol	1163	1599	4,8	5,1	1,2	1,3
α-terpinéol	1173	1692	1,4	2,0	2,3	2,2
oxyde de méthyle et de thymyle	1215	1594	0,1	0,1	-	-
oxyde de méthyle et de carvyle	1226	1604	0,1	0,1	-	-
géraniol	1234	1842	4,6	0,2	-	-
acétate de géranyle	1360	1754	2,9	tr	-	-
(*E*)-β-caryophyllène	1419	1598	5,9	1,3	8,1	1,2
germacrène-D	1477	1707	2,3	0,1	2,2	0,5
bicyclogermacrène	1492	1731	1,2	0,3	1,8	0,3
β-sesquiphellandrène	1519	1766	-	-	0,5	3,6
β-élémol	1533	2071	0,1	0,7	0,7	8,7
spathulénol*	1564	2113	0,2	1,0	0,6	1,3
germacra-1(10),5-dièn-4-β-ol*	1568	2020	-	-	0,1	0,2
1,10-di-épi-cubénol	1603	2052	0,2	0,4	0,2	0,2
τ-cadinol*	1626	2161	1,3	1,6	-	-
α-eudesmol	1639	2233	0,3	0,2	-	-
α-épi-bisabolol	1669	2211	1,4	0,2	2,6	0,2
cembrène A	1956	2266	0,1	0,2	-	-

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1), excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque* (colonne polaire BP-20). Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire et polaire. D1 : distillation à l'échelle laboratoire ; D2 : distillation en Alambic.

IV. BILAN DE L'ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE DEUX ESPECES DE CROTON DE MADAGASCAR

La composition chimique des huiles essentielles de deux espèces de *Croton* étudiées sont caractérisées par la prédominance des monoterpènes : linalol (*Croton kimosorum*) et limonène (*Croton sp.)*. Dans la première HE, les composés oxygénés 51,17g/100g sont majoritaires tandis que la seconde est dominée par les composés oléfiniques avec 60,61g/100g. Dans le cas de l'HE de *Croton* sp, la fraction sesquiterpénique oxygénée est qualitativement riche (21 molécules) mais quantitativement limitée (8,8% et 10,82g/100 g) conduisant à des identifications souvent difficiles du fait des coélutions qui mettent en évidence l'intérêt d'utiliser la RMN du carbone-13 pour assurer l'identification des composés et en particulier les sesquiterpènes oxygénés.

Dans la littérature, les deux pinènes, le linalol, le (E)-β-caryophyllène sont fréquemment décrits comme composés majoritaires des HE de croton et avaient été identifiés dans les huiles essentielles des quatre espèces de Croton originaires de Madagascar (Radulović *et al.*, 2006). Il faut souligner que l'épi-α-bisabolol, n'a jamais été signalé dans une HE du genre *Croton* contrairement à son épimère l'α-bisabolol. La difficulté de son identification et la confusion possible avec son épimère sont sans doute responsables de ce fait.

Les huiles essentielles de *Croton kimosorum* et de *Croton* sp. n'avaient jamais fait l'objet d'étude phytochimique. Cependant, nous avons comparé leurs compositions chimiques avec celles décrites dans la littérature pour les huiles essentielles de divers *Croton*. Par exemple, le linalol ou le limonène, deux composés majoritaires dans l'huile essentielle de *Croton kimosorum* et *Croton* sp. ont été identifiés dans les huiles de feuilles de *C. cajucura* du Brésil. Plusieurs monoterpènes (α-pinène, β-pinène, 1,8-cinéole, γ-terpinène, bornéol) ont été identifiés dans les huiles essentielles d'écorce de *C. monteverdensis* et *C. niveus* de Costa Rica (Setzer, 2006) et

de feuilles de *C. zambesicus* du Nigeria (Usman *et al.*, 2009). Divers sesquiterpènes (bicyclogermacrène, (*E*)-β-caryophyllène, spathulénol , α- et β-calacorène, 1,10-di-épi-cubénol, (*E*)-γ-bisabolène) présents dans nos deux espèces, ont été identifiés dans les huiles essentielles de *C. campestris* du Brésil, de *C. lechleri* de l'Amazonie équatoriale, de *C. flavens* de Guadeloupe (de Almeida *et al*., 2012 ; Rossi *et al.*, 2011 ; Sylvestre *et al.*, 2006) et aussi dans *C. pulegioides* et *C. rhamnifolius* var. *heliotropiifolius* (Neves et da Camara, 2012). Les composés minoritaires (élémicine, (*E*)-isoélémicine, oxyde de méthyle et de thymyle) identifiés dans l'échantillon de *C. kimosorum* ont aussi été signalés chez *C. malambo* et *C. cuneatus* du Venezuela (Suárez *et al*., 2005) et *C. urucurana* (Simionatto *et al.*, 2007). Enfin, le cembrene A, (*C. kimosorum*) a été signalé dans l'huile essentielle de feuilles de *C. sakamaliensis* de Madagascar (Radulovíc *et al.*, 2006). En ce qui concerne l'espèce non identifiée *Croton sp*., la connaissance de la composition chimique de son huile essentielle peut apporter une aide précieuse à la détermination taxonomique.

V. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Plusieurs stratégies de protection ont été développées pour contrôler les infections bactériennes en exploitant les plantes médicinales ainsi que leurs métabolites secondaires. La croissance des bactéries peut être inhibée ou tuée aussi par les extraits de plantes et les huiles essentielles. Pour notre part, des tests antimicrobiens ont été effectuées avec des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation sur différentes parties de *croton kimosorum* (Tableau 23) sur des souches des bactéries pathogènes a gram positif (*bacillus subtilis, staphylococcus aureus*) et a gram négatif (*salmonella typhii*) qui ont été obtenues en clinique sur des patients du département de microbiologie à l'IMRA (Rakotonirina *et al.*, 2010).

Le choix de ces trois souches a été orienté à l'issue d'un test préliminaire par la méthode de diffusion par disque et nous avons retenu uniquement les souches qui ont été sensibles à nos échantillons.

Tableau 23 : Composition chimique de l'huile essentielle des différentes parties de *C. kimosorum*

Date	25/01/2011		
Partie de la plante	Aérienne	Feuilles	Tiges
Composé	%a	%a	%a
α-pinène	2,5	3,0	1,5
sabinène	10,4	24,0	1,8
β-pinène	6,2	9,9	3,0
p-cymène	3,7	1,5	5,1
limonène*	1,5	2,5	1,5
1,8-cinéole*	6,3	10,9	3,4
(*E*)-β-ocimène	1,9	0,6	1,5
linalol	21,7	3,9	33,4
terpinène-4-ol	4,8	2,2	12,9
α-terpinéol	1,4	2,3	1,7
géraniol	4,6	tr	0,2
acétate de géranyle	2,9	0,3	tr
(*E*)-β-caryophyllène	5,9	8,5	1,3
germacrène-D	2,3	3,5	0,9
1,10-di-épi-cubénol	0,2	0,1	0,5
τ-cadinol*	1,3	0,9	3,6
α-épi-bisabolol	1,4	1,6	4,5

V. 1. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles

Delacroix, en 1881, a mis en évidence pour la première fois l'action des huiles essentielles contre les bactéries. Leur spectre d'action est très étendu, car les huiles agissent sur un large éventail de bactéries aussi bien sur les Gram positifs que sur les Gram négatifs ; cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à une autre et d'une souche bactérienne à une autre (Guinoiseau, 2010). Ainsi, des activités antimicrobiennes ont été décrites sur *Mentha piperita* et l'eugénol (Catherine *et al.*, 2012), deux espèces d'*Anthospermum* (*A.emirnense* et *A.perrieri*) originaire de

Madagascar (Ralambonirina *et al.*, 2011), six espèces d'huiles essentielles qui poussent en Iran (Owlia *et al.*, 2009) et *Melaleuca quinquenervia* ou arbre à thé de l'Australie (Cox *et al.*, 2001).

V. 2. Propriétés antimicrobienne et constituants d'huiles essentielles

En général, les activités antimicrobiennes sont principalement expliquées par la présence des composés terpéniques C_{10} et C_{15}, et les phénylpropanoïdes qui sont capables de former des liaisons hydrogènes avec les sites actifs des enzymes cibles, bien que d'autres terpènes actifs, ainsi que des alcools, des aldéhydes et des esters peuvent contribuer à l'effet global antimicrobien des huiles essentielles (Belletti *et al.*, 2004). En effet, dans la littérature, plusieurs travaux de recherche ont prouvé les propriétés antimicrobienne, antifongique, antivirale des terpénoïdes (Reichling *et al.*, 2009). De nombreux articles montrent qu'il existe une relation entre les structures chimiques des composés les plus abondants dans les extraits testés ou les huiles essentielles et l'activité antimicrobienne (Ncube *et al.*, 2012 ; Guedes *et al.*, 2012). Les huiles essentielles peuvent agir seules sur les microorganismes ou en combinaison avec d'autres espèces (Lu *et al.*, 2011).

V.3. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Croton kimosorum

Il existe deux méthodes pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : la méthode de diffusion par disque (Janssen *et al.*, 1986) et la méthode de micro dilution (Eloff, 1988). Cette dernière a été choisie pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (CMB) de nos échantillons en utilisant les microplaques à 96 puits.

V.3.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne par la technique de micro dilution en milieu liquide sur microplaque à 96 puits

La méthode consiste à tester différentes concentrations de l'huile essentielle (HE), obtenue avec différentes parties de la plante de *Croton kimosorum,* émulsionnée avec le Tween 80 qui est un bon émulsionnant (Ramanoelina, 1989), de solution mère 2% pour chaque huile essentielle [18,12µg/ml (d=0,905) pour HE aérienne, 18,10µg/ml (d=0,911) pour HE de feuilles et 18,22µg/ml (d=0,908) pour HE de tiges] avec du Bouillon de Mueller Hinton (BMH). Des suspensions bactériennes de concentration $1x10^6$ CFU/ml diluée à 1/100 avec du BMH ont été aussi préparées pour évaluer l'activité microbienne de HE de *C. Kimosorum*. Les différentes solutions sont distribuées dans les puits de microplaques. Après 24 h d'incubation à 37 °C sur un agitateur, la croissance microbienne est évaluée par la mesure de la turbidité du milieu au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle est obtenu après calculs (voir partie expérimentale).

V.3.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle (2% à 0,63%). Après incubation, l'observation de la gamme de concentration permet de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

V.3.3 Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide

La détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en utilisant la même gamme de concentration pour observer la CMI correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum de bactérie au départ (soit moins de 0,01% de survivants). Elle définit donc l'effet bactéricide d'une huile essentielle testée.

V.3.4 Résultats et discussion

Pour les études de l'activité antimicrobienne, nous avons utilisé le linalol (97% de pureté) et l'antibiotique (chloramphénicol) comme témoins positifs et une huile essentielle de très faible activité comme témoin négatif (tableau 26).

Les huiles essentielles de différentes parties de *Croton kimosorum* exercent une activité antimicrobienne moyenne vis-à-vis de l'ensemble des souches testées. Les bactéries les plus sensibles à l'action de l'huile essentielle des parties aériennes sont les bactéries Gram positif *Bacillus subtilis* (0,57 mg/ml) et *Staphylococcus aureus* (1,13 mg/ml). La bactérie Gram négatif *Salmonella typhii* est la moins sensible aux effets générés par les huiles essentielles (4,53 mg/ml). Les CMI les plus faibles sont toujours obtenues pour l'huile essentielle des parties aériennes. Les HE de tiges (facteur 2) et surtout celle de feuilles (facteur 9) sont nettement moins efficaces. Le linalol est probablement une des molécules responsables de l'activité antimicrobienne si on considère les CMI de ce composé (0,54 mg/ml à 1,08 mg/ml), les CMI de l'HE des parties aériennes (0,57 mg/ml à 4,53 mg/ml) et la teneur en linalol des trois types d'huile essentielle (33,4/21,7/3,9%) (Figure 26).

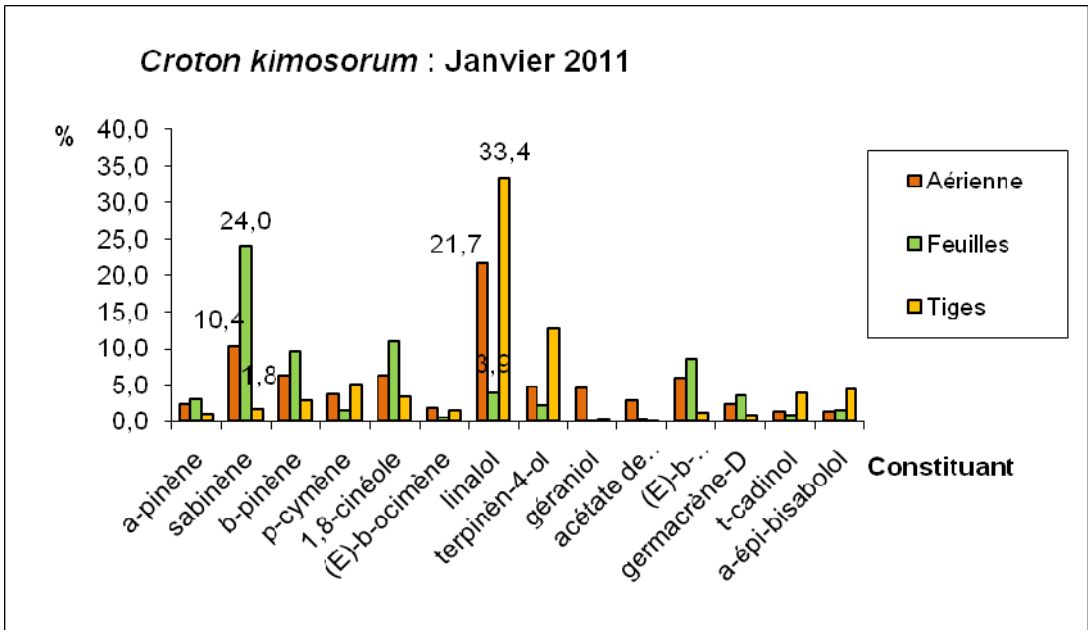


Figure 26 : histogramme montrant les composés majoritaires de *C. kimosorum*

Par ailleurs, des tests antimicrobiens ont été effectués sur le genre *Croton*, *C. stellulifer* (Martins *et al*., 2000) et *C. cajucara* (Alviano *et al.*, 2005) et appliquant la méthode de diffusion d'agar sur disque. Parmi les souches utilisées, *S. aureus* est la plus sensible. Des activités, similaires à celles exercées par l'HE de *C. kimosorum*, ont en effet été décrites pour les HE de *C. urucurana* et *C. heterocalyx*, dont les CMI vis-à-vis de *S. aureus* sont respectivement de 2,5 mg/ml et 2,8 mg/ml (une inhibition de 91,6%), (Simionatto *et al.*, 2007 ; Moreno *et al.*, 2009).

Tableau 24 : CMI et CMB (mg/ml) de l'HE de différentes parties de *Croton kimosorum*

Souche bactérienne	Chlo	Linalol (témoin positif)		HE faible activité (témoin négatif)		*Croton kimosorum*					
						Aérienne		Feuilles		Tiges	
	CMI	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
	mg/ml	mg/ml		mg/ml		mg/ml		mg/ml		mg/ml	
B. subtilis	0,02	0,54	1,07	8,98	17,96	0,57	1,13	4,56	>18,22	1,14	4,54
S. aureus	0,13	0,54	1,08	17,96	17,96	1,13	4,53	4,56	>18,22	2,27	4,54
S. typhii	0.50	1,08	2,16	>17,96	>17,96	4,53	9.05	>18,22	>18,22	4,54	9,08

Chlo : Chloramphénicol.. Concentration Minimale Inhibitrice. Concentration Minimale Bactéricide.

Pour les CMB mesurées à différentes concentrations, les conclusions sont identiques à celles de CMI. Les résultats obtenus sur les trois souches sont récapitulés dans le tableau 26. Les CMB obtenues sur *B. subtilis* et sur *S. aureus* pour l'HE partie aérienne (1,13 mg/ml) et tiges (4,54 mg/ml) sont nettement plus faibles aussi par rapport aux valeurs obtenues avec l'huile essentielle de feuilles (> 18,22 mg/ml pour les trois souches). Encore une fois, les bactéries les plus sensibles à l'action de l'huile essentielle sont les bactéries Gram positif. L'organisation architecturale de la paroi cellulaire des bactéries Gram positif est moins complexe que celle des bactéries Gram négatif ; cette différence structurale les rend plus sensibles à l'action des huiles essentielles (Kalemba et Kunicka, 2003).

Nous pouvons conclure que, pour les trois souches testées, les huiles essentielles des parties aériennes de *Croton kimosorum* présentent une activité antibactérienne modérée probablement liée à la présence en quantité importante du linalol

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Cette thèse a pour principal objectif la contribution à la valorisation des huiles essentielles de plantes de Madagascar et a été réalisée dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université de Corse et l'Université d'Antananarivo. Les études ont été menées pour partie au sein de l'équipe de « Chimie et Biomasse » pour l'identification des molécules présentes dans les huiles essentielles et pour partie dans le département de Génie chimique de l'Ecole Supérieure Polytechnique qui travaille en partenariat avec l'Institut Malgache de Recherches Appliquées pour l'échantillonnage et la préparation des échantillons. Nous souhaitions d'une part, apporter une contribution à la connaissance des richesses en plantes aromatiques et médicinales de la flore malgache et d'autre part, de permettre une meilleure gestion et protection de l'environnement par la valorisation des ressources végétales. Au-delà des résultats scientifiques, cette thèse essaie d'initier une démarche de développement durable en travaillant étroitement avec les paysans-producteurs afin de promouvoir de nouvelles gammes d'huiles essentielles sur le marché de Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) dans le monde et plus particulièrement en France et en Belgique. Dans ce contexte, l'utilisation des techniques chromatographiques (CPG(Ir) et chromatographie sur colonne) associées aux techniques spectroscopiques (SM et RMN-^{13}C), nous a permis de caractériser les huiles essentielles de cinq espèces de plantes de Madagascar.

Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique de la flore et la végétation de Madagascar a été faite en montrant l'origine des plantes aromatiques. Nous avons développé les principales techniques utilisées pour l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles, qui sont considérées comme des mélanges complexes, en insistant, en particulier sur la nécessaire complémentarité entre ces techniques. Par ailleurs, un accent particulier a été mis sur la méthode d'analyse développée par l'équipe de « chimie et biomasse » basée sur l'identification des composés d'un mélange naturel par RMN-^{13}C, sans séparation préalable des constituants. Pour illustrer, nous avons décrit quelques exemples relatifs à l'identification des stéréo-isomères, de constituants qui coéluent en CPG, ou encore de

molécules qui ont des spectres de masse insuffisamment différenciés et/ou des indices de rétention confondus.

Le deuxième chapitre a été consacré à l'étude de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus madagascariensis* ou Ahibero qui pousse à l'état spontané à Madagascar. Nous avons d'abord détaillé l'analyse, sans séparation préalable, par CPG(Ir) et RMN-^{13}C d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes obtenue par hydrodistillation afin d'expliquer notre méthode. Onze constituants ont été identifiés, représentant 86,2% de la composition chimique totale. Tous ces composés sont des monoterpènes dominés par le squelette menthane : *trans*-p-mentha-1,7(8)-dièn-2 ol, *cis*-p-mentha-1,7(8)-dièn-2 ol, *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol et *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol. Seul terpène non oxygéné, le limonène est présent en quantité importante (14,5%). Ensuite, nous avons étudié aussi la composition chimique des huiles essentielles distillées à l'échelle laboratoire et semi-industrielle. Par combinaison des deux techniques habituelles CPG(Ir) et RMN-^{13}C de tous les échantillons et un échantillon par SM (I1), nous avons identifié 20 composés représentant 88,6 à 96,9% de la composition chimique globale. En comparant le profil chromatographique de nos échantillons avec les données bibliographiques et en considérant les cinq composés majoritaires, nous avons observé la similitude du profil de l'huile essentielle de Madagascar avec ceux de *Cymbopogon giganteus* Chiov décrits sur le continent africain. Néanmoins, si la composition chimique de l'huile essentielle se rapproche beaucoup de celle de Côte d'Ivoire, nous avons identifié les hydropéroxydes dérivés des alcools menthaniques majoritaires. L'étude de différents paramètres (durée de la récolte, type de distillation, mode de stockage) montre que ces hydropéroxydes sont toujours présents, dans les huiles essentielles mais leur teneur semble liée au procédé d'extraction puisqu'ils sont obtenus en plus faibles quantités par l'entraînement à la vapeur d'eau.

Dans le troisième chapitre, il s'agissait de caractériser les compositions chimiques de *Tana bojeriana* Baker et *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Perrier.

- La composition chimique de l'huile essentielle de *Tana bojeriana* est décrite pour la première fois. L'analyse, réalisée par combinaison de RMN-^{13}C, CPG(Ir) et CPG-SM, a montré que l'huile essentielle des plantes cueillies à différents stades végétatifs est riche en monoterpènes oléfiniques. Son huile essentielle est caractérisée par la présence majoritaire de l'α-phellandrène, du limonène, de la carvone et du dill éther. En comparant avec les études précédemment décrites dans la littérature pour des espèces de la même famille (Apiaceae), la composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce, endémique de Madagascar, se rapproche de celles décrites pour *Anethum graveolens*. Cependant, la présence du *trans*-p-menth-2-ène-1,6-diol et p-mentha-1(7),2-dièn-6-ol identifiés par RMN-^{13}C, confère à cette huile essentielle une certaine originalité.

L'huile essentielle de *Vepris madagascarica* est caractérisée par une forte teneur en monoterpènes oxygénés majoritairement représentés par le *(E)* -anéthole et l'estragole. L'analyse de nos échantillons par RMN-^{13}C, CPG(Ir) et CPG-SM a permis d'identifier au total 21 composés qui représentent 98,2% de la composition globale. Les compositions chimiques des huiles essentielles de feuilles et d'écorce de tronc sont assez voisines. Compte tenu de la répartition restreinte de cette plante aromatique, nous privilégions l'huile essentielle de feuilles par rapport à celle d'écorce de tronc afin de pouvoir préserver cette plante et par la même la biodiversité.

Le dernier chapitre a été consacré à l'étude des huiles essentielles (étudiées pour la première fois) de *Croton kimosorum* et *Croton* sp. L'analyse de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Croton kimosorum* ou Zanapoly a permis d'identifier par RMN-^{13}C, CPG(Ir) et CPG-SM, 79 constituants, représentant 97,6 % de sa composition chimique. Cette huile essentielle est très riche en monoterpènes oxygénés. Elle est dominée par le linalol, suivi du 1,8-cinéole, du terpinen-4-ol et du géraniol. Le sabinène, le β-pinène, et le (*E*)-β-caryophyllène ont été aussi identifiés parmi les composés majoritaires. Nous avons aussi identifié des sesquiterpéniques oxygénés à des teneurs non négligeables (le τ-cadinol et l'épi-α-bisabolol).

Pour l'huile essentielle de la partie aérienne de *Croton* sp. ou Andriambolamena, l'analyse détaillée d'un échantillon a permis d'identifier 68 constituants, représentant 96,9% de sa composition chimique globale. Cette huile est très riche en monoterpènes hydrocarbonés avec le limonène et le β-pinène prépondérants. Les trois autres composés quantitativement importants sont le 1,8-cinéole, le (*E*)-β-caryophyllène et le linalol. Nous avons aussi identifié une vingtaine de sesquiterpènes oxygénés qui présentent des pourcentages inférieurs à 1% à l'exception de l'épi-α-bisabolol (2,6%).

Les huiles essentielles de Croton étudiées sont caractérisées par la présence à des teneurs plus ou moins importantes de cinq constituants : le linalol, le sabinène, le limonène, le β-pinène et le 1,8-cinéole. Par ailleurs, nous avons constaté également la présence d'un certain nombre de molécules absentes dans les quatre espèces originaires de Madagascar qui ont été décrites dans la littérature (α-bisabolol et épi-α-bisabolol, (*Z*)- et (*E*)-β-ocimène, *cis*- et *trans*-hydrate de sabinène, (*E*)-β-farnésène et 1,10-di-épi-cubénol). Ces composés confirment l'existence d'une variabilité chimique intra spécifique pour le genre *Croton* qui pousse à l'état spontané à Madagascar.

A notre connaissance, la présence de l'épi-α-bisabolol dans les huiles de Croton n'a jamais été signalée. L'utilisation de la méthode basée sur la RMN du carbone-13, développée par l'Université de Corse, nous a permis d'identifier sans ambiguïté cette molécule dans les deux espèces de *Croton,* qui peut facilement être confondue avec son épimère, l'α-bisabolol qui présentent un spectre de masse et des indices de rétention sur colonne polaire et apolaire très proches.

Nous nous sommes également intéressés à l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de différentes parties de *Croton kimosorum* (feuilles, tiges et parties aériennes). Ainsi, les huiles essentielles de différentes parties de Zanapoly exercent une activité antimicrobienne contre toutes les souches testées, mais les bactéries Gram positifs sont les plus sensibles. Nos résultats ont montré que le linalol semble être une des molécules responsable de l'activité antimicrobienne.

En conclusion, l'objectif initialement fixé de caractériser cinq plantes de Madagascar par la composition chimique de leur huiles essentielles a été atteint avec une analyse préalable des échantillons réalisée à Madagascar et quatre stages au sein de l'équipe Chimie et Biomasse de l'Université de Corse qui m'ont permis d'utiliser un parc analytique performant et parfaitement adapté au sujet.

D'un point de vue académique, nos travaux ont contribué au développement de la méthode d'identification des constituants des huiles essentielles basée sur la RMN-^{13}C par l'enrichissement de la bibliothèque de spectres « terpènes » du laboratoire.

Du point de vue du développement et de la valorisation, nos travaux ont permis d'avoir une meilleure connaissance des plantes aromatiques et médicinales poussant à l'état spontané à Madagascar par l'identification des composés volatils produits par ces plantes. L'ensemble du travail réalisé doit aussi contribuer à la promotion de nouvelles gammes d'huiles essentielles sur le marché international, tout en respectant l'environnement et en assurant une gestion rationnelle de l'exploitation des ressources. Nous avons choisi de sensibiliser les populations qui se trouvent au voisinage des stations de collecte afin de protéger et de gérer durablement ces ressources végétales dont la commercialisation pourrait conduire à un complément d'activité. Nous établirons des monographies des huiles essentielles pour combler les lacunes documentaires sur ces plantes aromatiques

Nous envisageons aussi d'élargir notre étude sur le genre *Croton* et sur d'autres espèces endémiques de Madagascar et de réaliser des tests biologiques et pharmacologiques.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION

L'extraction des huiles essentielle peut être assimilée à une distillation qui est un procédé de séparation basé sur un équilibre L (liquide) ⇌ V (vapeur) aussi appelé équilibre binaire. Par chauffage, le liquide va entrer en ébullition et la phase vapeur se mettra en équilibre avec le liquide. Par un système de vaporisation/condensation et au fur et à mesure que l'on monte dans la colonne, la vapeur sera de plus en plu riche en constituants les plus volatils. Deux techniques d'extraction ont été utilisées : l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau.

I.1. Extraction par hydrodistillation d'huile essentielle.

L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (avec ou sans traitement mécanique préalable) dans un réacteur rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs qui constituent un équilibre hétérogène (eau et composés organiques) sont condensées sur une surface froide (condensateur) et l'huile essentielle se sépare par différence de densité dans un essencier de la phase aqueuse ou hydrolat (Figure 25). On récupère l'huile essentielle généralement moins dense que l'eau, composée de molécules peu solubles dans l'eau. La distillation s'effectue avec recyclage d'eau (cohobation).

Les cinq huiles essentielles (*Cymbopogon giganteus madagascariensis, Tana bojeriana, Vepris madagascarica, Croton kimosorum* et *Croton* sp.*)* ont été préparées au laboratoire par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger (ballon de 2 L) jusqu'à extraction totale de l'huile essentielle (trois heures en moyenne) à partir d'une masse de végétal. Le rendement a été calculé par rapport à la masse en végétal frais sauf pour *Vepris madagascarica*. Les lots d'huile essentielle sont conservés dans des piluliers à 4°C à l'abri de la lumière (verre ambré).

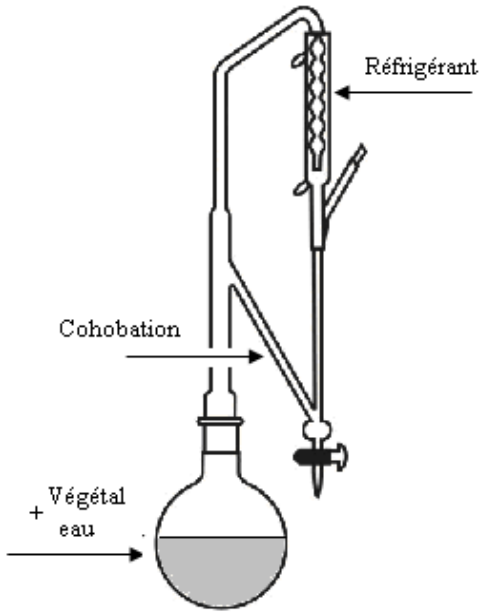


Figure 27 : Schéma d'un appareil d'hydrodistillation de type Clevenger

I.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau d'huile essentielle

L'extraction par entraînement à la vapeur d'eau consiste à soumettre le matériel végétal à l'action d'un courant de vapeur ascendant car l'injection de la vapeur se fait à la base de l'extracteur (alambic). Les vapeurs contenant les composés volatils sont condensées, puis les liquides (distillat + huile essentielle) sont décantés dans un vase florentin.

Les cinq plantes (*Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis, Tana bojeriana, Vepris madagascarica, Croton kimosorum* et *Croton* sp.*)* ont été distillées sur le site de collecte par entraînement à la vapeur d'eau avec un alambic fabriqué en acier inoxydable d'une capacité de 1500 L pendant une durée de trois heures (Figure 26). Les rendements sont calculés aussi par rapport à la masse en végétal frais ou fané. Les huiles essentielles obtenues sont conservées dans des piluliers à 4°C à l'abri de la lumière (verre ambré). Au niveau du laboratoire, nous avons aussi utilisé un montage avec un autocuiseur et un essencier pour réaliser l'entrainement à la vapeur (Figure 27).

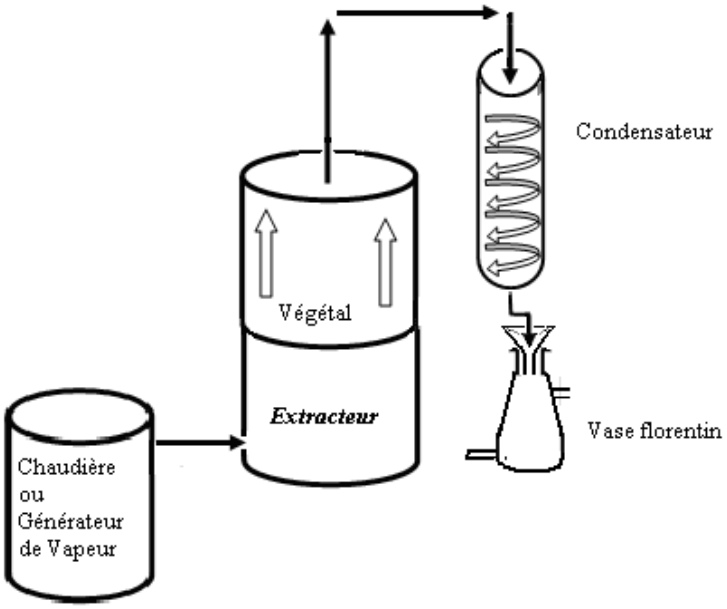


Figure 28 : Schéma de l'appareillage d'entrainement à la vapeur « semi-industriel »



Figure 29 : Autocuiseur adapté pour extraire l'huile essentielle par entrainement à la vapeur (cliché de l'auteur)

II. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTROSCOPIQUES

II.1 Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Toutes les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées en utilisant un appareil Perkin-Elmer Clarus 500, équipé d'un injecteur automatique, de deux colonnes (50 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 µm), apolaire BP-1 (phase stationnaire polyméthylsiloxane) et polaire BP-20 (phase stationnaire polyéthylène glycol) et de deux détecteurs à ionisation de flamme (DIF). Les conditions opératoires sont les suivantes : gaz vecteur, hélium ; pression en tête de colonne : 20 psi ; température de l'injecteur et des détecteurs : 250°C ; programmation de température : de 60°C à 220°C (80 min) à raison de 2°C/min, avec un palier de 20 min à 220°C ; injection : mode diviseur avec un rapport 1/60. Le volume d'échantillon injecté est de 0,5 µl issue d'une solution contenant 50 µL de mélange (huile essentielle ou fraction de chromatographie) dans 350 µL de CCl_4.

II.2 Analyse par CPG couplé avec Spectromètre de Masse (CPG-SM)

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et d'une colonne apolaire Rtx-1 (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 µm), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium (1ml/mn) et la pression en tête de colonne est de 25 psi. La température de la chambre d'injection est de 250°C et celle du détecteur 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60°C à 230 °C, à raison de 2 °C/min, puis suivi d'un palier de 45 min à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'échantillon injectée est de 0,2 µl. La détection se fait par un analyseur quadripôle. Les molécules sont généralement bombardées par un faisceau électronique de 70 eV. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

II.3 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Brücker 400 AVANCE, 9,4 Tesla, opérant à 400,132 MHz pour le proton et à 100,623 MHz pour le carbone-13. Les spectres ont été enregistrés avec une sonde de 5 mm. Le solvant est le $CDCl_3$ additionné de tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne.

Les spectres du ^{13}C ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion : 4μs (45°); temps de répétition = 2,7 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 24000 Hz (environ 240 ppm) ; délai de relaxation D_1 = 0,1 s ; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Pour l'enregistrement des spectres des huiles essentielles (ou fraction de chromatographie), une masse de 30 à 60 mg d'huile essentielle ou de 9 à 50 mg de fraction chromatographie est dissoute dans 0,5ml de $CDCl_3$. Le nombre d'accumulation est compris entre 2000 et 5000 pour chaque enregistrement. Les données du signal (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourrier par une fonction exponentielle (LB = 1,0 Hz).

Les paramètres suivants ont été utilisés pour les séquences DEPT (sonde de 5 mm) avec diverses durées d'impulsion = 4,0 μs (angle d'impulsion 45°), 90 (8,0 μs), et 135° (12,0 μs).

III. TECHNIQUES DE SEPARATION

Chromatographie sur colonne de silice

Tana bojeriana. La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice (ICN 200-500 μm, 60 Å, 20 g) sur 513 mg d'huile essentielle. Quatre fractions sont éluées, les deux premières fractions nommées « hydrocarbonée » F1 (80 mg) et F2 (127 mg) avec du pentane (100%), la troisième fraction F3 (231 mg) avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (90/10) et la quatrième fraction F4 (34 mg) nommée « oxygénée » avec l'oxyde de diéthyle.

***Vepris madagascarica*.** La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice (ICN 200-500 μm, 60 Å, 35 g) sur 2,0 g d'huile essentielle. Deux fractions sont éluées, la première fraction hydrocarbonée F1 (1,85 g) au pentane et une deuxième fraction oxygénée F2 (0,095 g) à l'oxyde de diéthyle.

***Croton kimosorum*.** La chromatographie sur colonne de silice sur colonne ouverte de type «flash» a été réalisée avec de la silice (ICN 63-200 μm, 60 Å, 35g) sur 1g d'huile essentielle. Quatre fractions sont éluées (une hydrocarbonée et trois oxygénées) : F1 : 359 mg ; F2 : 95 mg ; F3 : 266 mg et F4 : 190 mg avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (100/0, 95/5, 90/10 et 0/100 ; v/v).

***Croton* sp.** La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice (ICN 63-200 μm, 60 Å, 35g) sur 1g d'huile essentielle. Quatre fractions sont éluées (une hydrocarbonée et trois oxygénées) : F1 580 mg ; F2 96 mg ; F3 159 mg et F4 140 mg avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (100/0 à 0/100 ; v/v).

IV. QUANTIFICATION PAR CPG METTANT EN ŒUVRE LES FACTEURS DE REPONSE (FR)

La quantification par CPG mettant en œuvre les facteurs de réponse a été déterminée en appliquant la méthode développée par Costa *et al* (2008). La méthode consiste à introduire une référence interne (nonane) dans une masse d'huile essentielle déterminée et les injecter dans le CPG après avoir dilué le mélange dans un volume de solvant bien déterminé. Les aires du nonane et de chaque composé ont été mesurées sur colonne apolaire. Chaque masse du composé a été calculée en utilisant les valeurs moyennes de Facteur de Réponse (FR) d'oléfines monoterpéniques (1,03±0,01) et sesquiterpéniques (0,98 ± 0,03), de cétones (1,30 ± 0,03), d'alcools, (1,30 ± 0,02), d'aldéhyde (1,30 ± 0,02) et d'acétates (1,59 ± 0,02).

La masse de chaque constituant du mélange a été calculée selon la formule suivante :

$$m_C = \frac{A_C \times m_N \times FR}{A_N \times m_{HE}} \times 100$$

Avec :

- m_C : masse calculée du composé, exprimée en g/100g
- A_C : aire du composé sélectionné
- m_N : masse pesée (mg) de nonane (référence interne)
- FR : facteur de réponse
- A_N : aire du nonane
- m_{HE} : masse (mg) de l'huile essentielle

Les huiles essentielles des parties aériennes de *Croton kimosorum* (51,2 mg) et *Croton sp* (46,4 mg) ont été mélangées chacune avec le nonane (5,12 mg) dans 500 µl de CCl_4. Chaque mélange a été injecté dans le CPG en considérant les aires obtenues sur colonne apolaire avec les conditions opératoires habituelles.

V. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

La détermination de l'activité antimicrobienne a été effectuée en évaluant la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (CMB) par la méthode de micro dilution en utilisant les microplaques à 96 puits sur l'huile essentielle de *Croton kimosorum* (parties aériennes, feuilles, tiges).

Par définition, la CMI est la plus faible concentration en antibiotique (ou huile essentielle) qui est capable d'inhiber complètement la croissance visible des cultures bactériennes. Quant à la CMB, elle consiste à déterminer la plus faible concentration en agent qui a le pouvoir bactéricide capable d'entraîner la mort d'au moins 99,99% des bactéries d'un inoculum (< 0,01% de survivants).

La méthode consiste à tester différentes concentrations de l'huile essentielle, obtenues avec différentes parties de la plante de *Croton kimosorum,* émulsionnée avec le Tween 80, de solution mère 2% (19µg/ml) avec du Bouillon de Mueller Hinton (BMH). Des suspensions bactériennes, souches sauvages de laboratoire de microbiologie de l'IMRA, de gram + (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*) et gram – (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*) de concentration $1x10^6$ CFU/ml diluée à 1/100 avec du BMH ont aussi été préparées pour évaluer l'activité microbienne de Zanapoly. Les différentes solutions sont distribuées dans les puits de microplaques :

- 190µl de milieu MHB avec huile essentielle de différentes concentrations dans les puits pour blanc huile (BH), et les puits tests (T)
- 190µl de MHB avec Tween 80 stérile à 0,1% dans les puits blanc solvant (BS) et témoin souche (S)
- 10µl de MHB stérile dans les puits BS et BH
- 10µl de suspension microbienne dans les puits S et T

Soit :

- BS (blanc solvant) : 190µl de MHB avec 0,1% Tween 80 + 10µl MHB stérile
- BH (blanc huile) : 190µl de MHB avec huile essentielle de différentes concentrations + 10µl MHB stérile
- T (puits tests) : 190µl de MHB avec huile essentielle de différentes concentrations + 10µl suspension microbienne à $1x10^6$ CFU/ml
- S (témoin souche) : 190µl de MHB avec 0,1% Tween 80 + 10µl suspension microbienne à 10^6 CFU/ml

Après 24h d'incubation à 37°C sur un agitateur, la croissance microbienne est évaluée par la mesure de la turbidité du milieu au spectrophotomètre (figure 28) à une longueur d'onde de 630 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle est obtenu en appliquant les formules suivantes :

- DO réelle de la croissance souche = DO "S" - DO "BS"
- DO réelle dans les puits tests = DO "Puits tests" - DO "BH"

$$\%\ \text{d' inhibition} = 100 - \left(100 \times \frac{\text{DO réelle dans les puits}}{\text{DO réelle de la croissance souche}}\right)$$



Figure 30 : Lecteur de plaque ou spectrophotomètre (cliché de l'auteur)

.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

Adams R.P. 1989. Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press: San Diego, 780 p.

Adams R.P. 2001. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography /Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL.

Adio A.M, Paul C., Kloth P., Konig W.A. 2004. Sesquiterpenes of the liverwort *Scapania undulate*. Phytochem. 65: 199-206.

Adjanohoun E.J., Aké A.L., Floret J.J., Guinko S., Koumaré M., Ahyi A.M., Raynal J. 1979. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. 2ème Ed. ACCT, Paris.

Adjanohoun E.J., Aké A.L.. 1979. Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire, Centre National de Floristique, Abidjan, p 142.

Adjanohoun E.J., Aké A.L. 1985. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. 5ème Ed. ACCT, Paris.

AFNOR-CD-ROM, 2007

Afoulous S., Ferhout H., Raoelison G., Valentin A., Moukarzel B., Couderc F., Bouajila J. 2011. *Helichrysum gymnocephalum* essential oil: chemical composition and cytotoxic, antimalarial and antioxidant activities, attribution of the activity origin by correlations. Molecules 16: 8273-8291.

Agnaniet H., Akagah A., Mounzéo H., Menut C., J.-M. Bessière JM. 2005. Aromatic Plants of tropical Central Africa. XLI. Volatile Constituents of *Croton ligandrum* Pierre ex Hutch Growing in Gabon. J. Essen. Oil Res.17: 201-203

Ahmed A.A., Mahmoud A.A. 1997. Carvotacetone Derivatives from the Egyptian Plant *Sphaeranthus suaveolens*. Phytochem. 45(3): 533-535.

Akgül A., Bayrak A. 1988. Comparative volatile oil composition of various parts from Turkish bitter fennel (*Fœniculum vulgare* var. *vulgare*). Food chem. 30(4): 319-324.

Alitonou G.A., Avlessi F., Sohounhloue D.K., Agnaniet H., Bessiere J.-M., Menut C. 2006. Investigations on the essential oil from *Cymbopogon giganteus* from Benin for its potential use as an anti-inflammatory agent. The International J. of Aromatherapy. 16: 37-41.

Alvioano W.S., Mendonça-filho R.R., Alviano D.S., Bizzo H.R., Sounto-Padrón, Rodriguez M.L., Bolognese A.M., Alviano C.S., Souza M.M.G. 2005. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Microbiol. Immuno. 20: 101-105.

Amin W.M.A., Sleem A.A. 2007. Chemical and biochemical study of aerial parts of Dill (*Anethum graveolens* L.). Egypt. J. Biomed. Sci. 23(1): 73-90.

Andrianoelisoa H.S., Menut C., De Chatelperron P.C., Saracco J., Ramanoelina P., Danthu P. 2006. Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oils from *Ravensara aromatica* Sonnerat, a tree endemic to Madagascar. Flavour Fragr. J. 21: 833-838.

Andrianoelisoa H.S. Etude de la variabilite des huiles essentielles de *Ravensara aromatica* sonnerat. Prescription pour une gestion durable de cette espece endemique malgache. Thèse de doctorat : chimie : Université de Montpellier 2 : 2008.

Arnold H.J., Gulumian M. 1984. Pharmacopoeia of traditional medicine in Venda. J. Ethnopharm. 12: 35–74.

Athikomkulchai S., Prawat H., Thasana N., Ruangrungsi N., Ruchirawat S. 2006. COX-1, COX-2 inhibitors and antifungal agents from *Croton hutchinsonianus*. Chem. Pharm. Bull. 54(2): 262-264.

Aubreville A. 1977. Confirmations et conséquences de la théorie d'une origine polytopique des Angiospermes, Adansonia, sér. 2, 16 : 205-210.

Aubreville A. 1975. Essais sur l'origine et historique des flores tropicales africaines. Application de la théorie des origines polypotiques des Angiospermes tropicaux. Adansonia, sér. 2, 15(1) : 31-56.

Ayedoun M.A., Moudachirou M., Lamaty G. 1997. Composition chimique des huiles essentielles de deux espèces de *Cymbopogon* du Bénin exploitable industriellement, Bulletin africain, « Bioressources. Energie. Développement. Environnement ». 8 : 4-6.

Azevedo M.M.B., Pereira A.Q., Chaves F.C.M., Bizzo H.R., Alviano C.S., Alviano D.S. 2012. Antimicrobial activity of the essential oils from the leaves of two morphotypes of *Croton cajucara* Benth. J. Essent. Oil Res. 24: 351–357.

Baker J.G. 1890. *Peucedanum bojerianum* Baker, J. Linn. Soc. Bot. 25: 319p.

Baron R. 1889-1890. The flora of Madagascar. J. Linn. Soc.. 25, London: 246-294.

Bastian G. 1967. Madagascar, étude géographique et économique. Nathan : Paris.

Bekhechi C., Atik B.F., Consiglio D., Bighelli A., Tomi F. 2012. Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. Chem. Biod. 9: 2742-2753.

Belay G., Tariku Y., Kebede T., Hymete A., Mekonnen Y. 2011. Ethnopharmacological investigations of essential oils isolated from five Ethiopian medicinal plants against eleven pathogenic bacterial strains. Phytopharmacology. 1(5): 133-143.

Belletti N., Ndagihimana M., Sisto C., Guerzoni M.E., Lanciotti R., Gardini F. 2004. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. J. Agric. Food Chem. 52: 6932-6938. In: Maridass M. 2010. Antimicrobial activity of essential oils of Aromatic plants from South India. International J. Adv. in Pharm. Sciences 1: 176-180.

Bello A. Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle chez les Guizica, au Cameroun. Thèse de Pharmacie n°14 : Université de Dakar : Sénégal : 1984.

Bicchi C., Liberto E., Matteodo M., Sgorbini B., Mondello L., d'Acompara Zellner B., Costa R., Rubiolo P. 2008. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. Flavour Fragr. J. 23: 382-391.

Bighelli A., Casanova J. 2009 Analytical methods for Cymbopogon oils. In: Essential Oil Bearing Grasses, The genus *Cymbopogon*. Ed. Akhila A., CRC Press, Taylor & Francis group, London,. pp. 195-221.

Billet D., Favre-Bonvin J. 1973. Constituants de l'huile essentielle de *Vepris madagascarica*. Phytochem. 12: 1194.

Block S., Bacelli C., Tinant B., Meervelt L.V., Rozenberg R., Jiwan J.L.H., Llabrès G., De Pauw-Gillet M.C., Quetin-Leclercq J. 2004. Diterpens from the leaves of *Croton zambesicus*. Phytochem. 65: 1165-1171.

Block S., Stévigny C., De Pauw-Gillet M.C., De Hoffmann E., Llabrés G., Adjakidjé V., Quetin-Leclercq J. 2002. ent Trachyloban-3□-ol, a New Cytotoxic Diterpene from *Croton zambesicus*. Planta medica 68: 647-649.

Boiteau P., Allorge-Boiteau L. 1993. Plantes médicinales de Madagascar. KARTHALA Paris.

Bor N.L. 1955. The genus *Cymbopogon* in India, Burma et Ceylon, J. Bombay Nat. Hist. Soc. 51: 890-916.

Bosser J. 1969. Graminées des pâturages et des cultures à Madagascar. Orstom. Paris.

Boti J.B., Muselli A., Tomi F., Koukoua G., N'Guessan Y.T., Costa J., Casanova J. 2006. Combined Analysis of *Cymbopogon giganteus* Chiov. Leaf Oil from Ivory Coast by GC(RI), GC/MS and 13C-NMR. C R Chimie 9: 164-168.

Boti J.B. Contribution à la caractérisation de plantes aromatiques de Côte d'Ivoire et de Corse. Apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'huiles essentielles et d'un extrait. Thèse de doctorat : chimie : Université de Corse : 2004.

Bouchet P., Valisoalalao J. 1989. Etude des huiles essentielles de deux arbres des côtes malgaches: *Hernandia voyroni* (hazomalany) *Vepris elliotii* (Angety). Bull. Acad. Malgache 67: 197–212.

Bouzabata A., Bighelli A., Castola V., Abed L., Casanova J., Bighelli A., Tomi F. 2013, Chemical Variability of Algerian *Myrtus Communis*. Chem. Biod.: sous press.

Brasil D.S., Muller A.H., Guilhon M.S.P., Alves C.N., Andrade E.H.A., da Silva J.K.R., Maia J.G.S. 2009. Essential Oil Composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. J. Braz. Chem. Soc. 20(6): 1188-1192.

Bruneton J. 1993. Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales (2e édition). Tec et Doc., Lavoisier, Paris, 915 p.

Callan N.W., Johnson D.L., Westcott M.P., Welty L.E. 2007. Herbal and oil composition of Dill (*Anethum graveolens* L.): effects of crop maturity and plant density. Indu. Crops Prod. 25: 282-287.

Campos A.R., Albuquerque F.A.A., Rao V.S.N., Maciel M.A.M., Pinto A.C. 2002. Investigation on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajura* leaves in mice. Fitoterapia 73: 117-120.

Carlin L., Vaisberg A.J., Hammond G.B. 1996. Isolation of sinoacutine from leaves of *Croton lechleri* Bull. Planta medica 39:1041

Carteau D. Photochimie du trans-anéthole. Thèse de doctorat : Chimie : Université de Bordeaux I : 2006.

Castola V., Mazzoni V., Corticchiato M., Bighelli A., Casanova J. 1997. Hydrogen-bonding effet on carbon-13 NMR chemical shifts of naturally occurring phenols. Canadian J. Anal. Sci. Spectro. 42: 90-94.

Catalán C.A.N, de Heluani C.S., Kotowicz C., Gedris T.E., Herz W. 2003. A linear sesterterpene, two squalen derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. Phytochem. 64: 625-629.

Catherine A.A., Deepika H., Negi P.S. 2012. Antimicrobial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. J. essent. Oil. Res. 24: 481-486.

Cavalli J.F., Ranarivelo L., Ratsimbason M., Bernadini A.F., Casanova J. 2001. Constituents of the essential oil of six *Helichrysum species* from Madagascar. Flavour Fragr. J. 16: 253-256.

Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.F., Casanova J. 2003. Composition and chemical variability of the bark oil of *Cedrelopsis greveï* H. Baillon from Madagascar. Flavour Fragr. J. 18: 532-538.

Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.F., Casanova J. 2004a. Dihydroagarofurans: the fourth isomer isolated from *Cedrelopsis grevei* bark oil. Magn. Reson. Chem. 42: 709-711.

Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.F., Casanova J. 2004b. Combined analysis of *Chenopodium ambrosioides* essential oil by GC, GC-MS and 13C-NMR spectroscopy. Quantitative determination of Ascaridole, a heat-sensitive compound. Phytochem. Anal. 15: 275-279.

Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.F., Casanova J. 2006. Chemical variability of the essential oil of *Helichrysum faradifani* Sc. Ell. From Madagascar. Flavour Fragr. J. 21: 111-114.

Cavalli J.F.. Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat : Chimie : Université de Corse : 2002.

Cazaussus A., Pes R., Sellier N., Tabet J.C. 1988. GC-MS and GC-MS-MS analysis of a complex essential oil. Chromatographia 25: 865-869.

Charris J., Dominguez J.D.R. 2000. (-)-Amuronine from the leaves of *Croton flavens* (Euphorbiaceae). Biochem. Syst. Ecol. 28(8): 795-797.

Chaturvedula V.S., Schilling J.K., Miller J.S., Andriantsiferana R., Rasamison V.E., Kingston D.G. 2003. New cytotoxic alkaloids from the wood of *Vepris punctata* from the Madagascan rainforest. J. Nat. Prod. 66: 532–534.

Cheplogoi P.K., Mulholland D.A., Coombes P.H., Randrianarivelojosoa M. 2008. An azole, an amide and a limonoid from *Vepris uguenensis* (Rutaceae). Phytochem. 69: 1384-1388.

Chericoni S., Flamini G., Campeol E., Cioni P.L., Morelli I. 2004. GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. Biochem. Syst. Ecol. 32: 423-429.

Chhabra S.C., Mahunnah R.L., Mshiu E.N. 1991. Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. V. Angiosperms (Passifloraceae to Sapindaceae). J Ethnopharm. 33: 143–157.

Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totté J., Pieters L., Vlietinck A.J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, J. Ethnopharm. 79: 213-220.

Claridge T.D.W. 1999. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Tetrahedron Organic Chem. Series volume 19, Elsevier, Oxford.

Coleman W.M., Lawrence B.M. 1997. A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil. Flavour Fragr. J. 12: 1-8.

Compagne R.S., Chavez K., Mateu E., Orsini G., Arvelo F., Suárez A.I. 2010. Composition and Cytotoxic Activity of Essential Oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. Rec. Nat. Prod. 4(2): 101-108.

Cornet A, Guillaumet J. 1976. Divisions floristiques et étages de végétations à Madagascar. Cah. Orstom. Sér. Biol., XI(1) : 35-40.

Cornet A. 1974. Essai cartographique bioclimatique à Madagascar. ORSTOM, carte à 1 /2 000 000 et notice 55.

Corticchiato M., Casanova J. 1992. Analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13 : application aux huiles essentielles, Analusis 20: 51-58.

Costa R., Zellner B.d'A., Crupi M.L., De Fina M.R., Valentino M.R., Dugo P., Dugo G., Mondello L. 2008. GC-MS, GC-O and enantio-GC investigation of the essential oil of *Tarchonanthus camphoratus* L. Flavour Fragr. J. 23: 40-48.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Gustafson J.E., Warmington J.R. 2001. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree oil. Molecules 6: 87-91.

Craveiro A.A., Rodriguez A.S., Andrade C.H.S., Matos F.J.A., Alencar J.W., Machado MIL. 1981. Volatile constituents of Brazilian Euphorbiaceae genus *Croton*. J. Nat. Prod. 44(5): 602-608.

Dalbó S., Jürgensen S., Horst H., Ruzza Â.A., Soethe D.N., Santos A.R.S., Pizzolatti M.G., Ribeiro-do-Valle R.M. 2005. Anti, ociceptive effect proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* Bark. J. Pharm. Pharm. 57: 765-771.

Dallüge J, Beens J., Brinkman U.A.T. 2003. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. J. Chromatogr. A 1000: 69-108.

de Almeida T.S., Rocha J.B.T., Rodriguez F.F.G., Campos A.R., da Costa J.G.M. 2012. Chemical composition, antimicrobial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. Indu. Crops and Prod. in Press, Corrected Proof.

de Lima S.G., Citó A.M.G., Lopes J.A.D., Neto J.M.M., Chaves M.H., Silveira R. 2010. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: C. adenocalyx Baill-Euphorbiaceae. Rev. Latinoamer. Quim. 38(3): 133-144.

de Lima S.G., Medeiros L.B.P., Cunha C.N.L., da Silva D., de Andrade N.C., Neto J.M.M., Lopes J.A.D., Steffen R.A., Araújo B.Q., Reis F.de A.M. 2012. Chemical composition of essential oils of *Croton hirtus* L'Her from Piauí (Brasil). J. Essent. Oil. Res. 24: 371-376.

Decary R. 1955. Quelques plantes aromatiques et à parfum de la flore de Madagascar.

Decouzon M., Geribaldi S., Rouillard M., Sturla J.M. 1990. A new look at the spectroscopic properties of dihydrocarveol stereoisomers. Flavour Fagr. J. 5: 147-152.

Dejardin J.J.L., Guillaumet, Mangenot. 1973. Contribution à la connaissance de l'élément non endémique de la flore malgache (végétaux vasculaires). Candollea, 28: 325-391.

Dembelé I. Le tradipraticien et les soins de santé primaires. Thèse de Doctorat d'Etat en médecine à la faculté de médecine d'Abidjan : Université de Cocody : Côte d'Ivoire : 1988.

Descheemaeker A. 1986. Ravi-maintso. 6ème édition, Artigraf MAR, Castelnuevo: Italie.

Eloff J.N. 1988. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica 64: 711-713.

Emberger L. 1945. Une classification biogéographique des climats, Recueil des travaux des laboratoires de botanique, de géologie et zoologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Montpellier. Botanique 7: 3-43.

Emberger L. 1971. Considérations complémentaires au sujet de recherches bioclimatiques et phytogéographiques – écologiques. Travaux de Botanique et d'Ecologie, Paris : 291-301.

Fatope M.O., Marwah R.G., Al Hadhrami N.M., Onifade A.K., Williams J.R. 2008. Identification of the chemotypes of *Ocimum forskolei* and *Ocimum basilicum* by NMR spectroscopy. Chem. Biod. 5: 2457-2463.

Fekam F.B., Keumedjio F., Jazet P.M., Ngadjui B.T., Amvam P.H., Menut C, Bessiere JM. 2002. Essential oils from *Croton zambezicus* Muell. Arg. Growing in Cameroon. Flavour Fragr. J. 17(3): 215-217.

Ferreira M.J.P., Costantin M.B., Sartorelli P., Rodrigues G.V., Limberger R., Henriques A.T., Kato M.J., Emerenciano V.P. 2001. Computer-aided method for identification of components in essential oils by 13C NMR spectroscopy. Anal. Chim. Acta 447: 125-134.

Formácek V., Kubeczka K.H. 1982c. Quantitative analyse ätherischer öle Mittels ^{13}C-NMR spekroskopie in aetherische öle. Kubeczka KH, Ed. Thieme, Stuttgart, 42-53.

Formácek V., Kubeczka K.H. 1982a. Essential oils analysis by capillary gaschromatography and carbon-13 NMR spectroscopy, John Wiley & Sons: Chichester.

Formácek V., Kubeczka K.H. 1982b. 13C NMR analysis of essential oils, in aromatic plants: basic and applied aspects. Margaris N, Koedam A, Vokou D. Eds., Martinus Nijhoff Publishers: La Haye, 177-181.

Fortin D., Lo M., Maynart G. 1990. Plantes médicinales du Sahel, CECI/ENDA.

Franco M.S., Cordero C.P., Morantes S.J., Aristizabal F., Osorio C. 2011. Cytotoxic labdane diterpenoides isolated from the hexane fraction of the *Croton stipuliformis* stem bark. Vitae, revista de la Facultad de Quimica Farmacéutica 18: 173-182.

Gattefosse J. 1921. Les végétaux aromatiques de Madagascar. Ministère des Colonies-Jardin Colonial. Agr. Colon. 46: l-9.

Gessler M.C., Msuya D.E., Nkunya M.H., Mwasumbi L.B., Schar A., Heinrich M., Tanner M. 1995. Traditional healers in Tanzania: the treatment of malaria with plant remedies. J. Ethnopharm. 48: 131–144.

Gessler M.C., Nkunya M.H., Mwasumbi L.B., Heinrich M., Tanner M. 1994. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. Acta Tropica: 65–77.

Giang P.M., Jin H.Z., Son P.T., Hong J.H., Lee J.J. 2003. ent-Kaurane Diterpenoids from Croton tonkinensis Inhibit LPS-Induced NF-kB Activation and NO Production. . Nat. Prod. 66: 1217-1220.

Gomes E.T., Travert S., Gleye J., Moulis C., Fouraste I., Stanislas E., 1994. Furoquinoline alkaloids from *Vepris heterophylla*. Planta Medica 60: 388.

Góra J., Lis A., Kula J. 2002. Chemical composition variability of essential oils of the ontogenesis of some plants. Flavour Fragr. J. 17: 445-451.

Grundschober F.1991. *The identification of individual components in flavourings and flavoured foods*. Z Lebensm Unters Forsch 192: 530-534.

Guedes A.P., Franklin G., Fernandes-Ferreira M. 2012. Hypericus sp.: essential oil composition and biological activities. Phytochem. Rev. MEDIA BV.

Guinoiseau E. Molécules antimicrobiennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat : Biochimie-Biologie moléculaire : Université de Corse : 2010.

Günther H. 1994. La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie. Masson : Paris, 557p.

Gurgel L.A., Silva R.M., Santos F.A., Martins D.T.O., Mattos P.O., Rao V.S..N. 2001. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. Phytother. Res. 4: 319-322.

Gurib-Fakim A., Sewraj M., Gueho J., Dulloo E. 1993. Medical ethnobotany of some weeds of Mauritius and Rodrigues. J. Ethnopharm. 39: 175–185.

Hagedorn M.L., Brown S.M. 1991. The constituents of Cascarilla oil (*Croton eluteria* Benett). Flavour Fragr. J. 6:193-204.

Hashidoko Y., Tahara S., Mizutani J. 1994. Six sesquiterpenoides from glandular trichome exudates of Rosa rugosa. Phytochem. 35(2): 325-329.

Hedberg I., Hedberg O., Madati P.J., Msigeni K.E., Mshiu E.N., Samuelsson G. 1983. Inventory of plants used in traditional medicine in Tanzania. Part III. Plants of the families Papilionaceae–Vitaceae. J. Ethnopharm. 9: 237–260.

Herent M.-F., de Bie V., Tilquin B. 2007. Determination of new retention indices for quick identification of essential oils compounds. J. pharm. Biomed. Anal. 43: 886-892.

Hernandez J., Delgado G. 1992. Terpenoids from aerial parts of Croton draco. Fitoterapia 63: 377-378.

Hesse M., Meier H., Zeeh B. 1997. Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique, Masson, Paris.

Humbert H. 1950. Rutaceae Flore de Madagascar et des Comores : 27-35.

Humbert H. 1955. Les territoires phytogéographiques de Madagascar in Colloque internationaux du C.N.R.S. LIX. Les divisions écologiques du Monde. Paris juin-juillet 1954. Année biol., 3è sér 5-6: 439-448.

Humbert H. 1959. Origines présumées et affinités de la flore de Madagascar. Inst Sc Mad. Sér. B 9 : 149-187.

Itokawa H., Ichihara Y., Mochizuki M., Enomori T., Morita H., Shirota O., Inamatsu M., Takeya K. 1991. A cytotoxic substance from Sangre de Grado. Chem. Pharm. Bull. 39(4): 1041-1042.

Janssen A.M., Scheffer J.J.C., Baerheim S.A. 1986. Antimicrobial activity of essential oils. A 1976-1986 literature review. Aspects of test methods. Planta Medica 53: 395-398.

Jennings W., Shibamoto T. 1980. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography, Jovanovich H.B. Ed., Academic Press, New York.

Jirovetz L., Buchbauer G., Gernot E, Ngassoum M.B., Maponmetsem P.M.. 2007. Composition and antimicrobial Activity of *Cymbopogon giganteus* (Hochst.) Chiov. Essential Flower, leaf and stem oils from Cameroon [dagger]. J. Essent. Oil. Res. 19: 485-489.

Joulain D., König W.A. 1998. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons: E.B.-Verlag, Hamburg.

Joulain D. 1994. Methods for analyzing essential oils. Modern analysis methodologies: use and abuse. Perfurmer & Flavorist 19: 5-17.

Kalemba D. 1999. Constituents of the essential oil of Artemisia asiatica Nakai. Flavour Fragr. J. 14: 173-176.

Kalemba D., Kunicka A. 2003. Antimicrobial and Antifungal Properties of Essential Oils.Current Med. Chem.10: 813-829

Kan-Fan C., DAS B.C., Boiteau P., Poitier P. 1970. Alcaloïdes de *Vepris ampody*. Phytochem. 9 : 1283-1291.

Kéita A. Recherches phytochimiques et pharmacologiques sur une préparation utilisant *Vepris heterophylla* R. Let (Rutaceae) et *Cymbopogon giganteus* Chiov. (Poaceae) comme antihypertenseur en médecine traditionnel au Mali. Thèse de Doctorat 3ème cycle : Université de Toulouse : 1986.

Kerharo J., Adam J.G. 1974. La pharmacopée Sénégalaise traditionnelle : plantes médicinales et toxiques, Vigot Frères, Paris.

Ketoh G.K., Glitho AI, Huignard J. 2002. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculates* (Coleoptera: bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera:pteromalidae) to three essential oils; J. econo. Entomo. 95(1): 174-182.

Kiuchi F., Itano Y., Uchiyama N., Honda G., Tsubouchi A., Nakajima-Shimada N., Aoki T. 2002. Monoterpene Hydroperoxides with trypanocidal Activity from *Chenopodium ambrosioides*. J. Nat. Prod. 65: 509-512.

Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y.A., Millet J., Chaumont J.P. 2004. Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois Cymbopogon sp. Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. Ann. Méd. Vét. 148: 202-206.

Koechlin J.J.L., Guillomet P., Morat P. 1974. Flore et Végétation de Madagascar. Vaduz-Cramer ed, 187 ill. 687 p.

Kostova I., Iossifova T., Rostan J., Volger J., Kraus W., Navas H. 1999. Chemical and biological studies on *C. panamensis* (Dragon's blood). Pharm. Pharmaco. Let. 9: 34-36.

Kováts E. 1965. Gas chromatographic characterisation of organic substances in the retention index system. Advances in Chromato. 1: 229-247.

Krebs H.C., Ramiarantsoa H. 1997. Clerodane diterpenes of *Croton hovarum*. Phytochem. 45(2): 379-381.

Kubeczka K.H., Formácek V. 1984. Application of direct carbone-13 NMR spectroscopy in the analysis of volatiles. Schreier P. Ed., Walter de Gruyter & Co: Berlin: 219-230.

La flore de Madagascar et des Comores (?) p 14

Lange G., Schultze W. 1988. Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, in Bioflavour'87. P. Schreier Ed., W de Gruyter & Co. : Berlin: New-York: 115-122.

Le Bourhis B. 1973. Propriétés biologiques de l'anéthole, principe aromatique des plantes anisées. Maloine S.A, Paris.

Leandri J. 1939. Les Croton de Madagascar et des îles voisines. Ann. Mus. Colon. Marseille, sér. 5, 7(1): 1-98.

Leão I.M.S., Andrade C.H.S., Pinheiro M.L.B., Da Rocha A.F.I., Machado M.I.L., Craveiro A.A., Alencar J.W., Matos F.J.A.. 1998. Essential Oil of *Croton lanjouwensis* Jablonski from Brazilian Amazonian Region. J. Essent. Oil Res. 10: 643-644.

Lee N.H.S., Xu Y.J., Goh S.H. 1999. 5-Oxonoraporphines from Mitrephoracf. maingayi. American Chem. Society and American Society Pharmacognosy.

Leroy J.F. 1978. Composition, origin and affinities of the Madagascar vascular flora. Ann. Missouri. Bot. Gard. 65: 535-589.

Lesueur D., Bighelli A., Casanova J., Tran Minh Hoi, Tran Huy Thai. 2009. Composition of the essential oil of *Piper bavinum* C. DC. from Vietnam. J. Essent. Oil. Res. 21: 16-18.

Lianga Y.Z., Xieb P., Chan K. 2004. Quality control of herbal medicines. J. Chromatogr. B 812: 53-70.

Lota M.L., de Rocca Serra D., Jacquemond C., Tomi F., Casanova J. 2001a. Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange. Flavour Fragr. J. 16: 89-96.

Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J. 2000. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. Biochem. Syst. Ecol. 28: 61-78.

Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J. 2001b. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. Biochem. Syst. Ecol. 29 : 77-104.

Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Jacquemond C., Casanova J. 2002. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. J Agric Food Chem. 50: 796-805.

Mabberley D.J. 1999. The Plant Book, Cambridge University Press. Cambridge. UK.

Maciel M.A.M., Pinto A.C., Brabo S.N., Da Silva M.N. 1998. Terpenoids from *Croton cajucara*. Phytochem. 49(3): 823-828.

Maia J.G., Andradeb E.H., das Graças M., Zoghbib B. 2004. Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (Artocarpus heterophyllus Lam.). Food Chem. 85: 195-197.

Marie D., Dejan B., Quetin-Leclercq J. 2007. GC-MS analysis of the leaf essential oil of Ipomea pes-caprea, a traditional herbal medicine in Mauritus. Nat. Prod. Comm. 2(12): 1225-1228.

Markgraf F., Boiteau P. 1972. Apocynanceae : une espèce malgache du genre Sud-africain : Gonioma. Adansonia, 12 : 223-229.

Marriott P., Shellie R., Fergeus J., Ong R., Morrison P. 2000. High resolution essential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology. Flavour Fragr. J. 15: 225-239.

Martins A.P., Salgueiro L.R., Gonçalves M.J., Vila R., Tomi F., Adzet T., da Cunha A.P., Cañigueral S., Casanova J. 2000. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Bark Oil of Croton stellulifer, an Endemic Species from S. Tomé e Príncipe. Planta Medica 66: 647-650.

Masada Y. 1976. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry, John Wiley & sons, New York.

Matu E.N. 2011. *Vepris madagascarica* (Baill.) H.Perrier. In: Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). Prota 11(2): Medicinal plants/Plantes médicinales 2. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Netherlands.

Mc Lafferty F.W., Stauffer D.B. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed., Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co.: Newfield.

Meijer T.M. 1947. The essential oil from the leaves of *Clausena anisata* Hook. f. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 66: 395-400.

Melville R. 1970. L'importance de la flore malgache parmi les flores du monde, In : Conférence Internationale sur l'utilisation rationnelle et la Conservation de la Nature à Madagascar. 7.

Menut C., Bessière J.M., Samate D., Djibo A.K., Buchbauer G., Schopper B. 2000. Aromatic Plants of Tropical West Africa. XI. Chemical Composition, Antioxidant and Antiradical Properties of the Essential Oils of Three *Cymbopogon* Species from Burkina Faso. J Essent. Oil. Res. 12: 207-212.

Menut C., Lamaty G., Bessière J.M., Seuleiman A.M., Fendero P., Maidou E., Dénamganaï J. 1995. Volatile Constuents of Croton aubrevillei J. Léonard and C. Zambesicus Muell Arg. J. Essent. Oil Res. 7: 419-422.

Molino J.F. 1993. History and botany of Clausena anisum-olens (B1anco) Merr. CU. 'Clausanis' (Rutaceae), aromising essential oil crop plant. Acta Hort. 331: 183-190.

Mondello L., Casilli A., Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G. 2005. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of Citrus essential oils. Flavour Fragr J 20: 136-140. Moreno PRH, Lima MEL. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae) Leaves. J. Essent. Oil. Res. 21: 190-192.

Moreno P.R.H., Lima M.E.L. 2009. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae) Leaves. J. Essent. Oil. Res. 21: 190-192.

Mulholland D.A., Langat M.K., Crouch N.R., Coley H.M., Mutambi E.M., Nuzillard J.M. 2010. Cembranolides from the stem bark of the southern African medicinal plant. Phytochem. 71: 1381-1386.

Murillo R.M., Jakupovic J., Rivera J., Castro V.H. 2001. Diterpenes and other constituents from *Croton draco* (Euphorbiaceae). Rev Biol Trop 49: 259-264. In: Salatino A, Salatino ML, Negri G. 2007. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). J. Braz. Chem. Soc. 18: 11-33.

N'Guyen Thi Tam, Duong Thi Thuam, Bighelli A., Castola V., Muselli A., Richomme P., Casanova J. 2004. *Baeckea frutescens* leaf oil from Vietnam: composition and chemical variability. Flavour Frag. J. 19: 217-220.

Ncube N., Finnie J.F., Van Staden J. 2012. In vitro antimicrobial synergic within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. J. Ethnopharmaco. 139: 81-89.

Neves I.A. et da Camara C.A. 2011. Acaricidal activity against Tetranychus urticae and essential oil composition of four *Croton* species from Caatinga biome in northeastern Brazil. Nat. Prod. Commun. 6(6): 893-899.

Neves I.A. et da Camara C.A. 2012. Volatile Constituents of Two *Croton* Species from Caatinga Biome of Pernambuco – Brasil. Rec. Nat. Prod. 6(2): 161-165.

Ngadjui B.T., Abegaz B.M., Keumedjio G.N., Kapche G.W. 2002. Diterpenoids from the stem bark of *Croton zambesicus*. Phytochem. 60: 345-349.

Ngadjui B.T., Folefoc G.G., Keumedjio F., Dongo E., Sondengam B.L., Connolly J.D. 1999. Crotonadiol, a labdane diterpenoid from the stem bark of *Croton zambesicus*. Phytochem. 51: 171-174.

Orav A., Koel M., Kailas T., Müürisepp M. 2010. Comparative analysis of the composition of essential oils and supercritical carbon dioxide extracts from the berries and needles of Estonian juniper (Juniperus communis L.). Procedia Chem. 2: 161-167.

Ouamba J.M. Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo : Extraction et analyse des huiles essentielles, Oximation des aldéhydes naturels. Thèse de Doctorat d'Etat : Université Montpellier II : 1991.

Owlia P., saderi H., Rasooli I., Sefidkon F. 2009. Antimicrobial Characteristics of Some Herbal Oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special Reference to their Chemical Compositions. Iranian J. Pharm. Res. 8(2): 107-114.

Palmeira S.F., Moura F.d.S., Alves V.L., de Oliveira F.M., Bento E.S., Conserva L.M., Andrade F.M. 2004. Neutral components from hexane extracts of *Croton sellowii*. Flavour Fragr. J. 19: 69-71.

Paoli M., Nam A.-M., Castola V., Casanova J., Bighelli A. 2011. Chemical variability of the wood essential oil of *Cedrus atlantica* Manetti from Corsica. Chem. Bio. 8: 344-350.

Paolini J., Costa J., Bernardini A.F. 2007. Analysis of the essential oil from roots of *Eupatorium cannabinum* subsp. corsicum (L.) by GC, GC-MS and 13C-NMR. Phytochem. Anal. 18: 235-244.

Paranagama P.A., Abeysekera K.H., Abeywickrama K., Nugaliyadde. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of the *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. Isolated from stored rice. Letters in Applied Microbio. 37: 86-90.

Peres M.T.L., Monache F.D., Cruz A.B., Pizzolatti M.G., Yunes R.A. 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). J. Ethnopharm. 56: 223-226.

Perrier de la Bâthie H. 1921. La végétation malgache. Ann. Mus. Colon. Marseille, 3è série, 9 : 268 p.

Perrier de la Bâthie H. 1936. Biogéographie des Plantes de Madagascar. Soc. Ed. géogr. Marit. Et Col., Paris 156 p.

Perrier de la Bathie H. 1923. Le santal malgache. Bull. Econ. Madagascar, 1er trim., 187p.

Peyron L., Richard H.. 1992. L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types d'extraits. Epices et aromates. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris.

Phillips J.B., Beens J. 1999. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. J Chromatogr. A 856: 331-347.

Phillipson P. 1994. Madagascar. In : Davis S. Heywood V. & Hamilton A. (eds.) Center of Plant Diversity. The Word Wide Fund for Nature and IUCN. The word conservation Union : 271-281.

Pino J.A., Rocal E., Rosado A., Goire I. 1995a. Herb oil of dill (*Anethum graveolens* L.) grown in Cuba. J. Essent. Oil. Res. 7: 219-220.

Pino J.A., Rosado A., Goire I., Roncal E. 1995b. Evaluation of flavor characteristic compounds in dill herb essential oil by sensory analysis and gas chromatography. J. Agric. Food Chem. 43: 1307–1309. In Callan et al., 2007. Herbal and oil composition of Dill (*Anethum graveolens* L.): effects of crop maturity and plant density. Indu. Crops Prod. 25: 282-287

.Poitou F., Masotti V., Viano J., Gaydou E.M., Andriamahavo N.R., Mamitiana A., Rabemanantsoa A., Razanamahefa B.V., Andriantsiferana M. 1995. Chemical composition of *Vepris elliotii* essential oil. J. Essent. Oil. Res. 7: 447–449.

Popielas L., Moulis C., Kéita A., Fouraste I., Bessière J.M. 1991. The essential oil of *Cymbopogon giganteus*, Planta Medica 57: 586-587.

Porter N., Shaw M., Shaw G., Ellingham P. 1983. Content and composition of dill herb oil in the whole plant and the different plant parts during crop development. New Zealand J Agric Res 26: 119–127. Callan NW, Jhonson DL, Westcott MP, Welty LE. 2007. Herbal and oil composition of Dill (Anethum graveolens L.): effects of crop maturity and plant density. Indu. Crops and Prod. 25: 282-287.

Puebla P., Correa S.X., Guerrero M.F., San Feliciano A. 2005. Phenyl butanoid derivatives from *Croton schiedeanus*. Biochem. Syst. Ecol. 33: 849-854. In: Radcliff-Smith A. 1988. *Croton* In: Polhill RM (Ed.) Flora of tropical East Africa, Euphorbiaceae. Part 1: 135-160 (London).

Rabehaja R.D.J. Contribution a la valorisation de *Cymbopogon giganteus* (Chiov.) *madagascariensis* (A. Camus). Diplôme d'Etude Approfondie : chimie appliquée à l'environnement et à l'industrie : Université d'Antananarivo : 2007.

Rabehaja R.D.J., Raoelison G., Ihandriharison H., Ramanoelina P.A.R., Casanova J. and Tomi F. Volatile Components from *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov var. *Madagascariensis* (A. Camus). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2010;**13** (5): 522-527.

Rabehaja R.D., Ihandriharison H., Randrianirina A.Y., Ramanoelina P.A., Bighelli A., Casanova J., Tomi F. 2011. Combined Analysis by GC(RI), GC-MS and 13C NMR of the Essential Oil from *Tana bojeriana* (Apiaceae), an Endemic Species of Madagascar. Analyt. Chem. Let. 1 (2): 130-134.

Rabesa Z. 1986. Pharmacopée de l'Alaotra. Fanantonana : Antananarivo.

Radcliff-Smith A. 1988. Croton In: Polhill RM (Ed.) Flora of tropical East Africa, Euphorbiaceae. Part 1: 135-160 (London).

Radcliff-Smith A. 2001. Genera Euphorbiacearum. Royal Botanic Gardens, Kew.

Rădulescu V., Popescu M., Ilies D.-C. 2010. Chemical composition of the volatile oil from different plants parts of *Anethum graveolens* L. (Umbelliferae) cultivated in Romania. Farmacia. 58(5): 594-600.

Radulović N., Mananjarasoa E., Harinantenaina L., Yoshinori A. 2006. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. Biochem. System. and ecol.. 34: 648-653.

Rajeriarison C. 1996. Aperçu bibliographique sur l'origine et les affinités de la flore Malgache. Biogéographie de Madagascar : 195-203.

Rakotobe E.A., Rasolomanana C.J.C., Randrianasolo S.S. 1993. Pharmacopée de l'Ambongo et du Boina. CIDST : Antananarivo, 727p.

Rakotondraibe L.H., Rakotovao M., Ramanandraibe V., Ravaonindrina N., Frappier F., Brourd J.P. 2001. Composition and antimicrobial activity of leaf oils of *Vepris leandriana* H. Perr (Rutaceae). J. Essent. Oil. Res. 13: 467-469.

Rakotondraibe L.H. Contribution à l'étude des huiles essentielles de deux Rutaceae de Mananara Nord. *Vepris leandriana* et *Vepris nitida*. Analyse préliminaire d'un glycoside

flavonoidique isolé des feuilles de Vepris Leandriana. DEA de Chimie, Université d'Antananarivo : 1998.

Rakotonirina E.F., Rajaonarison J.F., Raoelison E.G., Rajaonarivelo J.P., Manga N., Solofoniaina M., Benja R., Randriamampionona D., Rabemanantsoa C., Cheuk K., Urverg-Ratsimamanga S., Leclercq J.Q. 2010. Antimicrobial activity of 23 endemic plants in Madagascar. Trop. J. Pharm. Res. 9(2): 165-171.

Rakotovao L.H., Randrianjohany E. 1996. Origine et répartition bioécologique des plantes aromatiques de Madagascar. Biogéographie de Madagascar : 187-194.

Ralambonirina R.S.T., Grougnet R., Vérité P., Lescö M., Butel M.-J., Tillequin F., Deguin B. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthospermum emirnense* and *Anthospermum Perrier* (Rubiaceae). Chem. & biodiv. 8: 145-154.

Ralijerson L.B., Rabehaja R.D., Rajaonarison J.-F., Urverg-Ratsimamanga S. 2005. Comparaison between the fresh and dry essential oil of *Helichrysum faradifani* Scott Elliot from Madagascar. J. Essent. Oil. Res. 17: 597-600.

Ramanoelina A.R.P. Contribution à l'étude de l'huile essentielle de Niaouli (Malaleuca Viridiflora) de Madagascar : 1) Compositions chimiques ,2) Mise en évidence de chémotypes, 3) Activités antibactériennes. Thèse de Doctorat de 3e Cycle : Chimie : Université d'Antananarivo : 1989.

Ramanoelina P.A., Bianchini J.-P., Andriantsiferana M., Viano J., Gaydou E.M. 1992b. Chemical composition of Niaouli essential oils from Madagascar. J. Essent. Oil. Res. 4: 657-658.

Ramanoelina P.A., Bianchini J.-P., Gaydou E.M. 1992a. Chemical composition of essential oil of *Helichrysum bracteiferum*. J. Essent. Oil. Res. 4: 531-532.

Ramanoelina P.A., Bianchini J.-P. Gaydou E.M. 2007. Main Industrial Niaouli (Melaleuca quinquenervia) chemotype productions from Madagascar.

Ramanoelina P.A., Rasoarahona J., Gaydou E.M. 2006. Chemical composition of *Ravensara aromatica* Sonn. Leaf essential oils from Madagascar. J Essent Oil Res 18: 215-217.

Randriamahefa M., Rakotozafy A. 1979. Tari-dalana ahafantarana ny raokandro Malagasy-Livre 1 : Antananarivo.

Randrianalijaona J.-A., Ramanoelina P.A., Rasoarahona J., Gaydou E.M.. 2005. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Essential oil from Madagascar. Anal. Chim. Act. 545: 46-52.

Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa S., Raherimandimby M., Danthu P. 2009. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. Food chem. 114(2): 680-684.

Reichling J.R., Schnitzler P., Suschke U., Saller R. 2009. Essential Oils of Aromatics Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties-an Overview. Forsch Komplementmed 16: 79-90.

Rivière C., Nicolas J.P., Caradec M.L., Désiré O., Schmitt A. 2005. Les plantes médicinales de la région nord de Madagascar : une approche ethnopharmacologie. Bull de Société Française d'Ethnopharmacologie et de la Société Européenne d'Ethnopharmacologie, 36 : 36-49.

Roengsumran S., Singtothong P., Pudhom K., Ngamrojanavanich N., Petsom A., Chaichantipyuth C. 1999. Neocrotocembranal from *Croton oblongifolius*. J. Nat. Prod. 62(8): 1163-1164.

Rossi D., Guerrini A., Maietti S., Bruni R., Paganetto G., Poli F., Scalvenzi L., Radice M., Saro K., Sacchetti G. 2011. Chemical finger printing and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? Food Chem 126: 837-848.

Rouessac F., Rouessac A. 2004. Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes (6ème Ed.). Dunod : Liège, 303 p.

Salatino A., Salatino M.L.F., Negri G. 2007. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). J. Braz. Chem. Soc. 18:11-33.

Sandra P., Bicchi C. 1987. Capillary gas chromatography in essential oil analysis, Huethig, Heidelberg.

Schmelzer G.H. et Gurib-Fakim A. 2008. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11(1) ; Plantes médicinales 1. PROTA : 220.

Schultze W., Lange G., Schmaus G. 1992. Isobutane and ammoniac chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons. Flavour Fragr. J. 7: 55-64.

Sellier N., Cazaussus A., Budzinski H., Lebon M. 1991. Structure determination of sesquiterpenes in Chinese vetiver oil by gas chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 557: 451-458.

Senatore F., Arnold N.A., Piozzi F. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. simplicifolia Boiss. growing wild in Lebanon J. Chromatogr. A 1052: 237-240.

Serra S., Fuganti C. 2004. Natural p-Menthene Monoterpenes: Synthesis and Enantiomeric forms of Wine Lactone, Epi-wine Lactone, Dill Ether, and Epi-dill Ether Starting from a Common Intermediate. Helvet. Chim. Acta 87: 2100-2109.

Setzer WN. 2006. Chemical compositions of the bark essential oils of *Croton monteverdensis* and Croton niveus from Monteverde, Costa Rica. Nat. Prod. Commun. 1(7): 567-572.

Sidibé L., Chalchat J.C., Garry R.-P, Lacombe L. 2001 Aromatic Plants of Mali (IV).. Chemical Composition of Essential Oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf and *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov. J. Essent. Oil. Res. 13: 110-112.

Simionatto S;, Bonani V.F.L., Morel A.F., Poppi N.R., Júnior J.L.R., Stuker C.Z., Peruzzo G.M., Peres M.T.L., Hess S.C. 2007. Chemical Composition and Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem bark. J. Braz. Chem. Soc. 18(5): 879-885.

Songa S.M., Marriott P., Kotsosb A., Drummerb O.H., Wynnec P. 2004. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GC/GC-TOFMS) for drug screening and confirmation. Forensic Sci Int. 143: 87-101.

Sousa E.M.B., Martínez J., Chiavone-Filho O., Rosa P.T.V., Domingos T., Meireles M.A.A. 2005. Extraction of volatile oil from Croton zehntneri Pax et Hoff with pressurized CO2: solubility, composition and kinetics. J. Food Engin. 69: 325-333.

Steenkamp V. 2003. Traditional herbal remedies used by South African women for gynaecological complaints. J. Ethnopharm. 86: 97–108.

Suárez A.I., Blanco Z., Delle Monache F., Compagnone R.S., Arvelo F. 2004. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. Nat. Prod. Res. 18(5): 421-426. In:

Suárez A.I., Oropeza M., Vásquez L., Tillett S., Compagnone R.S. 2011. Chemical composition of the essential oil of *C. gossypiifolius* from Venezuela. Nat. Prod. Commun. 6(1): 97-99.

Sutour S., Bradesi P., Casanova J., Tomi F. 2010. Comparaison and Chemical Variability of *Mentha suaveolens* ssp. *Suaveolens* and *M. suaveolens* ssp. *Insularis* from Corsica. Chem. Biod. 7: 1002-1008.

Sylvestre M., Pichette A., Longtin A., Nagau F., Legault J. 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. J. Ethnopharm. 103: 99-102.

Takaisi-Kikuni N.B., Tshilanda D., Babady B. 2000. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*, Fitoterapia 71: 69-71.

Tchuella J. Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle Bamiléké, Thèse de Pharmacie, n°105, Université de Dakar : Sénégal : 1964.

Tepe B., Akpulat H.A., Sokmen M., Daferera D., Yumrutas O., Aydin E., Polissiou M., Sokmen A. 2006. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. Food Chem. 97(4): 719-724.

Thapa R.K., Bradu B.L., Vashist V.N., Atal C.K. 1971. Screening of *Cymbopogon* Species for Useful Constituents. The Flavour Industry. 2: 49-51.

Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J. 1995. Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. J Magn. Reson. Anal. 1: 25-34.

Tomi F., Casanova J. 2000. Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles. Annales Fals Expertise Chim 93: 313-330.

Tomi F, Casanova J. 2006. 13C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. Acta Horticul. 723: 185-192.

Torres M.C.M., Assunção J.C., Santiago G.M.P., Andrade-Neto M., Silveira E.R., Costa-Lotufo V., Bezarra D.P., Filho J.D.B., Viana F.A., Pessoa O.D.L. 2008. Larvicidal and Nematicidal Activities of the Leaf Oil of *Croton regelianus*. Chem. Biod. 5: 2724-2728.

Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G., Mondello L. 2004. Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis. J. Chromatogr. A 1054: 3-16.

Tsacheva I., Rostan J., Iossifova T, Vogler B., Odjakova M., Navas H., Kostova I., Kojouharova M., Kraus W. 2004. Complement inhibiting properties of dragon's blood from *Croton draco*. J. Biosci. 59C: 528-532. In: Salatino A, Salatino M.L.F., Negri G. 2007. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). J. Braz. Chem. Soc. 18:11-33.

Tsai J.C., Tsai S.L., Chang W.C. 2004. Effect of ethanol extracts of tree Chinese medicinal plants with laxative properties on ion transport of the rat intestinal epithelia. Biol. Pharm. Bull. 27(2): 162-165.

Usman L.A., Olawore N.O., Oladosu I., Hamid A.A., Elaigwu S.E. 2009. Constituent of Leaf Oil of *Croton zambesicus* Muell. Arg. Growing in North Central Nigeria. Middle-East J. Sci. Res. 4(4): 242-244.

Van Wyk B.-E., Tilney P.M., Winter P.J. 1999. Four new genera of woody Apiaceae of Madagascar. Taxon 48(4): 737 –745.

Vellutini M., Baldovini N., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J. 2005. □-Cyclolavandulyl and □-isocyclolavandulyl esters from *Peucedanum paniculatum* L., an endemic species to Corsica. Phytochem. 66: 1956-1962.

Vendeuvre C., Bertoncini F., Duval L., Duplan J.L., Thiébaut D., Hennion M.C. 2004. Comparison of conventional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography for the detailed analysis of petrochemical samples. J. Chromatogr. A 1056: 155-162.

Vera R., Smadja J., Conan J.Y. 1990. Preliminary screening of alkaloid containing plants of Reunion. Plantes Medicinales et Phytotherapie 24, 50–65.

Vera R.R., Chane-Ming J. 1998. Chemical composition of essential oil of dill (*Anethum graveolens* L.) growing in Reunion Island. J. Essent. Oil. Res. 10: 539-542.

Verma R., Padalia R., Yadav A., Chauhan A. Essential oil composition of *Aralia cahemirica* from Uttarakhand, India. 2010. Rec. Nat. Products 4(3): 163-166.

Wann M.H. 2005. 20 Application of LC-NMR in pharmaceutical analysis. Separation Science Tech. 6: 569-579.

Webster GL. 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). Taxon 42(4): 793-823.

Weyerstahl P., Marschall-Weyerstahl H., Manteuffel E. 1989. Proceedings of the 11th International Congress of Essential Oils, Fragrances Flav. Number 5. Oxford & IBH Publishing Co PVT. Ltd : New Delhi.

Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., Surburg H. 2000c. Constituents of Haitian vetiver oil. Flavour Fragr. J. 15: 395-412.

Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D. 1996. New sesquiterpene ethers from Vetiver Oil. Liebigs Ann: 1195-1199.

Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D. 1997. New cis-Eudesm-6-ene Derivatives from vetiver oil. Liebigs Ann: 1783-1787.

Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D. 2000a. 1,7-Cyclogermacra-1(10),4-dien-15-al, a sesquiterpene with a novel skeleton, and other sesquiterpenes from Haitian vetiver oil. Flavour Fragr. J. 15: 61-83.

Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D. 2000b. Analysis of the Polar Fraction of Haitian Vetiver Oil. Flavour Fragr. J. 15: 153-173.

Weyerstahl P., Schlicht V. 1997. Synthesis of rac-bisabola-3(15),10-dien-7-ol. Liebigs Ann.: 1789-1790.

Williamson M., Neuhaus D. 1989. The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis, VCH, New York.

Wolfe J.-A. 1972. An interpretation of Alaskan Tertiary Floras. In: Graham A. Floristics and paleofloristics of Asia and eastern Africa. Elsevier Publ. Co., Amsterdam: 201-233.

Wolfe J.-A. 1975. Some aspects of plantgeography of the Nothern-Hemisphere during the Cretaceous and Tertiary. Ann. Miss. Bot. Gard. 62: 264-279.

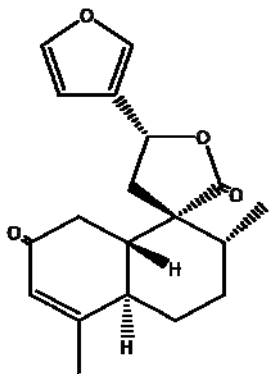
Yapi T.A., Boti J.B., Ahibo C.O., Bighelli A., Castola V., Casanova J., Tomi F. 2012b. Chemical Variability of the Leaf Essential Oil of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich. from Côte d'Ivoire. Chem. Biod. 9: 2802-2809.

Yapi T.A., Boti J.B., Attioua B.K., Ahibo A.C., Bighelli A., Casanova J., Tomi F. 2012a. Three new natural compounds from the root bark essential oil from *Xylopia aethiopica* *Phytochem. Anal.* **23**: 651-656**.**

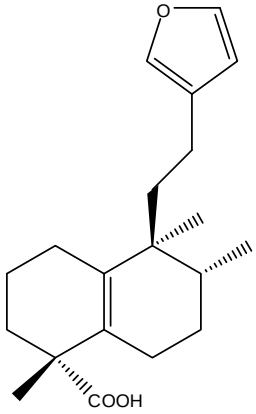
Zhao L., Mao D. 2011. Analysis of pesticides in Food by GC-MS-MS using the ultra inert liners with wool. *Agilent Techno. Pub.* 5990-7706EN.

ANNEXES

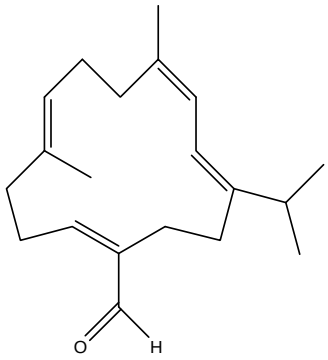
ANNEXE 1 : Quelques composés non-volatils isolés dans des espèces de *Croton*.



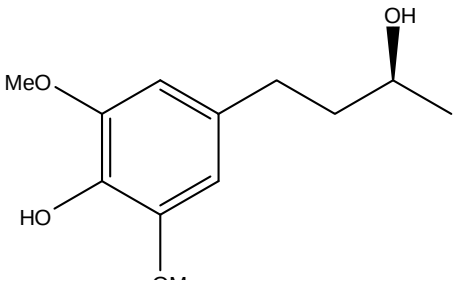
trans-Dehydrocrotonin



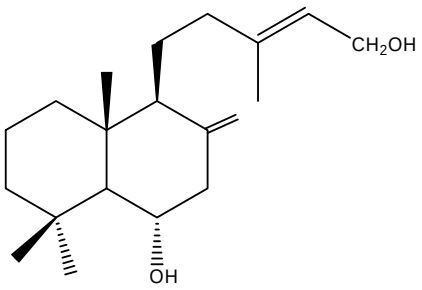
Acide Crotonhalimaneique



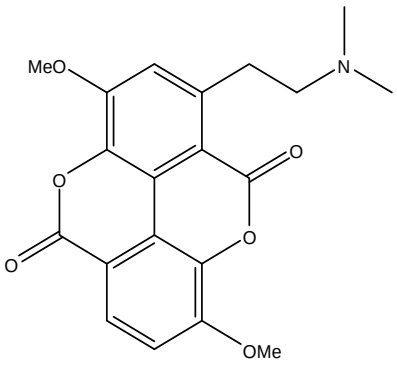
Neocrotocembranal



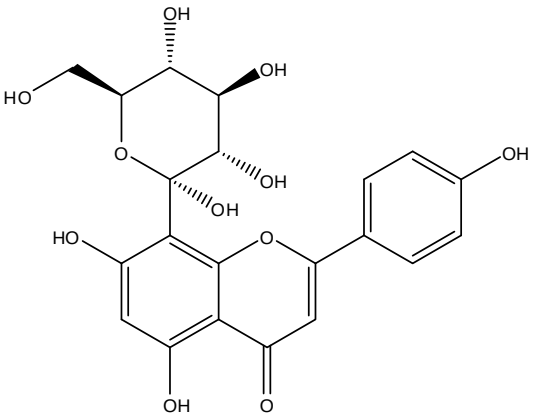
7,9-Dimethoxyrhododendrol



Crotonadiol

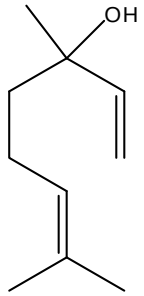


Taspine

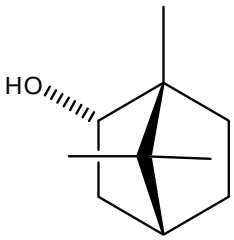


Vitexin (Angin-8-C-glucoside)

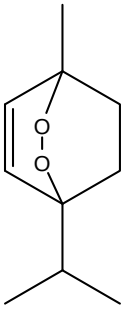
ANNEXE 2 : Quelques composés volatils identifiés dans les espèces de *Croton*



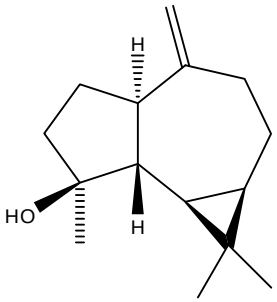
linalol



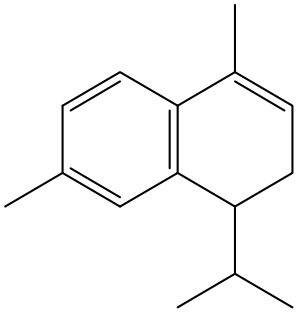
bornéol



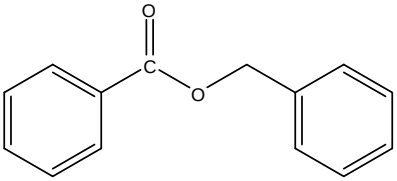
ascaridole



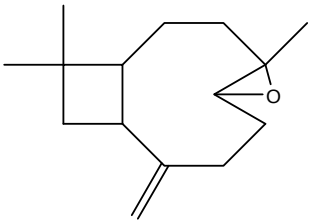
spathulénol



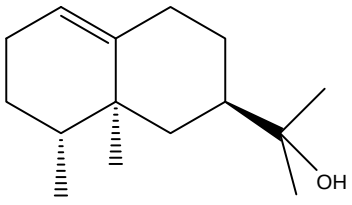
α-calacorène



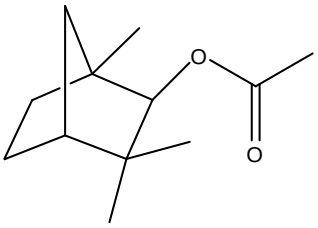
benzoate de benzyle



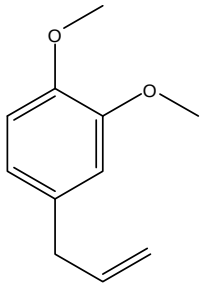
oxyde de caryophyllène



Valérianol

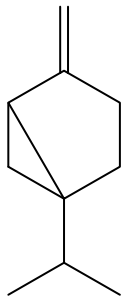


acétate de fenchyle

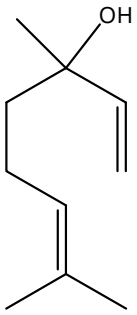


méthyleugénol

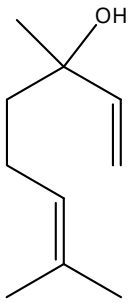
ANNEXE 3 : Quelques composés identifiés dans l'huile essentielle de *Croton kimosorum*



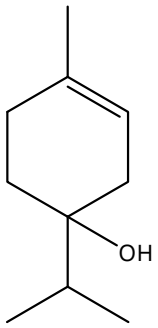
Sabinène



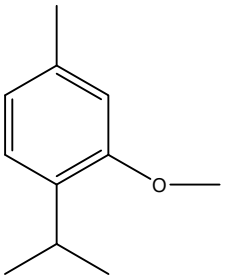
(*E*)-β-ocimène



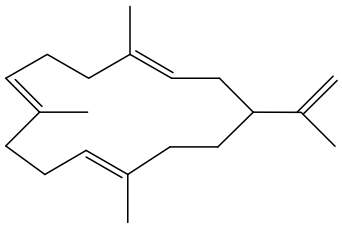
linalol



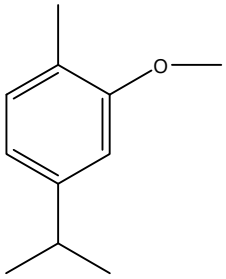
terpinèn-4-ol



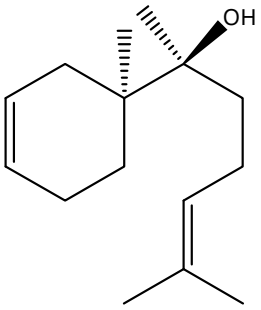
Oxyde de méthyle et de thymyle



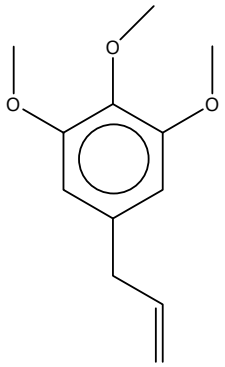
cembrène A

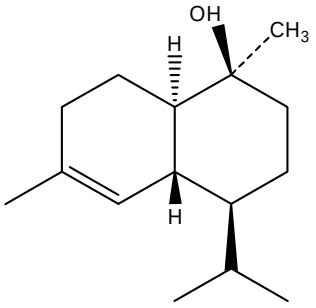


Oxyde de méthyle et de carvacryle



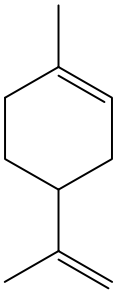
épi-α-bisabolol



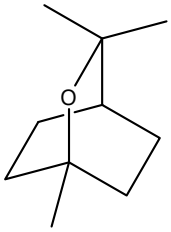


τ-cadinol

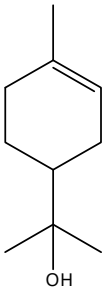
ANNEXE 4: Quelques composés identifiés dans l'huile essentielle de *Croton* sp.



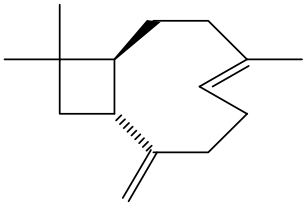
Limonène



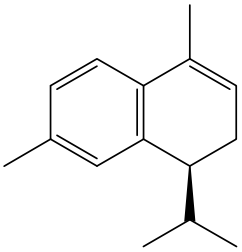
1,8-cinéole



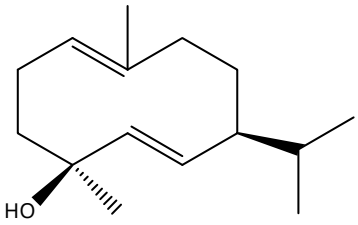
α-terpinéol



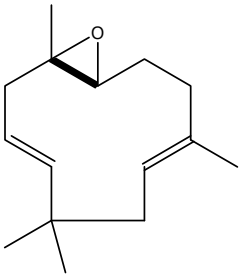
β-caryophyllène



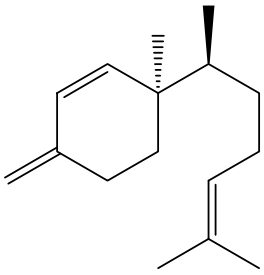
α-calacorène



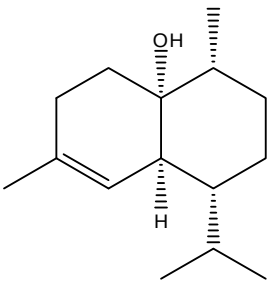
germacra-1(10)-5,dièn-4-β-ol



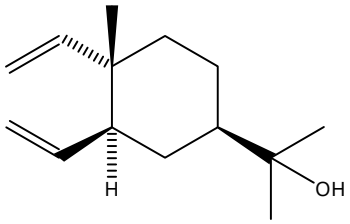
oxyde d'humulène



β-sesquiphellandrène



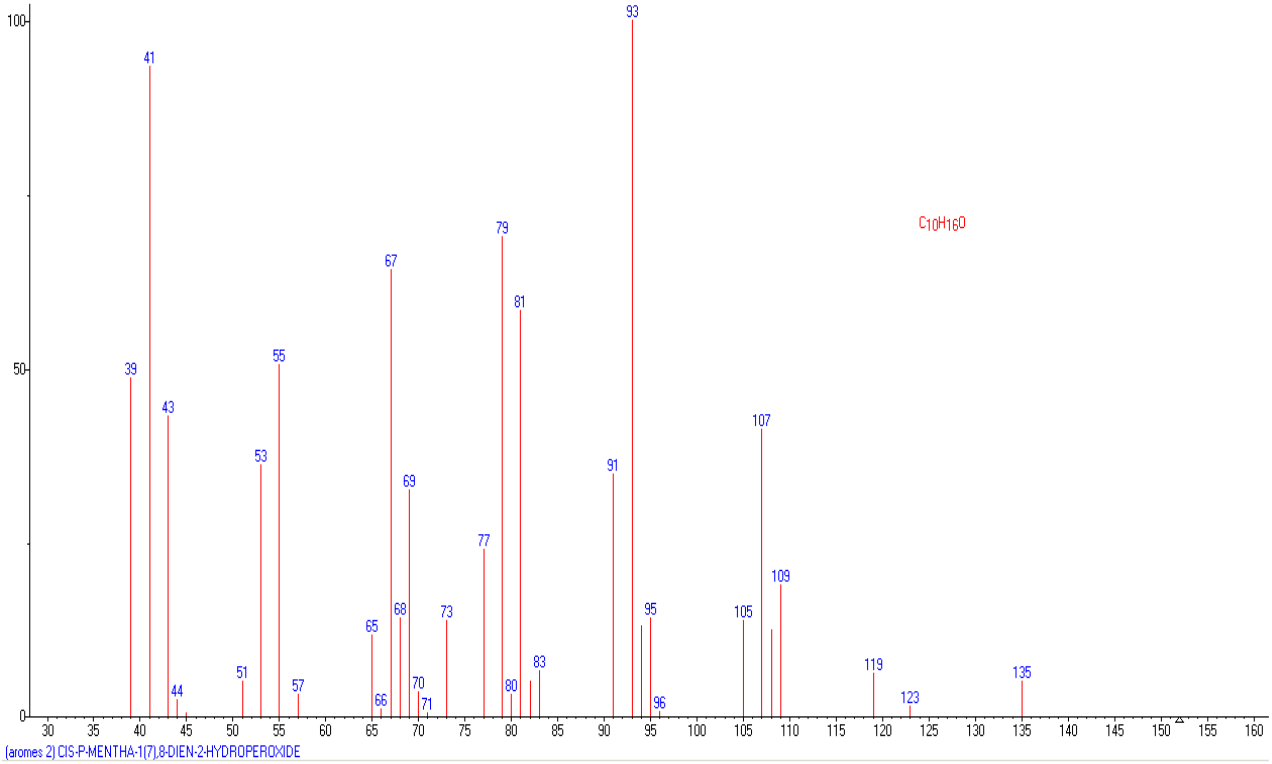
1,10-di-épi-cubénol



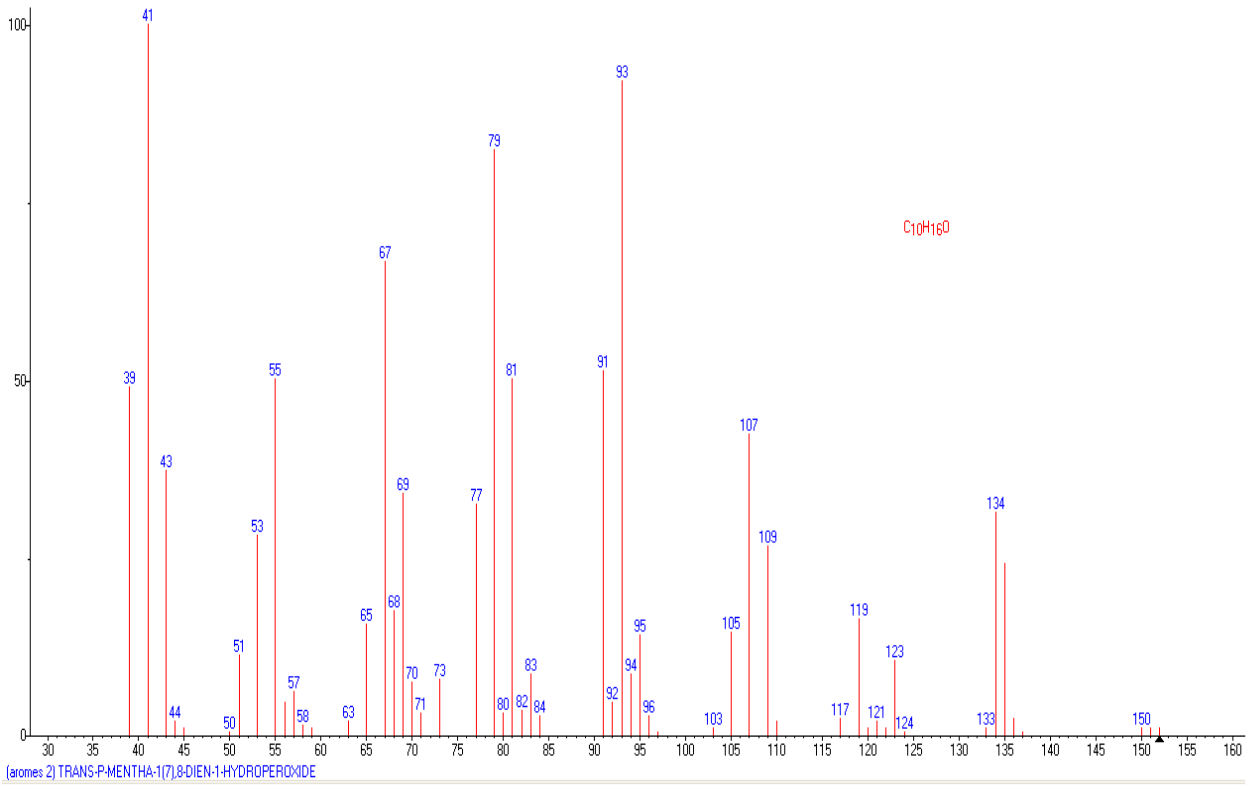
β-élémol

ANNEXE 5 : Spectre de masse de quelques composés

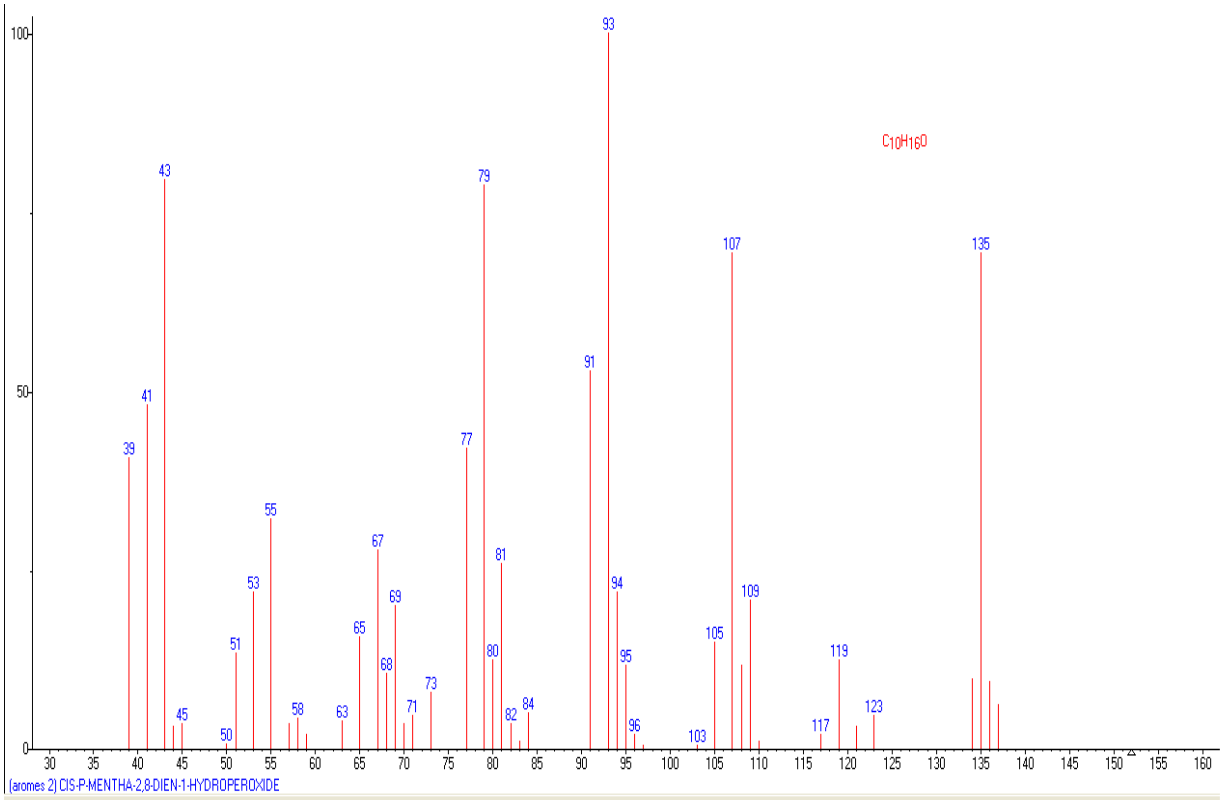
5-1 : *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydroperoxyde



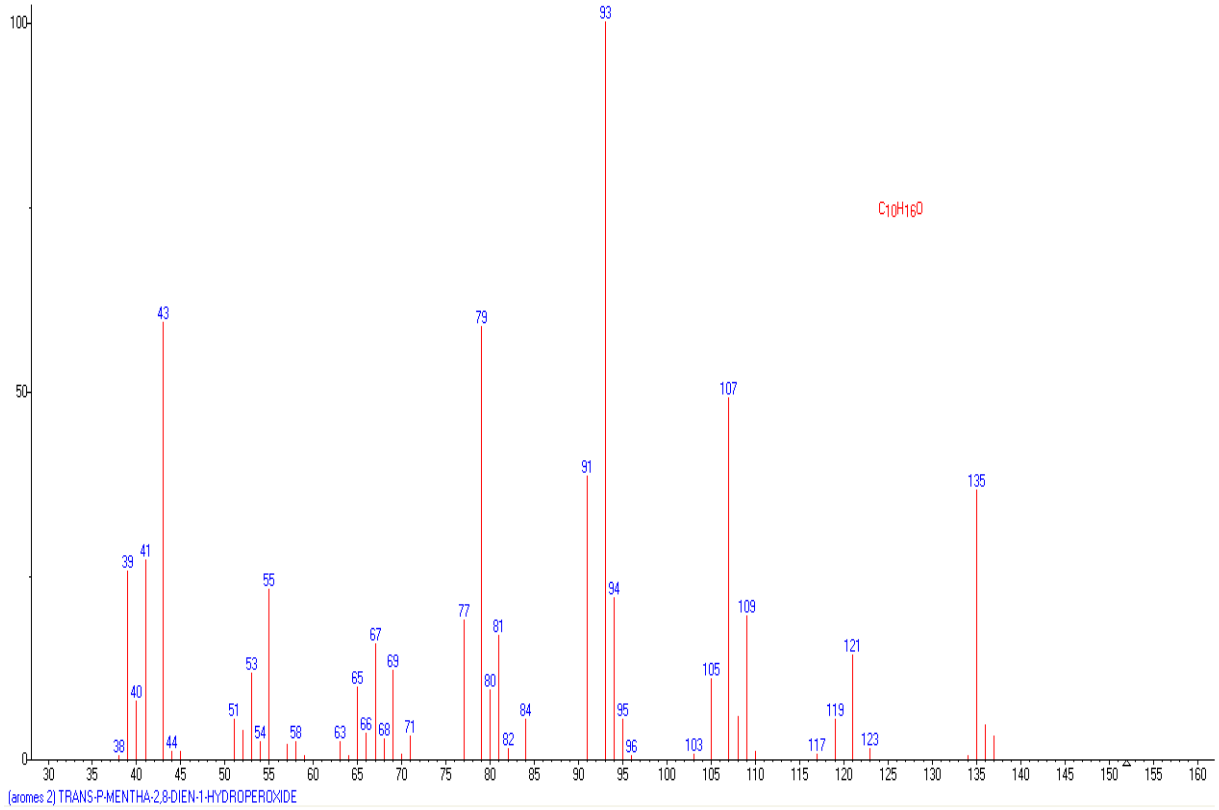
5-2 : *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-hydroperoxyde



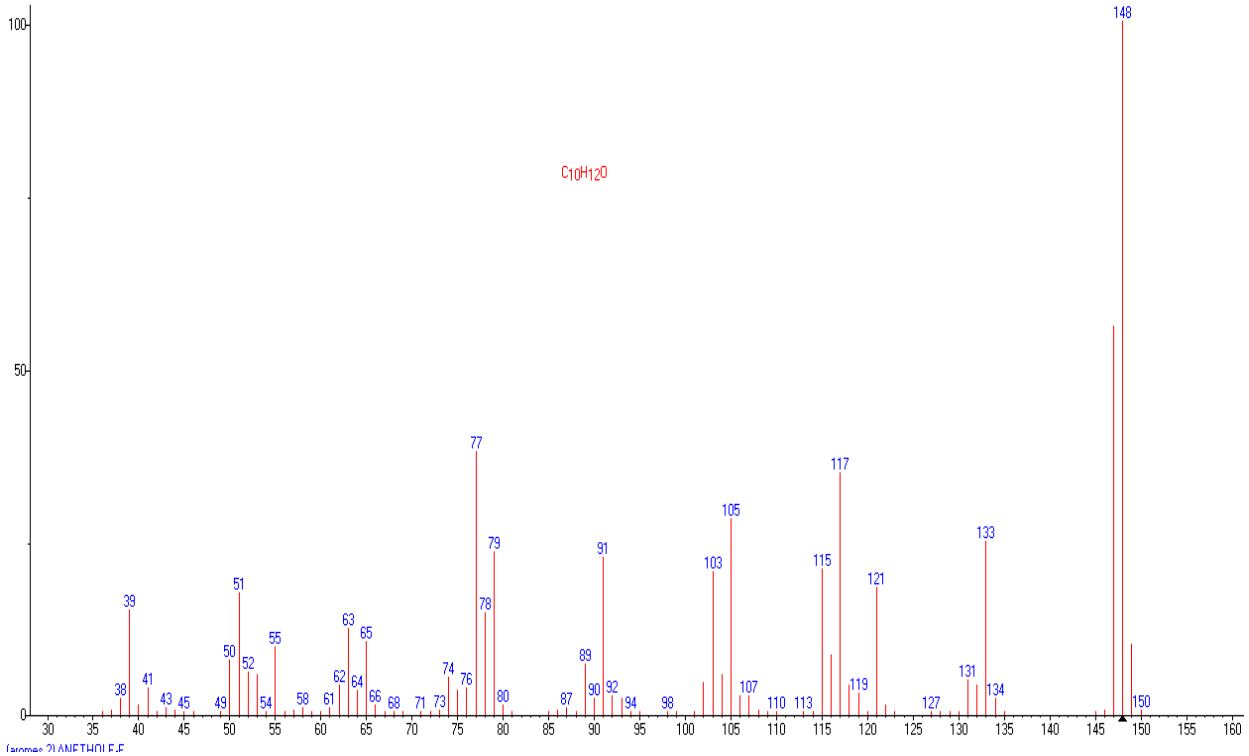
5-3 : *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydroperoxyde



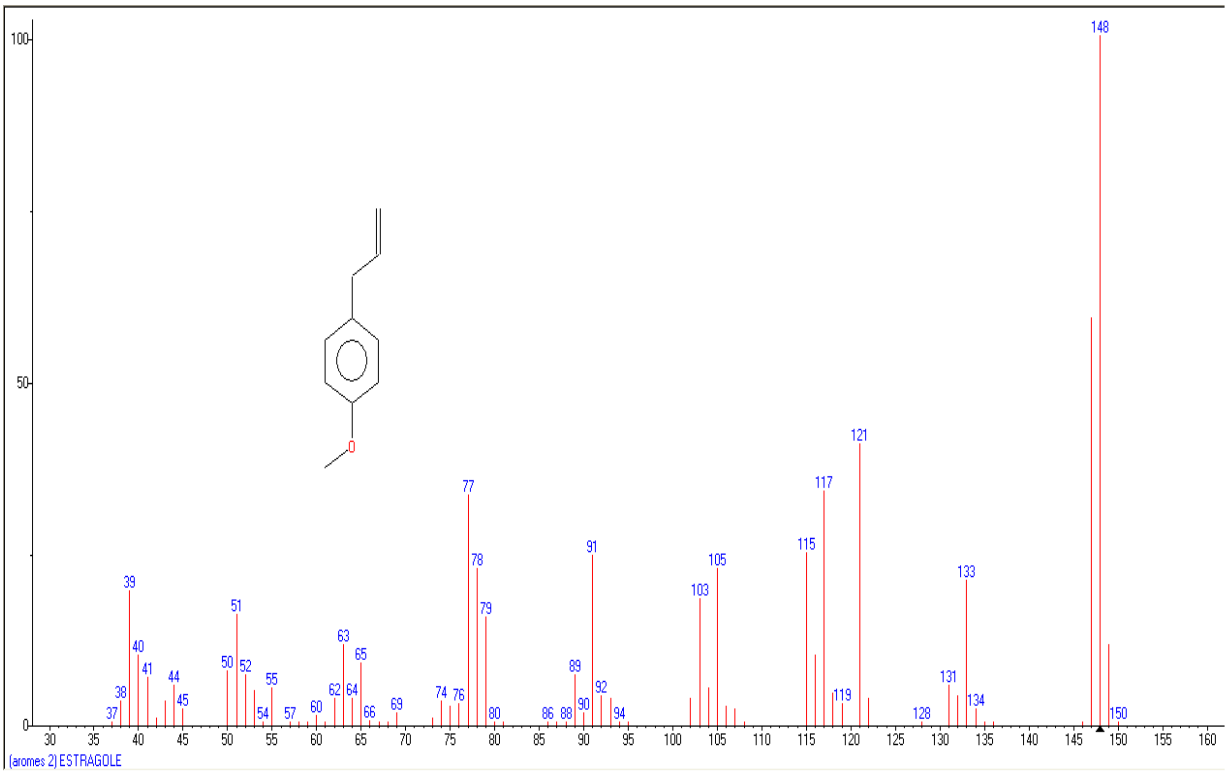
5-4 : *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-hydroperoxyde



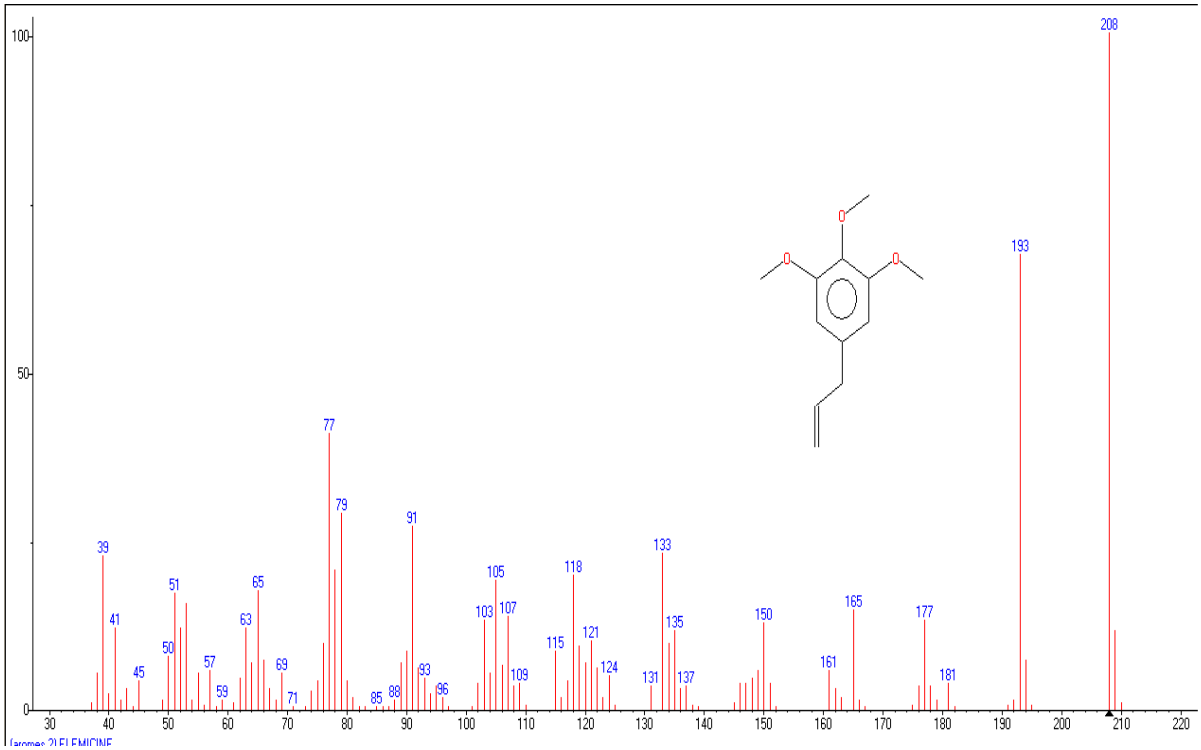
5-5 : Spectre de masse du (*E*)-anéthole



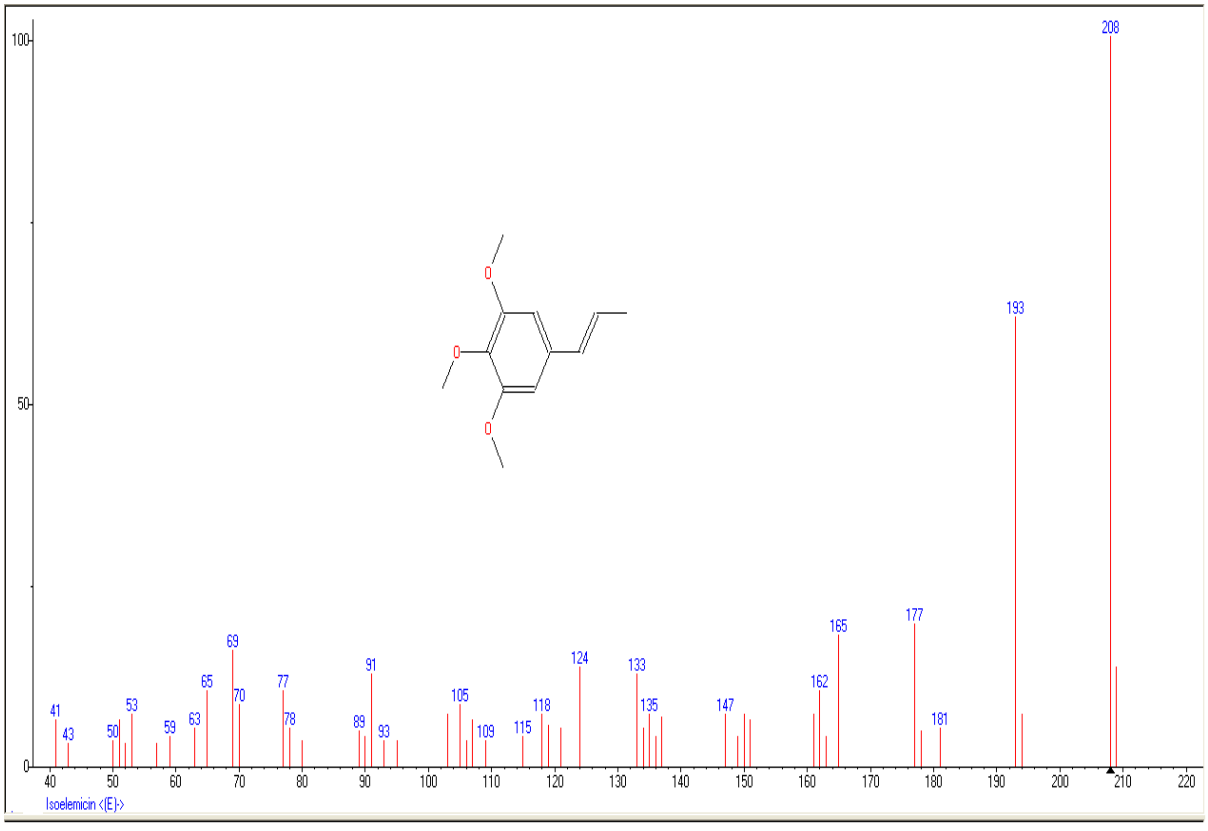
5-6 : Spectre de masse de l'estragole



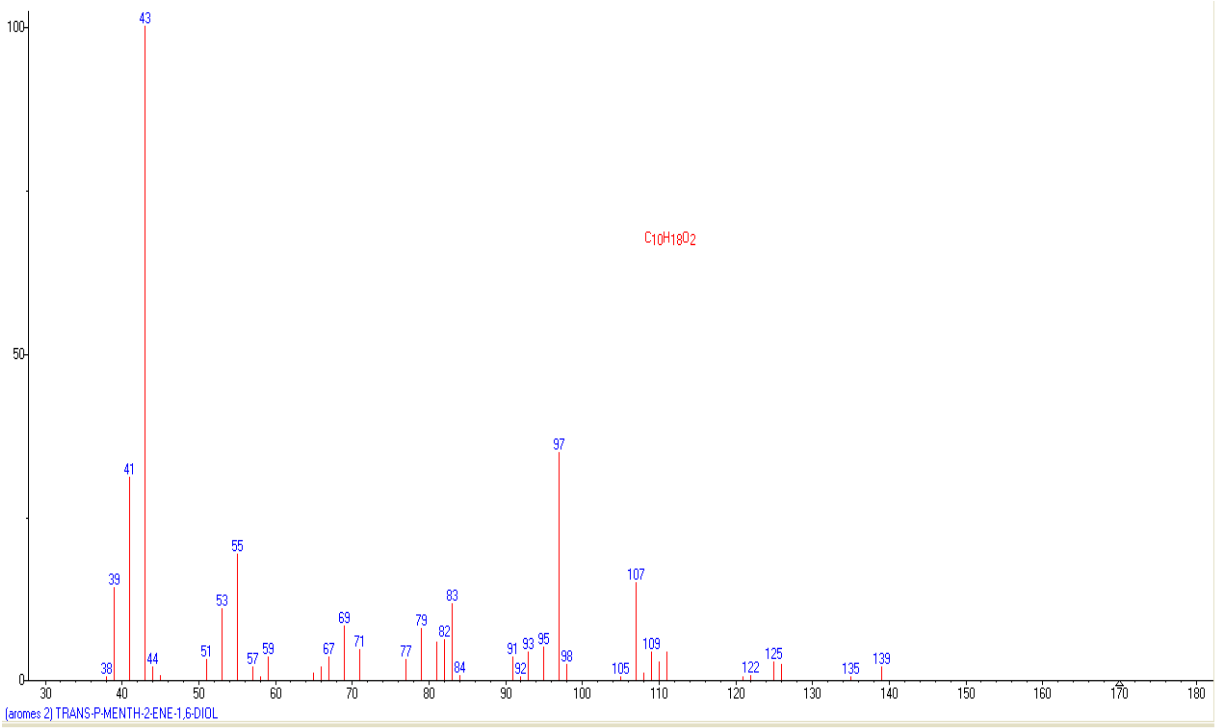
5-7 : Spectre de masse de l'élémicine



5-8 : Spectre de masse du (*E*)-isoélémicine



5-9 : Spectre de masse du *trans*-p-menth-2-ène-1,6-diol



ANNEXE 6 : Première Publication sur *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis*

Jeobp 13 (5) 2010 pp 522 - 527 522

ISSN 0972-060X

Volatile Components from *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov var. *madagascariensis* (A. Camus)

Delphin J.R. Rabehaja [1,3], Guy Raoelison [1], Harilala Ihandriharison [1], Panja A.R. Ramanoelina [2], Joseph Casanova [3] and Félix Tomi [3]*

[1] Laboratoire d'Analyses d'Huiles Essentielles, Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA), BP 3833 Antananarivo, 101 Antananarivo, Madagascar
[2] Laboratoire des Industries Agricoles et Alimentaires, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo, BP 175, 101 Antananarivo, Madagascar
[3] Université de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

Received 01 February 2010; accepted in revised form 26 June 2010

Abstract: The composition of essential oil isolated by hydrodistillation (Clevenger type apparatus) and by vapour distillation (industrial-scale equipment) from the aerial parts of *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov. var. *madagascariensis* (A. Camus) growing wild in South-Western Madagascar was investigated by GC (RI), GC-MS and ^{13}C NMR. The composition of the Malgasy oil, dominated by *p*-menthadienol isomers and limonene, is similar to that of African *C. giganteus* oils.

Key words: *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis*, Poaceae, Essential oil, ^{13}C NMR, GC-MS, Madagascar.

Introduction: The *Cymbopogon* genus (Poaceae family) comprises 56 species [1] among which four species, *Cymbopogon citratus, C. flexuosus, C. martini* and *C. giganteus* grow wild in Madagascar. More precisely, the Malagasy plant growing in arid south-western Madagascar is *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov var. *madagascariensis* (A. Camus). This variety differs from the African *C. giganteus* by its lower height (0.5 - 1.5 m instead of 2 - 3 m). Leaves are glaucous green, linear and flexible, with little rounded or no rounded at the base. Conversely, in African species, leaves are flat and their edges are rough to the touch. Finally, the inflorescences are smaller in diameter (10 - 30 cm instead of 30 - 40 cm)[2,3].

Aerial parts of the African *C. giganteus* produce an essential oil whose composition

*Corresponding author (Felix Tomi)
E- mail: < felix.tomi@univ.corse.fr >

has been extensively investigated. The major componenents of *C. giganteus* oils from Benin [4], Burkina Faso [5], Mali [6], Côte d'Ivoire [7] and Cameroon [8] are *p*-menthane derivatives such as *cis*- and *trans*-*p*-mentha-2,8-dien-1-ol, *cis*- and *trans*-*p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol, *cis*- and *trans*-isopiperitenol, limonene and carvone.

The aim of the present work was to characterise the essential oil of *C. giganteus* var. *madagascariensis* from Madagascar and to compare its composition with that of *C. giganteus* oils from continental Africa.

Experimental

Plant material: Aerial parts (leaves, stems) of *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* were collected in Befoly, Toliara, in the South-West region of Madagascar, in March - July 2009. A voucher specimen was deposited at the herbarium of the Department of Botany, Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA).

Distillation of volatile components: Aerial parts of *C. giganteus* var. *madagascariensis* were subjected to hydrodistillation in our laboratories for 3 h using a Clevenger-type apparatus (Samples L1-L4) or by steam distillation for 3h in industrial equipment (Inox Alembic of 2000 L, samples I1-I4). The essential oils were dried over anhydrous sodium sulphate and kept at 4°C prior analysis.

Analytical GC: The GC analysis was carried out with a Clarus 500 Perkin- Elmer Autosystem apparatus equipped with two flame ionisation detectors (FID) and fused capillary columns (50 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm), BP-1 (polymethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). Carrier gas: helium; linear velocity: 0.8 mL.min^{-1}. The oven temperature was programmed from 60°C to 220°C at 2°C.min^{-1} and then held isothermal (20 min). Injector temperature was 250°C (injection mode: split 1/60). Detector temperature: 250°C. The relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages obtained by peak area normalization, all relative response factors being taken as one.

GC-MS analysis: The essential oil (sample I1) was analysed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with a fused-silica capillary column (60 m x 0.22 i.d., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas: helium at 1 mL/min; split, 1/80: injection volume, 0.2 µL; injection temperature, 250°C; oven temperature programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermal (45 min); Ion source temperature, 150°C; ionisation energy, 70 eV; electron ionisation mass spectra were acquired over the mass range 35-350 Da.

Carbon-13 NMR analysis: NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.13 MHz for ^{13}C, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform ($CDCl_3$), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ^{13}C NMR spectra were recorded with the following parameters:

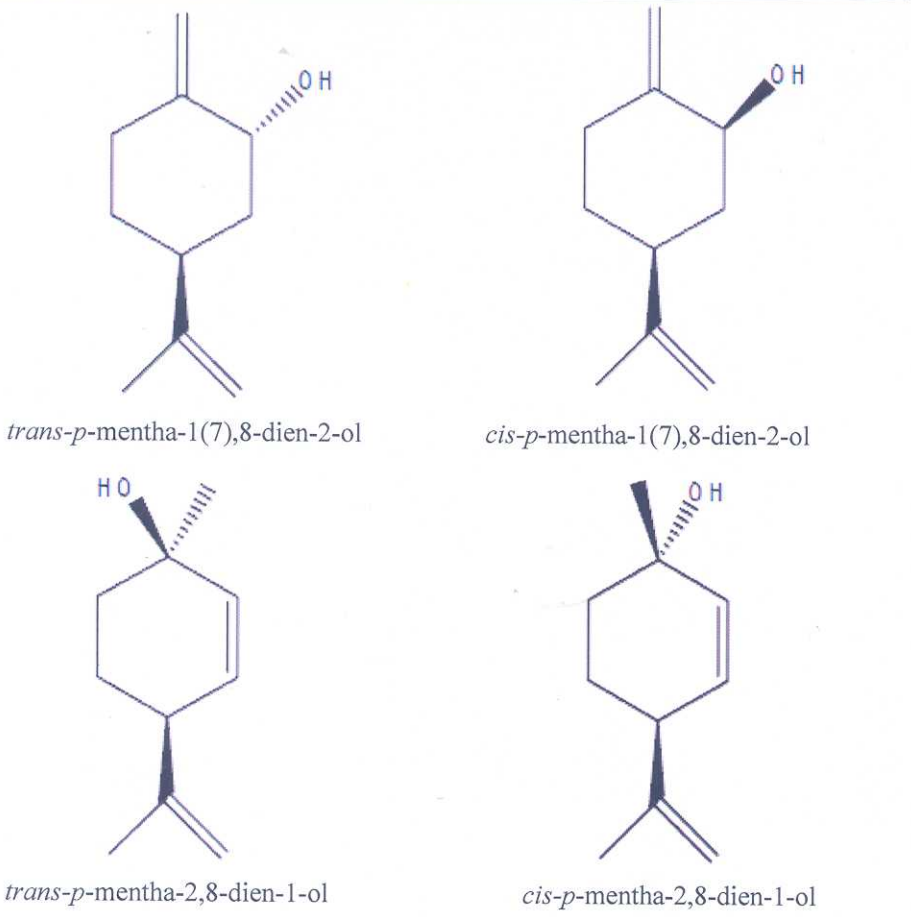
pulse width (PW), 4 µs (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width (SW) of 24 000 Hz (240 ppm); digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for each sample (50-60 mg of oil in 0.5 mL of $CDCl_3$).

Identification of components: Identification of the individual components was based: (i) on comparison of their GC retention indices (RI) for both apolar and polar columns-calculated by linear interpolation to *n*-alkanes retention times-, with those of standard compounds; (ii) on computer matching with a laboratory-made (Laboratory "Chimie des Produits Naturels) and commercial mass spectral libraries [9,11] and comparison with spectra of reference compounds or literature data[12-14]; (iii) by ^{13}C NMR spectroscopy, following a computerized method developed in our laboratories, using a home-made software, by comparison of the chemical shift values of the signal in the oil spectrum with those of reference compounds compiled in a laboratory-built library [15-17]. This technique allows the identification of individual components until a content about 0.5 % without any previous purification.

Results and discussion: In order to characterise the essential oil of *Cymbopogon giganteus* variety *madagascariensis* from Madagascar, eight oil samples were isolated from plants collected in Befoly (Toliara-Madagascar) during March - July 2009 period. The first four oil samples (L1-L4) were obtained at the laboratory (hydrodistillation in a Clevenger type apparatus), the last four samples (I1-I4) were prepared using an industrial scale equipment (vapour distillation). The yield calculated (w/w on the fresh weight basis) varied substantially from sample to sample with respect to the mode of isolation and the time of harvest: 0.10 to 1.15 %, laboratory scale distillation and 0.05- 0.59 %, industrial scale distillation. Integrated analysis of *C. giganteus* var. *madagascariensis* was carried out using various techniques recently reviewed [18]. All the samples were analyzed using by GC in combination with retention indices on two columns of different polarity and by ^{13}C NMR following a method developed in our laboratories [9,10]. One oil sample (I1) was also analysed by GC-MS.

The composition of all oil samples was largely dominated by *p*-menthadienols: *trans*-*p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol (14.7 - 22.4 %), *cis*-*p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol (12.3 - 19.0 %), *trans*-*p*-mentha-2,8-dien-1-ol (11.2 - 19.0 %) and *cis*-*p*-mentha-2,8-dien-1-ol (8.3 - 9.8 %) (Figure 1). Other components were present at appreciable contents: carvone (3.1 - 4.1 %), *trans*-isopiperitenol (2.3 - 8.9 %), *cis*-isopiperitenol (2.1 - 3.8 %). The content of *trans*-carveol (2.5 - 3.2 %) was always higher than that of its *cis* isomer (0.2 - 0.8 %). Limonene was also among the major components during the period March - June (11.6 - 24.0 %). Its content dropped drastically early July (6.3 % lab samples and 5.1 % industrial samples). The contents of the major components varied slightly for the lab-made samples in comparison with industrial samples. Ascaridole was identified by NMR in various samples.

In conclusion, the composition of the essential oil from aerial parts of *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov var. *madagascariensis* (A. Camus) largely dominated by *p*-menthadienol isomers is quite similar to that reported for African *C. giganteus*. This is appreciable information for local producers and purchasers.



trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol *cis-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol

trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol

Figure 1. Structure of *p*-menthadienols

Acknowledgements: R.D. expresses his gratitude to the French Ministère des Affaires Etrangères for financial support (Project MADES) and the Society SOIMANGA (Rakotomanga Pascal) for her collaboration.

References

1. **Mabberley, D.J. (1999).** The Plant Book, Cambridge University Press. Cambridge. UK.
2. **Bosser, J. (1969).** Graminées des pâturages et des cultures à Madagascar. Orstom Ed. Paris.
3. **Letouzey, R. (1972).** Manuel de Botanique Forestière Afrique Tropicale, Centre Technique Forestier Tropical, Tome 2B, 123-435.
4. **Ayedoun, M.A., Moudachirou, M. and Lamaty, G. (1997).** Composition chimique des huiles essentielles de deux espèces de *Cymbopogon* du Bénin exploitables

industriellement. Bioressources, Energies, Développement, Environnement. 8: 4-6.

5. **Menut, C., Bessière, J.M., Samate, D., Djibo, A.K., Buchbauer, G. and Schopper, B. (2000).** Aromatic Plants of Tropical West Africa. XI Chemical Composition, Antioxidant and Antiradical Properties of the Essential Oils of Three *Cymbopogon* Species from Burkina Faso. J. Essent. Oil Res, 12: 207-212.
6. **Sidibé, L., Chalchat, J.C., Garry, R.P. and Lacombe L. (2001).** Aromatic Plants of Mali (IV): Chemical Composition of Essential Oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf and *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov. J. Essent. Oil Res. 13: 110-112.
7. **Boti, J.B., Muselli, A., Tomi, F., Koukoua, G., N'Guessan, Y.T., Costa, J. and Casanova, J. (2006).** Combined Analysis of *Cymbopogon giganteus* Chiov. Leaf Oil from Ivory Coast by GC(RI), GC-MS and ^{13}C-NMR. C.R. Chimie, 9: 164-168.
8. **Jirovetz, L., Buchbauer, G., Eller, G., Ngassoum, M.B., and Maponmetsem, P.M. (2007).** Composition and Antimicrobial Activity of *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov. Essential Flower, Leaf and Stem Oils from Cameroon.. J. Essent. Oil Res. 19: 485-489.
9. **McLafferty, F.W. and Stauffer, D.B. (1994).** Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. Mass Spectrometry Library Search System Benchtop/PBM, version 3.10d. Palisade CO: Newfield.
10. **König, A., Hochmuth, D.H. and Joulain, D. (2001).** Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of MassFinder 2.1. Institute of Organic Chemistry, Hamburg.
11. **NIST/EPA/NIH, National Institute of Standards and Technology, (1999).** (PC Version 17 of the Mass Spectral Library), Perkin-Elmer Corporation, Saint Quentin.
12. **Adams, R.P. (2001).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co, Carol Stream, USA.
13. **Joulain, D. and König, W.A. (1998).** The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, E.B.-Verlag, Hamburg.
14. **McLafferty, W. and Stauffer, D.B. (1988).** The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data (4th edn), Wiley-Interscience, New York.
15. **Tomi, F., Bradesi, A., Bighelli, A. and Casanova, J. (1995).** Computer-aided identification of indivudial components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. J. Magn. Reson. Anal. 1: 25-34.
16. **Tomi, F. and Casanova, J. (2006).** ^{13}C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. A review. Acta Horticulturae. 723: 185-192.
17. **Blanc, M.C., Bradesi, P., Gonçalves, M.J., Salgueiro, L. and Casanova, J. (2006).** Essential Oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa*: Analysis by ^{13}C-NMR and Antimicrobial Activity. Flavour Fragr. J. 21: 324-332.

18 **Bighelli, A. and Casanova, J. (2009).** Analytical tools for analysing *Cymbopogon* oils. Chapter 8 in "Essential Oil Bearing Grasses - The genus Cymbopogon", Ed, Akhila A, CRC Press, Taylor and Francis, London, 195-221.

Table 1. Chemical composition of *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis* essential oils

Compounds	RI a	RI p	Samples L1	L2	L3	L4	I1	I2	I3	I4	Identification		
p-Cymene	1010	1274	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4	0.4	0.5	RI	MS	^{13}C NMR
Limonene	1022	1205	24.0	15.3	20.6	6.3	14.5	17.3	11.6	5.1	RI	MS	^{13}C NMR
p-Cymenene	1072	1440	0.3	0.3	0.2	0.3	0.4	0.6	0.6	0.9	RI	MS	^{13}C NMR
trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1103	1632	16.3	15.7	18.3	11.2	16.6	17.9	18.1	19.0	RI	MS	^{13}C NMR
cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1115	1673	8.3	8.4	8.7	8.6	8.6	9.0	9.3	9.8	RI	MS	^{13}C NMR
trans-Limonene-1,2-oxide	1119	1447	1.1	0.8	0.8	0.5	0.4*	0.4*	0.2*	0.1*	RI	MS	^{13}C NMR
cis-Limonene-1,2-oxide	1123	1459	0.4	0.3	0.2	0.4	0.4	0.4	0.5	0.6	RI	MS	^{13}C NMR
trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1169	1794	14.9*	14.7*	14.9*	22.1*	16.6*	17.3*	19.5*	22.4*	RI	MS	^{13}C NMR
3,9-Oxy-mentha-1,8(10)-diene	1169	1561	1.5*	1.8*	1.9*	1.9*	2.1*	2.1*	2.4*	2.7*	RI		^{13}C NMR
cis-Dihydroperillaldehyde	1172	1604	0.6	0.8	0.3	0.5	0.3	0.4	0.5	0.4	RI	MS	^{13}C NMR
trans-Dihydroperillaldehyde*	1175	1608	0.7	1.1	0.9	0.8	0.3	0.2	0.7	0.7	RI		^{13}C NMR
trans-Isopiperitenol	1179	1751	2.3	3.8	2.7	8.9	3.2	3.2	3.8	3.9	RI	MS	^{13}C NMR
cis-Isopiperitenol*	1196	1745	2.2*	2.6*	2.1*	3.8*	2.3*	2.6*	2.7*	2.7*	RI		^{13}C NMR
trans-Carveol*	1196	1828	2.5*	2.6*	2.7*	3.2*	2.7*	2.8*	3.0*	3.0*	RI		^{13}C NMR
cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1203	1886	12.3	13.7	14.9	19.0	15.2	13.7	15.4	16.2	RI	MS	^{13}C NMR
cis-Carveol	1208	1884	0.2	0.6	0.6	0.8	0.7	0.8	0.6	0.5	RI	MS	^{13}C NMR
Carvone	1214	1728	3.9	3.9	3.1	4.1	3.7	3.4	3.5	3.6	RI	MS	^{13}C NMR
Perillaldehyde	1244	1783	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4	RI	MS	^{13}C NMR
Ascaridole	1273	1886	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.3	RI	#	^{13}C NMR
Phenylethyl hexanoate	1610	2168	0.3	0.3	0.3	1.0	-	0.3	0.4	0.5	RI	MS	^{13}C NMR

Order of elution and percentage are given on apolar column (BP-1) except those with asterisk (polar column)
RIa and RIp: retention indices measured on apolar (BP-1) and polar (BP-20) columns
L1-L4: oil samples obtained in the laboratory using a Clevenger-type apparatus
I1-I4: oil samples isolated using an industrial scale apparatus
MS do not allows to differentiate ascaridole and isoascaridole.

ANNEXE 7 : Deuxième Publication sur *Tana bojeriana*

Analytical Chemistry Letters
ISSN Print: 2229-7928 Online: 2230-7532
www.anachemletters.org

Combined Analysis by GC(RI), GC-MS and ^{13}C NMR of the Essential Oil from *Tana bojeriana* (Apiaceae), an Endemic Species of Madagascar

Delphin J.R. Rabehaja [1,3], Harilala Ihandriharison [1], Aubin Y. Randrianirina [1], Panja A.R. Ramanoelina [2], Ange Bighelli [3], Joseph Casanova [3] and Félix Tomi [3]*

[1] Laboratoire d'Analyses d'Huiles Essentielles, Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA), BP. 3833 Antananarivo, 101 Antananarivo, Madagascar
[2] Laboratoire des Industries Agricoles et Alimentaires, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo 101, B.P. 175, 101 Madagascar
[3] Université de Corse-CNRS, Equipe Chimie et Biomasse, UMR CNRS 6134, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

Abstract: Integrated analysis by complementary analytical techniques [CC, GC in combination with Retention Indices, GC-MS and ^{13}C NMR] of the volatile components isolated from the aerial parts of *Tana bojeriana* (Baker) B.-E.van Wyk (Apiaceae), growing wild in South-Western Madagascar, was carried out before flowering and during full flowering periods. The composition of the essential oil was dominated by monoterpenes: α-phellandrene (28.3 - 50.0 %), limonene (10.5 - 23.1 %), carvone (1.7 - 22.8 %) and dill ether (7.7 - 17.8 %). Identification of some minor components was achieved by GC(RI) and ^{13}C NMR after fractionation of one oil sample.

Key words: *Tana bojeriana*, Apiaceae, α-phellandrene, dill ether, carvone, ^{13}C NMR, GC-MS, Madagascar.

Introduction

Tana bojeriana (Baker) B.-E.van Wyk [1] is an endemic plant of Madagascar. It has been reported for the first time as *Peucedanum bojerianum* Baker in 1890 [2]. It consists of hermaphrodite, perennial herb up to 50 cm height. Leaves spaced out on the stem, alternate; Inflorescence bearing two multiradiate umbels; primary axis *ca.* 5 to 7 cm long, with 10-12 flowers, peduncle *ca.* 2.5 to 3 cm long, pedicel *ca.* 5 to 7 mm long; Flowers: calyx of 5 small sepals; corolla of 5 free yellow petals. To the best of our knowledge, no phytochemical study related to this plant has been reported in the literature. In the present paper, the composition of the essential oil (EO) isolated from aerial parts was investigated, using a combination of various analytical techniques: column chromatography (CC), gas chromatography in combination with retention indices [GC(RI)], gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{13}C NMR).

Experimental

Plant material

Aerial parts (leaves, stems) of *Tana bojeriana*

*Corresponding author (Félix Tomi)
E- mail: < felix.tomi@univ-corse.fr >

© 2011, Har Krishan Bhalla & Sons

were collected in Ankilifolo, Toliara, in the South-Western region of Madagascar, before the flowering period (March 2008 and March 2009) and during the full flowering period (November 2009 and August 2010). Flowers buds were also collected in August 2010. A voucher specimen was deposited at the herbarium of the Department of Botany, Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA) under the number LHE 010.

Isolation of volatiles

Aerial parts or floral buds of *Tana bojeriana* were subjected to hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The essential oil samples were dried over anhydrous sodium sulphate and the yields of hydrodistillation were calculated on fresh weight basis.

Fractionation of the essential oil

The sample N°3 (0.5 g, see table 1) was fractionated by column chromatography (silica gel, 200-500µm, 15 g) and four fractions were eluted with pentane (F1, 80 mg, F2, 127 mg, non polar compounds), pentane/diethyl oxide 90/10, (F3, 231mg, medium polar compounds) and diethyl oxide (F4, 34 mg, polar compounds).

Analytical GC

The GC analysis was carried out with a *Clarus 500 Perkin-Elmer* apparatus equipped with two flame ionisation detectors (FID), and fused capillary columns (50 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm), BP-1 (polymethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). Carrier gas hydrogen; linear velocity, 0.8 mL/min. The oven temperature was programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal (20 min). Injector temperature was 250°C (injection mode: split 1/60). Detector temperature: 250°C. The relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages obtained by peak area normalization, all relative response factors being taken as one.

GC-MS Analysis

The oil and all fractions were analyzed with a *Perkin Elmer Turbo* Mass detector (quadrupole), directly coupled to a *Perkin Elmer Autosystem XL* equipped with two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm) Rtx-1, polydimethylsiloxane and Rtx-wax, polyethylene glycol). Carrier gas helium at 1 ml/min; split 1/80; injector temperature, 280°C; oven temperature programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermal (35 min). The ion source temperature was 150°C, the energy ionization was 70 eV, and the electron ionization (EI) mass spectra were acquired over the mass range of 35-350 Da. The oil injected volume was 0.2 µL.

Carbon-13 NMR

NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.13 MHz for ^{13}C, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform ($CDCl_3$), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ^{13}C NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4 µs (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width (SW) of 24 000 Hz (240 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3 000 for each sample (50-60 mg of EO in 0.5 ml of $CDCl_3$).

Identification of the components

Identification of the individual components was based on: (a) comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns, with those of authentic compounds or literature data, (b) computer matching with a laboratory-made (CPN laboratory, University of Corsica) and commercial mass spectral libraries [3-5] and a comparison of spectra with literature;[6-8], (c) comparison of the chemical shifts of carbons in the ^{13}C NMR spectrum of each essential oil with those of reference spectra compiled in the laboratory-made NMR data library, with the help of laboratory-made software [9-11]. NMR data of dill eher and *p*-menth-2-ene-1,6-diol were compared with those reported in the literature[12,13].

***iso*-dihydrocarveol**

MS 70 eV, *m/z* (rel. int.): 41 (100), 79 (72), 93 (65), 43 (65), 39 (58), 67 (56), 55 (49), 82 (47), 107 (47), 121 (42), 136 (22).

***trans*-p-menth-2-ene-1,6-diol**

MS 70 eV, *m/z* (rel. int.): 43 (100), 97 (44), 41 (31), 55 (20), 107 (12), 83 (12) , 53 (10), 125 (6).

Results and discussion

Aerial parts of *Tana bojeriana* (Baker) B.-E.van Wyk were collected in Ankilifolo-Toliara (Madagascar) before the flowering period and during the full flowering period. They were submitted to hydrodistillation in a Clevenger type apparatus. Flower oil was also prepared in August 2010. The yields of essential oil (w/w *vs* fresh material) ranged from 0.65 % to 0.75 %. All the samples were analyzed by GC in combination with retention indices on two columns of different polarity and by ^{13}C NMR following a method developed in our laboratories [9-11]. The composition of one sample (N° 3) was also investigated by GC-MS on two columns of different polarity (apolar and polar). In order to reinforce the identification of minor components by NMR, fractionation of oil sample N°3 was carried out and the four obtained fractions were submitted to GC(RI) and ^{13}C NMR analysis.

The composition of the four oil samples isolated from aerial parts was homogeneous and dominated by monoterpenes bearing the *p*-menthane skeleton (Table 1). α-Phellandrene was the major component in all the samples, however, its content varied substantially from sample to sample (28.3 - 50.0 %). Limonene (12.3 - 19.7 %), carvone (15.9 - 22.8 %) and dill ether (7.7 - 10.6 %) (Figure 1) were present at appreciable contents in the three first samples. The fourth sample differed by the content of the two oxygenated monoterpenes. Indeed, the content of carvone (1.7 %) was very low whilst the ratio of dill ether reached 17.8 %. Dill apiole, a phenyl propanoid, accounted for 2.1 - 4.5 %.

The stage of development of the plant (before flowering or full flowering) had no qualitative influence on the chemical composition of the essential oil. Only quantitative differences were observed, and although they could be considered as significant, they do not allow the definition of chemotypes.

Similarily, the compositions of the oil samples isolated from the aerial parts on the one hand, from flower buds on the other hand, of the same plant material varied quantitatively. The flower oil contained less α-phellandrene and more limonene and carvone than the oil isolated from the whole aerial parts. The content of dill ether was similar in both samples.

Analysis of the five oil samples as well as the fractions of chromatography by ^{13}C NMR reinforced the identification of individual components. For instance, both stereoisomers of dihydrocarvone that possess insufficiently differentiated mass spectra and are conventionally assigned with respect to their retention indices, exhibit quite different ^{13}C NMR spectra. Moreover, computer aided analysis of the ^{13}C NMR spectrum of the fraction of chromatography F4 containing the more polar components (eluted with diethyl oxide) allowed the identification of three components not detected by CG-MS in the whole oil sample. *p*-Mentha-1(7),2-dien-6-ol and *iso*-dihydrocarveol were identified by comparison with their NMR data compiled in our computerized NMR library. *trans-p*-Menth-2-ene-1,6-diol (8.8 % in the fraction F4, 0.1 % of the whole essential oil) (Figure 1), whose mass spectral data are absent in commercial and lab-constructed libraries at our disposal, has been identified by comparison with literature data. Indeed, the ^{13}C NMR data of that compound fitted perfectly with those reported by Ahmed and Mahmoud [13] .

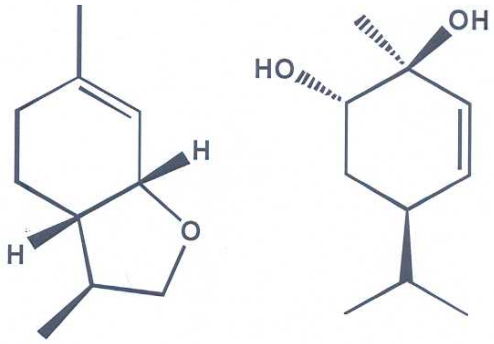


Figure 1. Structures of dill ether (left) and *trans-p*-menth-2-ene-1,6-diol (right)

Conclusion

Aerial parts of *Tana bojeriana* (Baker) B.-E.van Wyk, an endemic aromatic plant from

Madagascar, produced an essential oil whose composition was dominated by menthane-type monoterpenes, α-phellandrene, limonene, carvone and dill ether.

Combined analysis by various analytical techniques, including ^{13}C NMR, allowed the identification of minor components whose mass spectral data are not compiled in commercial libraries.

Acknowledgements

The authors are grateful to the French Ministère des Affaires Etrangères for financial support (Projet Madagascar Enseignement Supérieur) and the Society SOIMANGA that supplied the aromatic plants investigated in that study. Thanks to Dr Rakotonirina Benja for the botanical identification of the plant and to Pr Costa who placed the GC-MS equipment at our disposal.

References

1. **Van Wyk, B.-E., Tilney, P.M. and Winter, P. J. D. (1999).** Four new genera of woody *Apiaceae* of Madagascar. Taxon. 48(4): 737-745.
2. **Baker, J.G. (1890).** *Peucedanum bojerianum* Baker, J. Linn. Soc. Bot., 25: 319.
3. **McLafferty, F. W. and Stauffer, D.B. (1994).** Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, version 3.10d. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edn. Palisade: Newfield.
4. **NIST/EPA/NIH. (1999).** National Institute of Standards and Technology. PC Version 17 of the Mass Spectral Library. Perkin-Elmer Corporation: saint Quentin.
5. **König, W.A., Hochmuth, D.H., Joulain, D. (2001)** Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of MassFinder 2.1. Institute of Organic Chemistry, Hamburg.
6. **McLafferty, F.W. and Stauffer, D.B. (1988).** The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 4th edn. Wiley-Interscience: New York.
7. **Joulain, D. and König, W. A. (1998).** The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E. B.-Verlag: Hamburg.
8. **Adams, R.P. (2007)** Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4th edition. Allured, Carol Stream, IL
9. **Tomi, F., Bradesi, A., Bighelli, A. and Casanova, J. (1995).** Computer-aided identification of indivudial components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. Journal of Magnetic Resonance Analysis. 1: 25-34.
10. **Tomi, F. and Casanova, J. (2006).** ^{13}C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. A review. In "The Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation" Eds: Cervelli, C., Ruffoni, B., Dalla Guda, C. Acta Horticulturae. 723: 185-192.
11. **Duquesnoy, E., Castola, V. and Casanova, J. (2007).** Identification and quantitative determination of triterpenes in the hexane extract of *Olea europaea* L. leaves using ^{13}C NMR spectroscopy. Phytochemical Analysis, 18: 347-353.
12. **Serra, S. and Fuganti, C. (2004).** Natural *p*-Menthene Monoterpenes: Synthesis and Enantiomeric forms of Wine Lactone, Epi-wine Lactone, Dill Ether, and Epi-dill Ether Starting from a Common Intermediate. Helvetica Chimica Acta, 87: 2100-2109.
13. **Ahmed, A.A. and Mahmoud, A.A. (1997).** Carvotacetone derivatives from the Egyptian plant *Sphaeranthus suaveolens*. Phytochemistry, 45: 533-535

Table 1. Composition of the essential oil of *Tana bojeriana* (Apiaceae) from Madagascar

Date of sampling Samples Compounds	RIa	RIp	03/08 N°1 AP/BF	03/09 N°2 AP/BF	11/09 N°3 AP/FF	08/10 N°4 AP/FF	08/10 N°5 FB	Identification
α-thujene	921	1023	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	RI, MS
α-pinene	929	1023	1.3	1.2	1.2	1.2	1.1	RI, MS, ^{13}C NMR
camphene	940	1069	-	tr	tr	tr	tr	RI, MS
sabinene	961	1122	tr	0.1	0.1	0.1	0.2	RI, MS
β-pinene	966	1112	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
myrcene	976	1161	0.6	0.6	0.5	0.7	0.6	RI, MS, ^{13}C NMR
α-phellandrene	994	1167	28.3	39.2	30.5	50.0	31.5	RI, MS, ^{13}C NMR
p-cymene	1008	1272	6.1	2.1	4.3	3.6	2.9	RI, MS, ^{13}C NMR
limonene*	1017	1201	19.7	17.7	12.3	10.5	23.1	RI, MS, ^{13}C NMR
β-phellandrene*	1017	1211	5.5	5.1	5.0	7.0	4.5	RI, MS, ^{13}C NMR
γ-terpinene	1044	1245	0.4	0.4	tr	tr	tr	RI, MS
terpinolene	1074	1284	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	RI, MS
iso-borneol	1140	1665	-	-	tr	tr	tr	RI, MS
dill ether	1163	1512	10.6	9.9	7.7	17.8	16.2	RI, MS, ^{13}C NMR
trans-dihydrocarvone	1167	1605	1.4	1.3	1.1	0.4	0.7	RI, MS, ^{13}C NMR
cis-dihydrocarvone	1173	1624	1.3	-	5.8	0.7	1.8	RI, MS, *^{13}C NMR*
p-mentha-1(7),2-dien-6-ol	1177	1801	-	-	0,6	0.1	0.9	RI, ^{13}C NMR
iso-dihydrocarveol	1193	1777	-	-	0,1	0.1	tr	RI, *^{13}C NMR*
carvone	1211	1730	18.0	15.9	22.8	1.7	7.9	RI, MS, ^{13}C NMR
trans-p-menth-2-ene-1,6-diol	1284	2183	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	RI, *^{13}C NMR*
dill apiole	1583	2350	4.5	4.5	3.7	2.1	5.3	RI, MS, *^{13}C NMR*
Total identified			98.5	98.7	96.3	96.7	97.3	
Yield %			0.65	0.70	0.75	0.73	0.75	

Order of elution and percentages are given on apolar column (BP-1) except those with an asterisk (% on polar column, BP 20);
RIa and RIp: retention indices measured on apolar and polar (BP-20) columns, respectively.
AP: Aerial parts, BF: before flowering, FF: full flowering, FB: floral buds.
^{13}C NMR (italic) refers to compounds identified by NMR in a fraction of chromatography.

RESUME

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une convention de cotutelle entre les Universités de Corse et d'Antananarivo. Il a contribué à la caractérisation de cinq Plantes de Madagascar à travers la composition chimique de leurs huiles essentielles (HE). Quatre plantes aromatiques et médicinales (*Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis*, *Tana bojeriana*, *Croton kimosorum* et *Croton* sp.) poussent à l'état spontané dans la région sub-aride du sud-ouest de Madagascar (Toliara) alors que l'espèce *Vepris madagascarica* est présente dans la forêt dense humide du nord-est (Vohémar). Ainsi, nous avons étudié par combinaison CPG (IR), CPG-SM et RMN 13C la composition chimique d'huiles essentielles obtenues par hydrodistillation (appareil type Clevenger) et par entraînement à la vapeur d'eau (Alambic).

Les huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* Chiov. var. *madagascariensis* (A. Camus) ou Ahibero possèdent une composition chimique comparable avec celles des espèces *Cymbopogon giganteus* Chiov. africaines décrites dans la littérature. Elles sont dominées par les quatre menthadiénols (*cis*- et *trans*-*p*-mentha-1(7),8-dièn-2-ol, *cis*- et *trans*-*p*-mentha-2,8-dièn-1-ol) et le limonène. Nous avons aussi identifié quatre hydropéroxydes possédant le squelette p-menthane. Une monographie de l'huile essentielle d'Ahibero a été proposée à l'intention des utilisateurs de cette huile essentielle.

La composition chimique de l'HE de *Tana bojeriana* Baker est caractérisée par la présence majoritaire de l'α-phellandrène (30,4%), de la carvone (22,3%), du limonène (13,3%) et du dill éther (7,7%). Cette composition chimique apparait très proche de celle d'*Anethum graveolens* (Apiaceae). La présence du *trans*-p-menth-2-èn-1,6-diol et du *p*-mentha-1(7),2-dièn-6-ol lui confère une certaine originalité Elle pourrait donc constituer une alternative aux huiles essentielles qui sont bien implantées sur le marché des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM).

La composition chimique de l'HE de feuilles de *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Perrier est caractérisée par une très forte teneur en *(E)*-anéthole (78,2%). L'étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles (fraîches et séchées) et d'écorces de tronc confirme la prédominance du *(E)*-anéthole (69,5 à 84,6%). Compte tenu de la répartition restreinte de cette plante aromatique et en vue d'une gestion durable de cette espèce, son exploitation devrait être limitée aux huiles essentielles des feuilles qui pourraient ainsi constituer une source de *(E)*-anéthole, composé très utilisé en agro-alimentaire.

Deux espèces de *Croton* endémiques de Madagascar ont été étudiées, *Croton kimosorum* Leandri (Zanapoly ou Napoly) et *Croton* sp. (Andriambolamena ou Riamena). Les huiles essentielles de ces deux plantes aromatiques et médicinales sont caractérisées par la présence du linalol (Zanapoly) et du limonène(Andriambolamena). La première HE est caractérisée par une majorité de composés oxygénés tandis que la seconde est dominée par les composés oléfiniques monoterpéniques. Dans les deux cas, de nombreux sesquiterpènes oxygénés ont été identifiés. Parmi eux, l'épi-α-bisabolol, jamais décrit dans une HE du genre *Croton,* est trouvé pour la première fois dans les deux espèces.

DISCIPLINE

Chimie Organique et Analytique

MOTS-CLES

Plantes aromatiques et médicinales, Madagascar, *Cymbopogon giganteus*, *Tana bojeriana, Vepris madagascarica, Croton,* huile essentielle, CPG, RMN ^{13}C

FAMINTINANA

Ity asa fikarohana mitondra ny loha-hevitra hoe « Famokarana sy fitsirihana ny taharon'ny menaka manitra azo avy amin'ny zava-maniry misy fofona sy fanao fanafody. Famaritana ara-tsimika amin'ny alalan'ny fampiasana miaraka ny fitaoavana harifomba RMN^{13}C, CPG(Ir) ary CPG-SM » ity dia niarahana nanatontosa tamin'ny Oniversité an'Antananarivo sy ny Oniversité any Corse. Ny fandraisana anjara amin'ny famokarana menaka manitra, fanasongadinana ny mampiavaka ny taharon'izy ireo no tanjonay. Nisafidy zava-maniry dimy niasana maniry ho azy izahay : efatra nalaina tany amin'ny faritra atsimo andrefana (Toliara) ary ny iray tany amin'ny faritra avaratra atsinanana (Vohemar).

Ny menaka manitra *Cymbopogon giganteus* (Chiov) var. *madagascariensis* (A.Camus) na Ahibero dia manana taharo simika mitovitovy amin'ny fahita any Afrika fa saingy misy taharo mampiavaka azy. Misongadina ny (*cis*- sy *trans*-*p*-mentha-1(7),8-dièn-2-ol, *cis*- sy *trans*-*p*-mentha-2,8-dièn-1-ol) ary ny limonene. Nahita taharo efatra hafa ihany koa izahay izay tsy fahita amin'ny menaka manitra azo avy amin'ny *Cymbopogon giganteus* maniry any Afrika. Izahay dia nandroso volavola famaritana ny tahan'ny kasinga simika misongadina hita ao anaty Ahibero mba ho afaka kirakirain'ny mpampiasa ity menaka manitra ity.

Ny taharo simikan'ny menaka manitra *Tana bojeriana* Baker dia asongadin'ny fahabetsahan'ny taharo α-phellandrene (30,4%), ny carvone (22,3%), ny limonene (13,3%) ary ny dill éther (7,7%). Ity taharo simikan'ity menaka ity dia hita fa mitovitovy amin'ny an'ny *Anethum graveolens* (Apiaceae). Ny fisin'ny *trans*-p-menth-2-èn-1,6-diol sy ny *p*-mentha-1(7),2-dièn-6-ol dia nampiavaka azy amin'ny hafa. Noho izany dia mety hahasolo ireo menaka manitra efa hita eo amin'ny tsenan'ny zava-maniry misy fofona sy fanao fanafody (PAM) ity menaka manitra ity.

Ny taharo simikan'ny menaka manitry ny ravina *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Perrier na Voatolongoala dia faritan'ny habetsaky ny tahan'ny *(E)*-anéthole izay mahatratra 78,2%. Ny asa fampitahana ny taharo simikan'ny menaka azo avy amin'ny ravina (lena sy maina) ary ny hodi-kazo dia nanamafy ny fisongadinan'ny *(E)*-anéthole (69,5 à 84,6%). Noho ny fahakelezan'ny toerana ahitana ity zava-maniry ity sy mba hitsinjovana ny tsy hahalany tamingana azy dia ny ravina ihany no hampiasaina rehefa hamokatra menaka manitra izay afaka hahazoana tsara ny *(E)*-anéthole, kasinga tena ilaina tokoa eo amin'ny sehatry ny orin'asan'ny sakafo.

Karazana zava-maniry *Croton* roa tsy fahita afa-tsy eto Madagasikara irery ihany dia niasana ihany koa, *Croton kimosorum* Leandri (Zanapoly ou Napoly) et *Croton* sp. (Andriambolamena ou Riamena). Ny menaka manitra azo avy amin'ireo zava-maniry misy fofona sy fanao fanafody ireo dia asongadin'ny fahabetsahan'ny linalol (zanapoly) ary limonene (Andriambolamena). Ny menaka voalohany dia betsaka kasinga ahitana oxygene raha toa ka ny faharoa dia kasinga « oléfiniques monoterpéniques ». Ny « sesquiterpènes oxygénés » dia voatsirika ihany koa tao anatin'ireo menaka roa ireo. Azo raisina ohatra amin'izany ny epi-α-bisabolol, izay mbola tsy hita tao anatin'ny menaka manitra karazana *Croton* mihitsy, fa hita voalohany kosa tamin'ireto *Croton* roa ireto.

TARANJA

Simia Organika sy Analitika

TENY MAMPIAVAKA

Zava-maniry misy fofona sy fanao fanafody, Madagasikara, *Cymbopogon giganteus*, *Tana bojeriana, Vepris madagascarica, Croton,* menaka manitra, CPG, RMN ^{13}C

ABSTRACT

This study was conducted under an agreement of co-supervision between the Universities of Antananarivo (Madagascar) and Corsica (France). It contributed to the characterization of five Malagasy plants through the chemical composition of their essential oils (EO). Four aromatic and medicinal plants: *Cymbopogon giganteus* var. *madagascariensis*, *Tana bojeriana*, *Croton kimosorum* and *Croton* sp. grow wild in the south-western region of Madagascar (Toliara) whereas the species *Vepris madagascarica* is widespread in the rainforest of the north-eastern region (Vohémar). The identification of components of EOs produced by hydrodistillation (Clevenger type apparatus) and by steam distillation (Alembic) has been obtained by combination of GC (RI), GC-MS and ^{13}C NMR.

Cymbopogon giganteus Chiov. var. *madagascariensis* (A. Camus) EO or Ahibero EO of Madagascar has similar chemical composition with *Cymbopogon giganteus* Chiov. African species described in literature. Its chemical composition is dominated by four *p*-menthadienols (*cis*- and *trans*-*p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol, *c*is- and *trans*-*p*-mentha-2,8-dien-1-ol) and limonene. Moreover, four peroxides derivatives bearing the p-menthane skeleton were also identified. A monography has been proposed to Ahibero EO users.

Tana bojeriana Baker EO is characterized by the predominance of α-phellandrene (30.4%), carvone (22.3%), limonene (13.3%) and dill ether (7.7%). The chemical composition of this EO was very close to that of *Anetum graveolens* (Apiaceae family), constituents. The presence of *trans*-p-menth-2-en-1,6-diol and *p*-mentha-1(7) ,2-dien-6-ol, gives some originality to *Tana bojeriana* EO. It could be therefore an alternative for essential oils that are already well established on the Medicinal and Aromatic Plants market.

The chemical composition of *Vepris madagascarica* (Baill.) H. Perrier leaf EO is characterized by a high content of (*E*)-anethole (78.2%). The comparative study of the chemical composition of leaves (fresh and dried) and bark trunk EOs confirmed the predominance of (*E*)-anethole (69.5 to 84.6%). Taking account of the restricted distribution of this aromatic plant and the need for sustainable management of this species, its potential use would be limited to leaf oil and could be a source for this compound widely used in food industry.

Two species of *Croton* endemic from Madagascar were studied, *Croton kimosorum* Leandri (Zanapoly or Napoly) and *Croton* sp. (Andriambolamena or Riamena). Both aromatic and medicinal plants EOs are characterized by the presence of linalool (Zanapoly) and limonene (Andriambolamena). *Croton kimosorum* is characterized by a majority of oxygenated compounds, while the second is dominated by hydrocarbon monoterpenes. In both cases, several oxygenated sesquiterpenes are identified. Among these, the epi-α-bisabolol, never reported in of *Croton* EOs*,* was found for the first time in both species.

DOMAIN

Analytical and Organic Chemistry

KEYWORDS

Aromatic and medicinal plants, Madagascar, *Cymbopogon giganteus*, *Tana bojeriana, Vepris madascarica, Croton,* essential oil, GC, ^{13}C NMR.