



## SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>viii</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>Première Partie: GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES</b>	<b>4</b>
<b>1- Historique</b>	<b>5</b>
<b>2- Définition et Composition chimique</b>	<b>7</b>
2-1- Définition	7
2-2- Composition chimique	8
<b>3-Biosynthèse des constituants volatils des huiles essentielles</b>	<b>8</b>
3-1- Origine	8
3-1-1- Biosynthèse des terpènes	9
3-1-1-1- Condensation et isomérisation	9
3-1-1-2-Cyclisation	10
3-1-1-3- Réactions secondaires, fonctionnalisation	12
3-1-2- Biosynthèse des constituants aromatiques	12
3-1-3-Autres constituants volatils	13
3-2- Rôle des huiles essentielles dans la plante	14
3-3-Localisation dans la plante	15
<b>4- Domaines d'utilisation des huiles essentielles</b>	<b>15</b>
<b>5- Méthodes d'extraction et d'analyse des huiles essentielles</b>	<b>17</b>
5-1- Extraction des huiles essentielles	17
5-1-1-L'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation	17
5-1-2-L'extraction par solvants organiques	18
5-1-3-L'expression à froid	18
5-1-4-L'enfleurage et autres procédés	19
5-1-5-Le rendement	19
5-1-6-Conservation des huiles essentielles	19
5-2- Analyse des huiles essentielles	20
5-2-1- Chromatographie en phase gazeuse	20
5-2-2-Identification par enrichissement	22
5-2-3- La spectrométrie de masse	22

<b>Deuxième Partie : COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES</b>	<b>24</b>
<b>1 – FAMILLE DES ANNONACEAE</b>	<b>25</b>
1-1- <i>Annona muricata</i> L.	25
1-1-1- Botanique et utilisation	25
1-1-2-Travaux antérieurs	27
1-1-3- Résultats et discussion	28
1-2- <i>Annona squamosa</i> L.	33
1-2-1- Botanique et utilisation	33
1-2-2-Travaux antérieurs	34
1-2-3- Résultats et discussion	35
1-3- <i>Monodora myristica</i> (Gaertn) Dunal	39
1-3-1- Botanique et utilisation	39
1-3-2- Travaux antérieurs	40
1-3-3- Résultats et discussion	43
1-4- <i>Xylopia aethiopica</i> Dunal A. Richard	46
1-4-1- Botanique et utilisation	46
1-4-2- Travaux antérieurs	47
1-4-3- Résultats et discussion	51
<b>2 – FAMILLE DES BURSERACEAE</b>	<b>54</b>
2-1- <i>Commiphora africana</i> A. Rich. Engl	54
2-1-1- Botanique et utilisation	54
2-1-2- Travaux antérieurs	55
2-1-3- Résultats et discussion	56
<b>3 – FAMILLE DES CHENOPODIACEAE</b>	<b>61</b>
3-1- <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	61
3-1-1- Botanique et utilisation	61
3-1-2- Travaux antérieurs	62
3-1-3- Résultats et discussion	65
<b>4 – FAMILLE DES GUTTIFERAE</b>	<b>76</b>
4-1- <i>Pentadesma butyracea</i> Sabine	76

4-1-1- Botanique et utilisation	76
4-1-2- Travaux antérieurs	77
4-1-3- Résultats et discussion	77
<b>5- FAMILLE DES LABIATAE</b>	<b>80</b>
5-1- <i>Aeolanthus pubescens</i> Benth.	80
5-1-1- Botanique et utilisation	80
5-1-2- Travaux antérieurs	80
5-1-3- Résultats et discussion	81
5-2- <i>Ocimum canum</i> Sims L.	85
5-2-1- Botanique et utilisation	85
5-2-2- Travaux antérieurs	86
5-2-3- Résultats et discussion	90
5-3- <i>Ocimum gratissimum</i> L.	93
5-3-1- Botanique et utilisation	93
5-3-2- Travaux antérieurs	94
5-3-3- Résultats et discussion	98
<b>6 – FAMILLE DES MYRTACEAE</b>	<b>101</b>
6-1- <i>Pimenta racemosa</i>	101
6-1-1- Botanique et utilisation	101
6-1-2- Travaux antérieurs	102
6-1-3- Résultats et discussion	105
<b>7 – FAMILLE DES POACEAE</b>	<b>108</b>
7-1- <i>Cymbopogon giganteus</i>	108
7-1-1 - Botanique et utilisation	108
7-1-2 - Travaux antérieurs	109
7-1-3 - Résultats et discussion	111
7-2- <i>Cymbopogon nardus</i> (Linn.) Rendle.	119
7-2-1 - Botanique et utilisation	119
7-2-2 - Travaux antérieurs	119
7-2-3 - Résultats et discussion	122

---

<b>8 – FAMILLE DES RUTACEAE</b>	<b>125</b>
8-1- <i>Clausena anisata</i> (Willd) J. D. Hook ex. Benth.	125
8-1-1- Botanique et utilisation	125
8-1-2- Travaux antérieurs.	126
8-1-3- Résultats et discussion	129
<b>9 – FAMILLE DES VERBENACEAE</b>	<b>135</b>
9-1- <i>Lippia multiflora</i> Moldenke	135
9-1-1- Botanique et utilisation	135
9-1-2- Travaux antérieurs	136
9-1-3- Résultats et discussion	139
<b>10- Conclusion sur les analyses chimiques</b>	<b>142</b>
<b>Troisième Partie: EVALUATIONS BIOLOGIQUES</b>	<b>144</b>
<b>1- Propriétés antiradicalaires des huiles essentielles</b>	<b>145</b>
1-1- Généralités sur les antiradicalaires	145
1-1-1- Définitions	145
1-1-2- Mécanismes de l'oxydation des acides gras	145
1-1-3- Nature et rôle des inhibiteurs des phénomènes d'oxydation dans les acides gras	147
1-1-3-1- Les antiradicalaires ou antioxydants primaires	147
1-1-3-2- Les antioxydants secondaires ou préventifs	148
1-1-3-3- Les antioxydants naturels et leur importance	148
1-2- Résultats et discussion	149
1-2-1- Principe de la mesure	150
1-2-2- Mise au point des conditions expérimentales: étude de composés antiradicalaires commerciaux	151
1-2-3- Structure de quelques antioxydants phénoliques de références	155
1-2-4- Etude des activités antiradicalaires des huiles essentielles	155
1-2-4-1- Screening des huiles essentielles pures	155
1-2-4-2- Huiles essentielles «faiblement actives»	157
1-2-4-3- Huiles essentielles «moyennement actives»	164
1-2-4-3-1- Echantillons d'huiles essentielles de <i>Clausena anisata</i>	165

---

1-2-4-3-2- Huile essentielle de <i>Cymbopogon nardus</i>	168
1-2-4-3-3- Huile essentielle d' <i>Annona squamosa</i>	170
1-2-4-4- Huiles essentielles «très actives»	171
1-2-4-4-1- Huile essentielle d' <i>Aeolanthus pubescens</i>	172
1-2-4-4-2- Huile essentielle d' <i>Ocimum gratissimum</i>	178
1-2-4-4-3- Huiles essentielles de <i>Pimenta racemosa</i>	181
<b>2- Propriétés anti-inflammatoires des huiles essentielles</b>	<b>188</b>
2-1- Généralités	188
2-1-1- Inflammation	188
2-1-1-1- Définition	188
2-1-1-2- Causes de l'inflammation	188
2-1-1-3- Classification des inflammations	188
2-1-1-4- Mécanisme d'action	189
2-1-2- Anti-inflammatoire	192
2-1-2-1- Définition	192
2-1-2-2- Classes d'anti-inflammatoires	192
2-1-2-2-1- Les corticoïdes ou anti-inflammatoires stéroïdiens	192
2-1-2-2-2- Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	192
2-1-2-2-2-1- Inhibiteurs des cyclooxygénases, AINS	193
2-1-2-2-2-2- Inhibiteurs des lipoxygénases	193
2-1-3- Rôle de la 5-lipoxygénase dans le processus de l'inflammation	193
2-1-4- Etude de l'inhibition des lipoxygénases in vitro	194
2-1-5- Méthodes	196
2-1-6- Quelques résultats des tests de l'inhibition de la 5-lipoxygénase.	196
2-2- Résultats et discussion	198
2-2-1- Screening des huiles essentielles	198
2-2-2- Huiles essentielles « non actives »	198
2-2-3- Huiles essentielles « moyennement actives »	200
2-2-4- Huile essentielle « active » : <i>Cymbopogon giganteus</i>	208
<b>3- Conclusion sur les activités antiradicalaires et anti-inflammatoires</b>	<b>214</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>215</b>

<b>Quatrième Partie: PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>219</b>
<b>1-Traitement du matériel végétal et Extraction</b>	<b>220</b>
1-1- Traitement du matériel végétal	220
1-2- L'extraction	220
<b>2- Analyse des huiles essentielles</b>	<b>221</b>
2-1- Analyse par chromatographie en phase gazeuse	221
2-1-1- Caractéristiques techniques de l'équipement	221
2-1-2- Conditions de travail	222
2-2- Analyse par chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse	222
2-2-1- Caractéristiques techniques de l'équipement	222
2-2-2- Conditions de travail:	223
2-2-3- Chromatographie liquide solide.	223
2-2-3-1- Chromatographie sur couche mince	223
2-2-3-2- Fractionnement par chromatographie liquide/solide sur colonne	223
2-2-3-3-Identification par comparaison avec des échantillons authentiques obtenus par hémisynthèse.	224
<b>3- Tests biologiques</b>	<b>225</b>
3-1- Activité antiradicalaire	225
3-1-1- Synthèse du chavicol	225
3-1-1-1- Réactifs	225
3-1-1-2- Mode opératoire	225
3-1-2- Tests antiradicalaires	226
3-1-2-1-Réactifs	226
3-1-2-2-Etude spectrophotométrique du pouvoir antiradicalaire	227
3-1-2-2-1-Méthode	227
3-1-2-2-2- Préparation des solutions	227
3-1-2-2-2-1-Solution de DPPH 100 $\mu$ M	227
3-1-2-2-2-2-Préparation du blanc	227
3-1-2-2-2-3- Préparation des solutions antiradicalaires à tester	228
3-2- Activités Anti-inflammatoires	230
3-2-1-Réactifs	230
3-2-2- Etude spectrophotométrique du pouvoir anti-inflammatoire	230
3-2-2-1- Méthodes	230

3-2-2-2- Préparation des solutions	231
3-2-2-3 Conditions de mesure	232
3-2-2-4-Cinétique	232
3-2-2-5-Traitement des résultats	233
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>234</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>263</b>

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué en cotutelle aux :

❖ Laboratoire d'étude et de Recherche en Chimie Appliquée (LERCA) de l'Université d'Abomey-Calavi dirigé par le Professeur Dominique C. K. SOHOUNHLOUE.

❖ Laboratoire de Chimie Biomoléculaire de l'Université de Montpellier 2 dirigé par le Professeur Jean-Louis MONTERO que je remercie vivement pour m'avoir accepté dans son laboratoire, conseillé et aidé.

❖ Malgré toutes ses occupations, j'ai eu la chance de pouvoir travailler avec le Professeur Dominique C. K. SOHOUNHLOUE. Sa compréhension des problèmes chimiques et son intuition sont, je crois, exceptionnelles et cette thèse ne représente qu'une infime partie des idées qu'il m'a suggérées (celles que j'ai pu comprendre).

❖ Mon autre «maître à penser» qui a avec Dominique C. K. SOHOUNHLOUE guidé mes débuts dans la recherche a été le Professeur Chantal MENUT. Dans la bonne humeur et avec élégance elle a su, pendant les séjours que j'ai passé dans son laboratoire à l'Ecole de Chimie à Montpellier, me communiquer son enthousiasme pour la chimie le goût du travail bien fait et la rigueur dans le travail scientifique. Sa constante sollicitude restera à jamais gravée dans ma mémoire. Je lui suis reconnaissant de participer aux travaux de ce jury.

❖ Je remercie vivement monsieur Faustin Sié SIB Professeur à l'Université de Ouagadougou et monsieur Jean-Claude CHALCHAT Professeur à l'Université de Clermont-Ferrand II qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail.

Je me dois d'associer à ces remerciements:

❖ le Professeur Jean-Marie BESSIERE qui, par son expertise et sa disponibilité, a permis de venir à bout de tous les tableaux de composition

❖ Madame le Professeur Huguette AGNANIET (Université de Massokou-Franceville-Gabon), pour ses conseils et soutiens.

❖ Une des grandes forces du LERCA est le contact et l'interaction permanente entre chercheurs; j'ai eu l'occasion de travailler avec les Professeurs SOCLO, AVLESSI, SOUMANOU, les Docteurs Justine DANGO, Valentin WOTTO et Edwige AHOUSI.

❖ Le petit groupe des thésards au LERCA est très vivant; j'ai ainsi partagé un bureau avec Sébastien, Fidèle, Jean Pierre, Pascal, Sophie, Diane, Martin et Vahid.

❖ Cette thèse n'existerait pas sans la personne qui en a assuré la réalisation technique, Arnaud SAGBO.

❖ Mes remerciements vont au Service de la Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'Ambassade de France près le Bénin qui a soutenu financièrement ce travail.

## DEDICACE

*Je dédie ce travail:*

*A mon cher et regretté père Calixte dont l'exemple  
et le souvenir sont toujours à mon esprit;*

*A ma mère, Célestine, toi qui as su guider mes pas vers l'école,  
trouve ici l'expression de ma profonde gratitude;*

*A mon épouse Léonie, et nos enfants Jomini, Amour et Calixta retrouvez un  
motif réel de fierté par ce travail;*

*A mes frères, sœurs, beaux frères, belles sœurs, neveux et nièces  
merci pour vos encouragements;*

*A tous ceux qui me sont chers.*

# COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

## I- Publications

1- Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus tereticornis* Sm.

***C. R. Chimie*, 2004, 7, 1051-1055.**

2- Composition chimique, et activités biologiques de l'huile essentielle de *Lantana camara* Linn.

***C. R. Chimie*, 2004, 7, 1101-1105.**

3- Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook.

***C. R. Chimie*, 2004, 7, 1057-1061.**

4- Aromatic Plants of Tropical West Africa. Part XIV. Chemical and biological investigation of *Lippia multiflora* Mold. essential oil from Benin.

***J. Essent. Oil Res.*, 2005, 17, 405-407.**

5- Aromatic Plants of Tropical West Africa. Part XV. Chemical and biological evaluation of leaf essential oil of *Commiphora africana* from Benin.

***J. Essent. Oil Res.*, 2005, 17, 569-571.**

6- Investigation on the essential oil of *Cymbopogon giganteus* from Benin for its potential use as an anti-inflammatory agent.

***The International Journal of Aromatherapy*, 2006, 16, 37-41.**

7- Variability in the chemical compositions of the essential oils of five *Ocimum* species from tropical african area.

***J. Essent. Oil Res.*, 2006, 18, 194-199.**

## **II-Communications affichées**

- 1- VI<sup>ème</sup> Symposium International d'Aromathérapie et de Plantes Médicinales: Grasse 5-7 mars **2004**

Etude des cinq espèces d'*Ocimum gratissimum* originaires d'Afrique: utilisation dans la Pharmacopée traditionnelle africaine. Chimie de leurs huiles essentielles.

- 2- VII<sup>ème</sup> Symposium International d'Aromathérapie et de Plantes Médicinales: Grasse 18-20 mars **2005**

Activité anti-inflammatoire potentielle des huiles essentielles: évaluation de leur activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase.

# INTRODUCTION

---

## **INTRODUCTION**

Depuis des millénaires, l'utilisation des plantes aromatiques est une composante de la culture humaine. La production des matières de base provenant du règne végétal met en œuvre des techniques traditionnelles, aussi rustiques que la cueillette ou l'emploi d'alambics artisanaux. Elle s'exerce aussi dans le cadre de complexes industriels puissants et met en œuvre des technologies les plus sophistiquées de chimie fine.

En Afrique, les plantes aromatiques ont toujours été employées en médecine traditionnelle; ces plantes se différencient des autres par leurs principes odoriférants appelés, après extraction, «huiles essentielles» ou «essences de plantes» ou encore «extraits aromatiques».

Selon les études bibliographiques, 90% des plantes aromatiques poussent dans les régions tropicales et plus précisément dans les pays en voie de développement. Ces plantes se répartissent dans un nombre restreint de familles du règne végétal parmi lesquelles on peut citer les Annonaceae, les Burseraceae, les Chenopodiaceae, les Guttiferae, les Labiatae, les Myrtaceae, les Poaceae, les Rutaceae, les Verbenaceae etc.

L'exploitation de ces plantes peut constituer pour les pays en voie de développement une source potentielle économique non négligeable.

Dans la tradition africaine, bon nombre de plantes endémiques sont fréquemment utilisées dans la pharmacopée par des tradipraticiens à des fins thérapeutiques pour soulager les maux les plus divers, bénins ou plus graves comme: les affections cutanées, les troubles respiratoires, la fièvre, les maladies digestives ou cardio-vasculaires.

Le marché des huiles essentielles est florissant en raison de leurs divers domaines d'application; mais, bien que possédant une flore riche et diversifiée les pays africains sont quasiment absents de ce marché porteur et de ces secteurs de pointe, tels que l'industrie chimique, l'aromatique, la parfumerie, la pharmacie et l'aromathérapie.

Malgré le faible coût d'investissement nécessaire à la production des huiles essentielles, la flore Béninoise, dont le potentiel disponible est riche en plantes aromatiques, demeure à ce jour hélas inexploitée. Ainsi, la composition chimique et les propriétés biologiques restent non étudiées pour un nombre important de plantes.

Les objectifs principaux de notre travail étaient : l'étude chimique et l'évaluation des propriétés antiradicalaires et anti-inflammatoires d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques d'origine béninoise:

*Aeolanthus pubescens*

*Annona muricata*

*Annona squamosa*

*Chenopodium ambrosioides*

*Clausena anisata*

*Cymbopogon gignanteus*

*Cymbopogon nardus*

*Commiphora africana*

*Monodora myristica*

*Ocimum canum*

*Ocimum gratissimum*

*Pentadesma butyracea*

*Pimenta racemosa*

*Xylopi aethiopica*

*Lippia multiflora*

Le choix de ces évaluations biologiques est basé sur les données suivantes : le pouvoir antiradicalaire des extraits végétaux (notamment des huiles essentielles) est susceptible d'être intéressant dans l'industrie agroalimentaire (où les antioxydants sont utilisés pour retarder la dégradation des aliments contenant des corps gras), mais également en cosmétique ou dans le domaine de la phytothérapie, où les espèces radicalaires sont associées à la notion de «vieillesse». Le phénomène d'inflammation est également une des cibles privilégiées des préparations cosmétiques, de certains médicaments et l'utilisation d'extraits naturels pour le combattre est un des enjeux de l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

L'ensemble de notre travail est présenté en trois parties:

- la première partie présente l'état général des connaissances actuelles sur les huiles essentielles ainsi que sur leurs méthodes d'extraction et d'analyse.
- la deuxième partie est consacrée à l'étude des espèces précédemment citées: les caractéristiques botaniques, les exigences agronomiques et méthodes culturales ainsi que les utilisations sont brièvement décrites. Après une mise au point des travaux de la littérature, les résultats obtenus sont ensuite présentés et discutés.
- la troisième partie, donne les résultats des tests biologiques (activités antiradicalaires, anti-inflammatoires réalisés sur les échantillons d'huiles essentielles) et des investigations menées pour déterminer le ou les composés responsables de ces activités, dans la perspective d'une valorisation à des fins thérapeutiques ou pour des applications cosmétiques.

Première Partie:

**GENERALITES SUR LES HUILES  
ESSENTIELLES**

## 1- Historique

L'histoire des plantes aromatiques est souvent liée à celle de l'humanité. Déjà depuis l'Égypte Antique (environ quatre mille cinq cent ans avant Jésus-Christ), l'homme utilise largement les huiles balsamiques, les onguents parfumés, les résines aromatiques, les épices et les végétaux odoriférants, que se soit en rite, en magie, en thérapeutique, en alimentation ainsi que dans des pratiques de la vie courante. On trouve par exemple, chez les peuples de l'Égypte ancienne, des rites où le parfum sort insensiblement du naturel et devient un élément de l'art de guérir.

En Chine, les premiers témoignages de l'usage des parfums se situent à une date un peu intérieure au 1<sup>er</sup> millénaire avant notre ère. Il en est de même aux Indes ; plus tard, la liturgie bouddhique prévoit de laver les statues des Dieux avec des eaux parfumées. Les hébreux s'inspirèrent de l'Égypte et utilisèrent à leur tour des aromates et parfums. La civilisation du Nil transmet sur la pierre de ses monuments toute une iconographie des procédés de préparation des huiles, des baumes et des liqueurs fermentées. Un peu plus tard, par les conquêtes, les connaissances alors accessibles furent transmises aux Romains en passant par les Grecs. Ainsi, pendant le règne de l'Empire romain, sous les premiers Césars, les connaissances relatives aux parfums sont déjà nombreuses.

En Europe, vers les XI<sup>e</sup> et XIII<sup>e</sup> siècles et par l'entremise des diverses croisades, on assiste à l'apparition de nombreuses matières aromatiques. C'est par Venise, centre d'échange très actif à cette époque, qu'arrivent les épices (poivre cannelle, muscade, girofle) ainsi que de nombreuses substances aromatiques (musc, civette, benjoin, santal, camphre etc..). Mais malgré les informations partielles issues des historiens grecs (Hérodote) et romains (Pline), en passant par Dioscoride, sur les méthodes utilisées pour la préparation de l'huile de térébenthine, l'art de la distillation sert avant tout à la préparation des eaux distillées. Au Moyen Age, c'est à Arnold de Villanova, médecin catalan (1235-1311) qu'on attribue la première description de la distillation d'une huile essentielle; il fait aussi l'apologie des qualités médicinales des eaux distillées.

Au début de la Renaissance les manuscrits vénitiens mentionnent les huiles distillées de sauge et de romarin. C'est à cette époque que Paracelse, médecin suisse (1493-1541), émet sa théorie de la «Quinta essentia» (Quintessence). Pour lui, cette quintessence est la partie réellement efficace de chaque drogue et elle doit être le but de la pharmacie. Cette théorie est à l'origine de la recherche sur la préparation des huiles essentielles. Il est même évident que le

terme actuel d'huile essentielle rappelle le concept de Paracelse: «Quinta essentia». A cette même époque, les artisans provençaux préparaient des «essentiels». En effet, en 1500 et 1507, un médecin strasbourgeois, Brunschwig publie ses deux volumes sur la distillation, intitulés : «Liber de Arte distillandi», dans cet ouvrage on trouve la mention des huiles essentielles: de térébenthine, de bois de genièvre, de romarin et d'aspic.

Vers 1565, la Cour de Catherine de Médicis, entretient le goût des huiles, des pommades, des savons et des gants parfumés qui jusqu'alors venaient de Gènes, de Bologne ou d'Alicante; a établi à Chaillot la première fabrique de savons et les statuts de 1582 contribuent à former un artisanat de parfumeurs-gantiers.

Par ailleurs, on avait noté depuis longtemps l'affinité des corps gras pour l'odeur; sur cette observation on a imaginé l'enfleurage, technique de l'épuisement des substances odorantes par des huiles grasses; elle fut largement utilisée si bien que, vers le début du XIX<sup>e</sup> siècle, cette technique avait pratiquement atteint le degré de perfectionnement actuel. Mais la nécessité d'une main d'œuvre importante a progressivement condamné ce procédé.

A la même époque, les travaux de Chaptal, ont conduit à la 1<sup>ère</sup> distillerie industrielle qui permettait l'obtention de l'alcool azéotropique; cette invention capitale ouvrit la voie à des applications entièrement nouvelles, aussi bien pour les lavages des pommades que pour les infusions. Mais ces solutions étaient malaisées à manipuler et à transporter, Louis Maximin Roure envisagea donc de concentrer ces lavages et il réalisa ainsi pour la première fois les «essences concrètes de pommades». Dès 1870, le même Louis Maximin Roure entreprit des travaux en cherchant à utiliser d'autres solvants volatils. Malheureusement, les moyens technologiques limités de l'époque ne lui permirent pas de mener ces essais à bien. Ce furent Naudin et Schneider, en 1879, et Massignon, en 1880, qui réussirent l'extraction des produits floraux avec de l'éther de pétrole. Mais c'est Louis-Maximin Roure qui obtint les essences appelées aujourd'hui «Absolues» par l'extraction des pommades avec de l'alcool.

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, les procédés de fabrication des huiles essentielles étaient amenés à la quasi perfection, cependant, ils n'apportaient rien à la connaissance de leur composition intime.

Il fallut attendre les travaux de O. Wallach (1880-1914) pour commencer à connaître en partie la composition des huiles essentielles. Il rédigea un ouvrage constitué de 180 mémoires intitulé «Terpène und Camphor» et, dès 1887, il supposa que ces composés «doivent être construits à partir d'unités isopréniques». Trente ans plus tard, R. Robinson

(Prix Nobel de chimie en 1947) précisa cette règle isoprénique en indiquant que la liaison de ces unités doit s'effectuer de façon «tête-queue».

A côté de l'œuvre importante de Wallach, d'autres chercheurs ont travaillé dans le même domaine; ainsi Adolf von Baeyer, formé comme Wallach dans le laboratoire de Kékulé, ont contribué à la naissance de la chimie aromatique. Aux côtés de ces illustres promoteurs de la chimie des substances odorantes volatiles, Temann, Semmler, Wagner, Perkin, Bouveault, Dupont etc. ont également contribué largement à l'évolution des connaissances.

Pourtant, malgré ces efforts considérables, seul un nombre relativement restreint de ces substances aromatiques étaient parfaitement connues au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Depuis, avec le développement des méthodes d'analyses, les connaissances dans le domaine des substances odorantes volatiles se sont considérablement accrues. On connaît actuellement plusieurs centaines de monoterpénoïdes; de même dans le groupe des sesquiterpènes où, il y a vingt ans, une trentaine de structures seulement avaient été élucidées, on connaît actuellement près de mille composés répartis en 200 squelettes (Teisseire, 1991; Guenther, 1948a; Paris et Moyse, 1976).

## **2- Définition et Composition chimique**

### **2-1- Définition**

L'huile essentielle est un mélange de produits ou un produit obtenus à partir d'une matière d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau (ou par hydrodistillation), soit par expression de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation à sec.

Cette définition est assez restrictive car elle exclut autant les produits obtenus par extraction à l'aide des solvants organiques que ceux obtenus par d'autres procédés (fluide supercritique, enfleurage, etc.). Les produits obtenus par ces procédés ont une importance aussi bien dans l'industrie des parfums et arômes que dans la parapharmacopée. Nombre de nouveaux termes ont dû être précisés ou définis.

Les teintures : ce sont des mélanges de produits obtenus par macération de la matière végétale dans un alcool (pur ou de titre variable).

Les concrètes: ce sont des extraits à odeur caractéristique obtenus par extraction à l'aide d'un solvant organique, de la matière végétale fraîche.

Les absolues : elles résultent de l'extraction des concrètes par l'alcool à la température ambiante.

Les résinoïdes : elles proviennent de l'extraction de la matière végétale sèche par un solvant organique.

Les pommades florales : ce sont des corps gras parfumés obtenus à partir des fleurs, soit par enfleurage à froid (diffusion des constituants odorants des fleurs dans les corps gras), soit par enfleurage à chaud (digestion ou immersion des fleurs dans les corps gras fondus) (AFNOR, 2000).

## 2-2- Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges de constituants dont les principaux sont des carbures terpéniques (aliphatiques, mono, bi et parfois tricycliques) et leurs dérivés oxygénés (alcools, esters, aldéhydes, cétones, oxydes et/ou peroxydes). Mais on rencontre aussi dans les huiles essentielles des composés lipidiques linéaires comme des acides organiques à faible poids moléculaire et leurs esters (formique, acétique, valérique etc.), des alcools, des aldéhydes, des cétones et des hydrocarbures aliphatiques. On trouve enfin plusieurs familles de dérivés aromatiques: des aldéhydes (anisique, cuminique, cinnamique etc.), des phénols et leurs esters (thymol, eugénol, acétate de thymyle etc.) et des hydrocarbures (allylbenzene, pentylbenzene...).

Certaines huiles essentielles peuvent contenir des coumarines (bergaptène, ombelliférones etc.) et des produits de structures irrégulières avec des atomes d'azote (dérivés indoliques etc.) ou de soufre (polythiophènes, allyl et aryl isothiocyanates etc.) (Paris et Moyses, 1976).

## 3- Biosynthèse des constituants volatils des huiles essentielles

### 3-1- Origine

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour essayer d'expliquer l'origine des constituants volatils dans la plante.

Actuellement, il est admis que deux voies métaboliques secondaires rendent bien compte de la formation de la grande majorité des constituants des huiles essentielles :

- la voie de l'acide mévalonique qui conduit à la formation des constituants isopréniques,

- la voie de l'acide shikimique, précurseur des composés aromatiques.

La figure 1 nous donne les principales voies biosynthétiques des constituants volatils naturels.

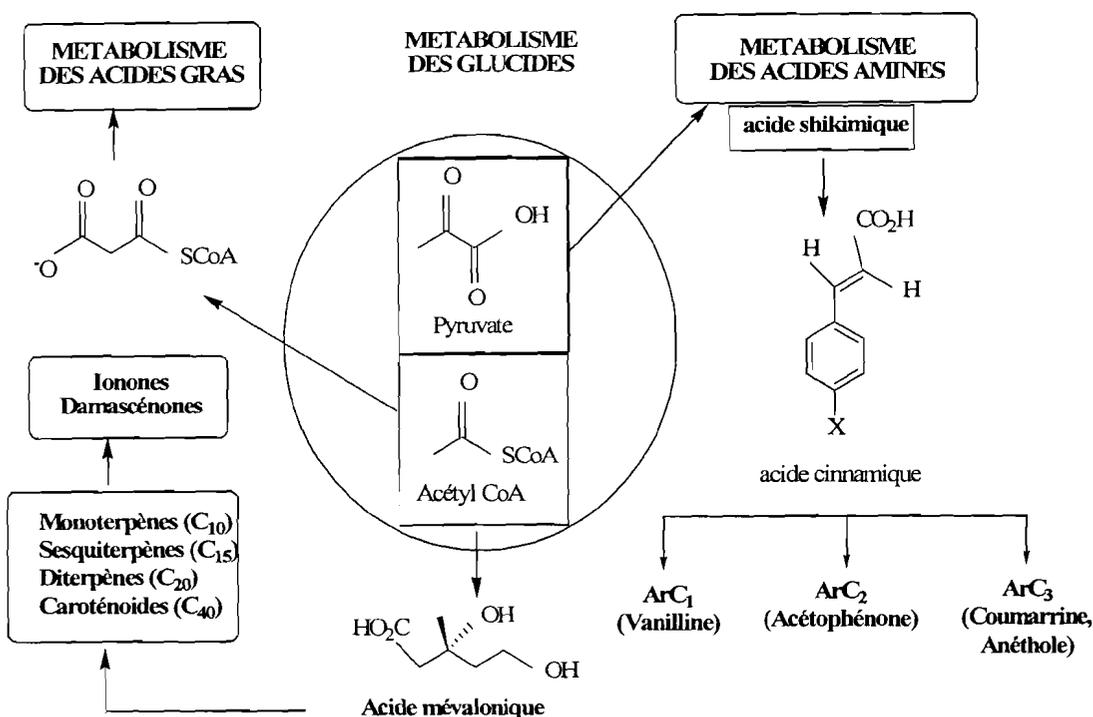


Figure 1: Principales voies biosynthétiques des composés volatils naturels (Bruneton 1999)

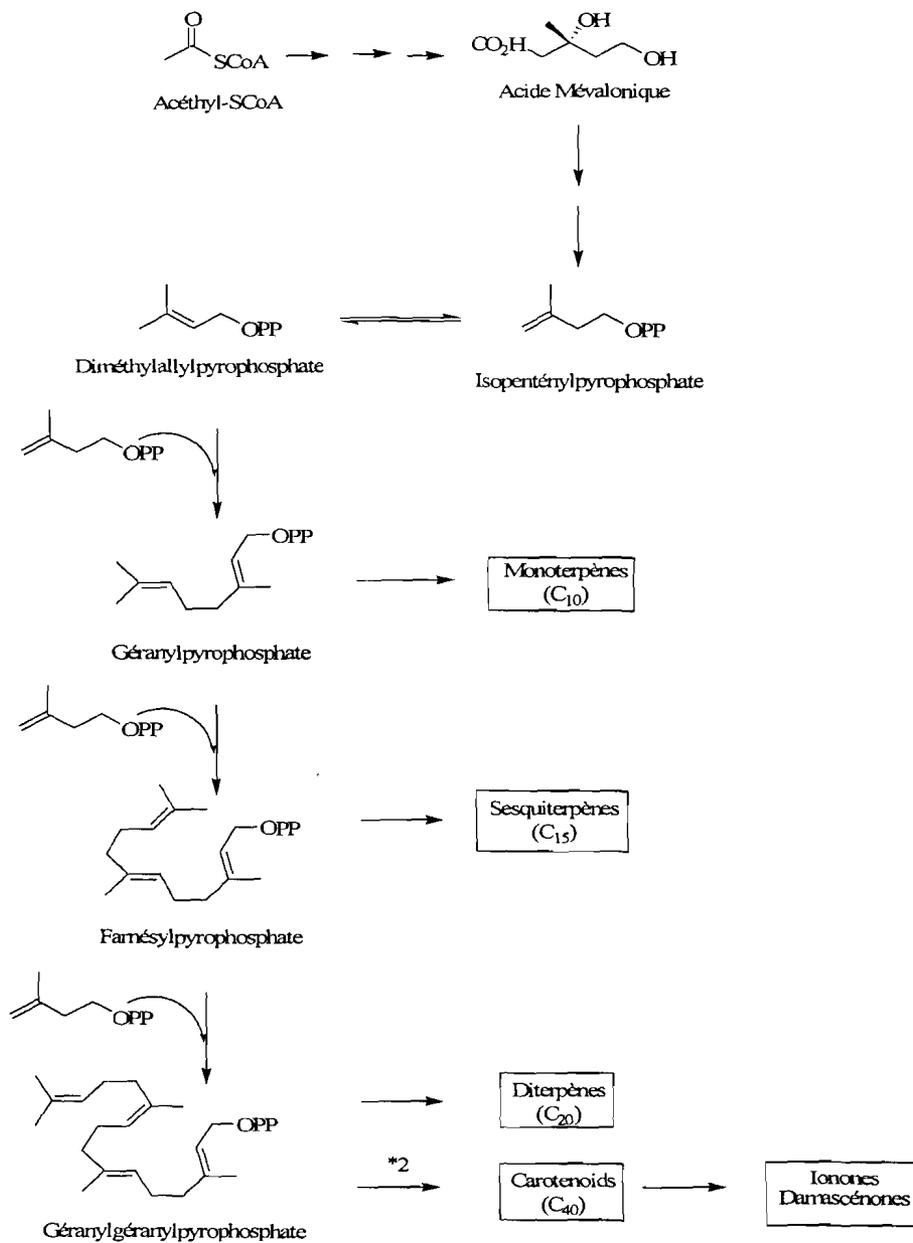
### 3-1-1- Biosynthèse des terpènes

#### 3-1-1-1- Condensation et isomérisation

Par le métabolisme des sucres, les végétaux produisent l'acétyl coenzyme A qui, par une série de réactions faisant intervenir la condensation de 3 molécules, donne l'acide mévalonique. Par décarboxylation et phosphorylation, cet acide donne une unité penta carbonée: l'isopenténylpyrophosphate (IPP). Cette dernière s'isomérisé en diméthylallylpyrophosphate très réactif, (DMAP), susceptible d'alkyler divers sites nucléophiles.

La condensation entre l'IPP et le DMAP conduit au géranylpyrophosphate (GPP) à partir duquel, par une série de réactions catalysées par différents enzymes, vont se former des monoterpènes acycliques. Une nouvelle condensation entre le DMAP et le GPP conduit au farnésylpyrophosphate (FPP), précurseur des sesquiterpènes. Enfin l'alkylation du FPP par le

DMAP donne le précurseur des diterpènes : le géranylgéranylpyrophosphate (GGPP) (figure : 2) (Mann J., 1987).



Mann J., *Secondary Metabolism*, 2<sup>nd</sup> Ed., Clarendon Press, 1987.

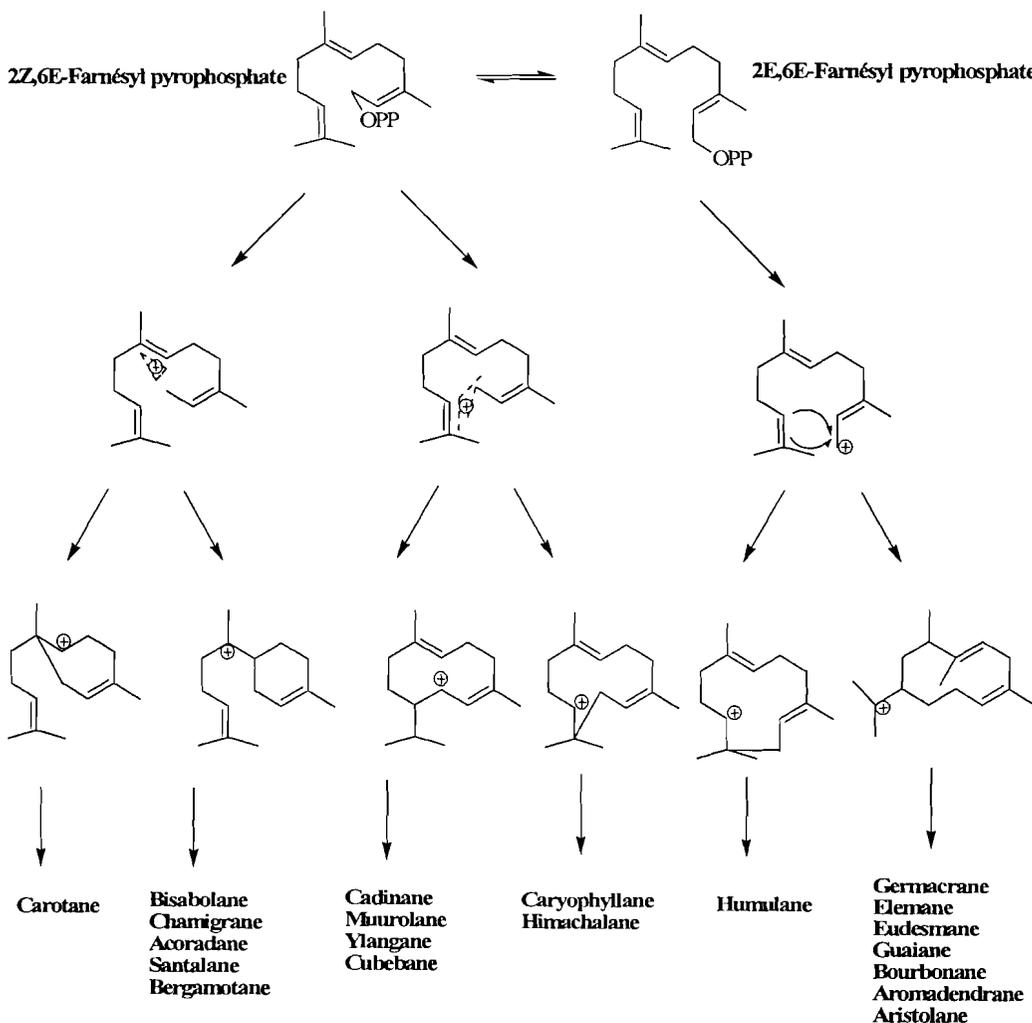
Figure 2: Voie de l'Acide mévalonique

### 3-1-1-2-Cyclisation

Le farnésylpyrophosphate, sous ses deux configurations le (2Z, 6E) et le (2E, 6E) est à l'origine de la quasi-totalité des constituants, sesquiterpéniques. Dans la figure 3 sont représentés les principaux cations impliqués dans les différentes réactions de cyclisation ultérieures (Mac Caskill et Croteau, 1994).

Chez les plantes, ces cyclisations sont catalysées par des enzymes appelés cyclases. A partir d'un même précurseur acyclique, des cyclases spécifiques produisent différents squelettes. A l'heure actuelle, les difficultés d'isolement de ces enzymes induisent un doute quant à leur rôle dans la catalyse spécifique car on ne sait pas :

- 1- S'il existe une cyclase pour chaque cycle formé,
- 2- Si une même cyclase peut conduire au même produit dans deux espèces végétales différentes,
- 3- Si certaines cyclases sont capables de former individuellement plusieurs squelettes.



Mann J., Secondary Metabolism, 2<sup>nd</sup> Ed. Clarendon Press, 1987.

Figure 3: Cyclisation des principaux sesquiterpènes

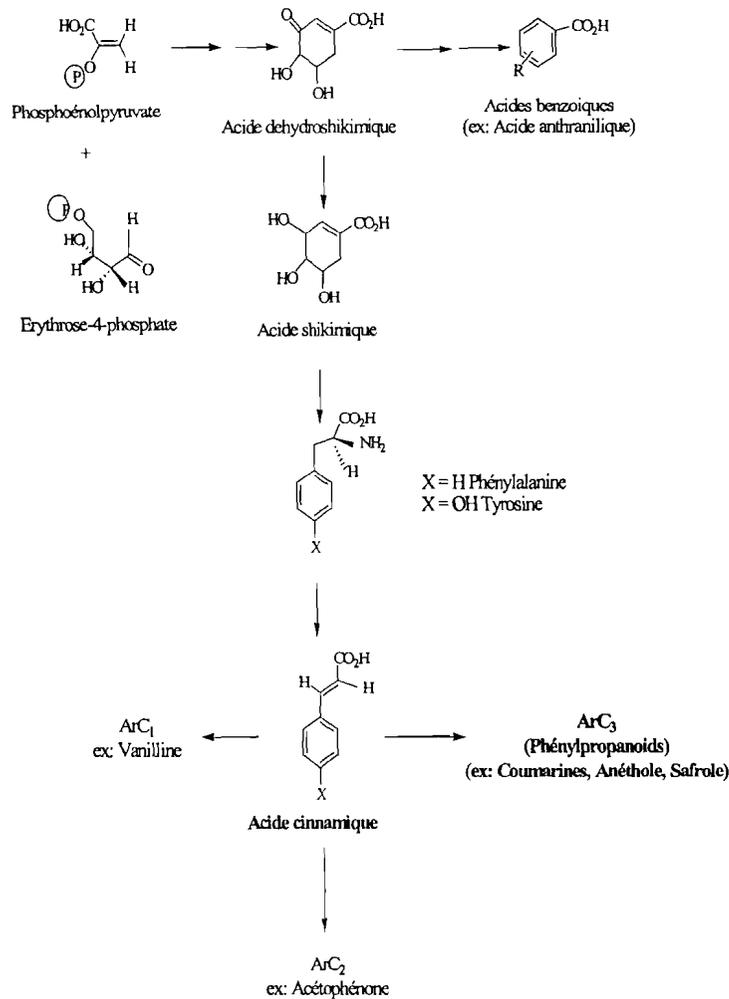
### 3-1-1-3- Réactions secondaires, fonctionnalisation

Une fois les squelettes formés, des réactions secondaires peuvent intervenir telles que: des réactions d'aromatisation, des oxydations, des réductions, des déshydrogénations, des éliminations, etc..... Elles sont également catalysées par des enzymes spécifiques : oxydases, déshydrogénases, réductases etc....et conduisent aux dérivés fonctionnalisés des structures de «base».

### 3-1-2- Biosynthèse des constituants aromatiques

L'autre «famille chimique» régulièrement rencontrée dans les huiles essentielles, mais de façon moins systématique que les terpénoïdes, est constituée par les dérivés aromatiques issus d'une 2<sup>ème</sup> voie métabolique dite de l'acide shikimique (figure 4).

L'acide shikimique résulte d'une série de conversions biogénétiques dont la première étape est la condensation aldolique stéréospécifique entre l'érythrose-4-phosphate et le phosphoénolpyruvate. C'est à partir de cet important précurseur que se forment les différents composés benzéniques dérivés de l'acide benzoïque, composés aromatiques substitués par 1, 2 ou 3 carbones et leurs dérivés. (figure 4) (Mann J., 1987).



Mann J., *Secondary Metabolism*, 2nd Ed., Clarendon Press, 1987.

Figure 4: Voie de l'Acide Shikimique

### 3-1-3-Autres constituants volatils

Outre les deux familles principales que forment les terpènes et les dérivés aromatiques, il existe d'autres constituants des huiles essentielles: ce sont les composés «aliphatiques»; ils sont souvent rencontrés mais toujours en petites quantités. Ils dérivent des acides gras, et sont donc directement issus de l'acétyl CoA (figure 1).

Enfin, on peut citer d'autres constituants qui sont rarement rencontrés dans les huiles essentielles et généralement caractéristiques d'une famille des composés soufrés: (isothiocyanates, thiols, disulfures), des composés azotés : indole, prénylindole etc....).

### 3-2- Rôle des huiles essentielles dans la plante

Longtemps considérés comme métabolites «secondaires», c'est-à-dire des produits métaboliques sans intérêt biologique, les constituants volatils ont un rôle encore mal défini dans la plante. Nous nous contenterons d'énumérer ici quelques éléments.

Il est admis depuis longtemps que les constituants volatils des plantes jouent un rôle important en écologie, plus particulièrement dans leur sélection par les prédateurs herbivores mais également dans les relations plantes-insectes pollinisation (**Gibernau, 1997**).

Les constituants des huiles essentielles sont considérés par Lutz comme des modérateurs des réactions d'oxydation intramoléculaire qui protègent la plante contre les agents atmosphériques. Selon lui, certains de ces composés se comporteraient aussi comme source d'énergie à la suite d'une baisse de l'assimilation chlorophyllienne (**Lutz, 1940**).

**Bouquet (1972)** considère que certains de ces produits seraient des composés intermédiaires du métabolisme et qu'ils se trouveraient à l'état libre durant certaines périodes en relation avec l'activité végétative de la plante.

Les travaux de **Nicholas (1973)** ont montré que les mono et sesquiterpènes peuvent jouer des rôles aussi variés qu'importants dans la relation des plantes avec leur environnement. C'est le cas du 1,8-cinéole et du camphre qui inhibent la germination des organes infectés ou la croissance des agents pathogènes issus de ces organes.

**Erman (1985)** dégage, le rôle incontestable des huiles essentielles dans la pollinisation et la dispersion des diaspores grâce à leur pouvoir attracteur sur les insectes pollinisateurs, cette relation est d'une grande importance écologique et physiologique. **Bruneton (1999)** estime que la volatilité et l'odeur marquée de ces essences en font des éléments de la communication chimique.

Une mise au point de **Croteau (1986)** montre que les huiles volatiles auraient également un rôle de mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique au profit de la plante. Elles réguleraient la transpiration diurne en absorbant les rayons ultraviolets par leurs constituants insaturés. La présence des constituants volatils et leur teneur dans les plantes à huiles essentielles seraient donc directement liées au processus chlorophyllien.

Indépendamment des théories avancées ci-dessus (théories complémentaires), il semble que les compositions très variées des huiles essentielles autorisent des messages complexes et sélectifs; chercher un rôle propre à chaque constituant peut alors paraître illusoire.

### 3-3-Localisation dans la plante

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal; cependant, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles: Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Lamiacées, Annonacées, etc.

Tous les organes peuvent en renfermer: les sommités fleuries (Lavandes, Menthes, Mélisse...), les racines ou rhizomes (Vétiver, Gingembre), les écorces (Cannelle), les fleurs (Ylang-Ylang), le bois (Camphrier), les fruits (Persil, Citrus), les graines (Poivre). Dans une même espèce, on peut rencontrer les huiles essentielles simultanément dans des organes différents et la composition de celles-ci peut varier d'un organe à l'autre. En outre cette composition peut varier chez une même espèce selon les conditions climatiques et édaphiques. Le plus souvent, en climat chaud, la teneur en huiles essentielles est plus élevée **(Guenther, 1948; Mahmoud, 1992).**

Au niveau de l'organe de la plante, les huiles essentielles peuvent se former dans des cellules non différenciées ou plus grosses (Lauracées, Magnolacées). Généralement, elles sont localisées dans des organes sécréteurs, variables suivant les familles botaniques: poils des Lamiacées et des Composées: l'huile essentielle s'accumule sous la cuticule; poches sécrétrices schizogènes des Myrtacées qui, résulte de la division répétée d'une cellule et de l'écartement des cellules filles laissant un méat où s'accumule l'essence; chez les Rutacées poches schizolysigènes avec formation d'un méat, puis lyse d'une partie du tissu sécréteur de bordure. On observe aussi, souvent, la présence de canaux sécréteurs (Conifères, Térébinthacées...) **(Paris et Moyse, 1976).**

On désigne quelque fois par essence, les produits odorants non préformés chez le végétal, mais provenant de l'hydrolyse enzymatique d'hétérosides (essence d'amandes amères, essences sulfurées des Crucifères) **(Paris et Moyse, 1976).**

### 4- Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont étroitement liées à l'histoire de l'humanité. En effet, depuis les anciennes civilisations, l'homme utilise les substances odorantes à chaque instant de sa vie quotidienne; les principaux domaines d'application sont les suivants:

1 °) L'alimentation: les huiles essentielles entrent dans la préparation des aliments sous

forme d'aromates ou d'épices et parfois comme condiments. C'est le cas des *Ocimum* (les basilics), du *Zingiber officinalis* (gingembre), du *Petroselinum crispum* (persil), des *Piper* (poivres), des extraits des *Citrus* etc.

2°) L'industrie de la parfumerie et l'industrie cosmétique: ce sont de grands consommateurs des substances odorantes. L'homme étant toujours à la recherche de sensations nouvelles, les industries de la parfumerie et la cosmétique utilisent abondamment les substances odorantes volatiles pour l'élaboration des gammes de produits de plus en plus diversifiés. Divers produits de toilette (parfums, savons, laits, shampoings, pâtes et poudres dentifrices etc.), seront appréciés pour leur fragrance. Dans le domaine de la cosmétique, des gammes de produits sont élaborées à partir d'huile essentielle sur la base de leurs propriétés revendiquées (antiradicalaire, régénérant, apaisant, hydratant etc....)

3°) Dans le domaine médical: l'emploi des huiles essentielles en thérapeutique est lié à leurs propriétés pharmacodynamiques diverses et souvent marquées. Parmi les plantes à huiles essentielles, on trouve des huiles antiseptiques surtout employées dans le traitement des maladies des voies respiratoires ou urinaires; certaines sont eupeptiques et carminatives (régularisent la digestion); d'autres agissent comme stimulants du système nerveux central, pouvant provoquer des convulsions à hautes doses. Leurs actions antispasmodique, cholérétique, stomachique et vermifuge ne sont pas non plus, à négliger. A noter aussi que certaines huiles essentielles renfermant la thuyone, le sabinol ou la 2-undécanone présentent des effets emménagogues à faible dose et abortifs à forte dose: c'est le cas des huiles essentielles de *Ruta graveolens* (Rue), de *Artemisia absinthium* et de *Tanacetum vulgare* (Paris et Moyse, 1976; Raponda-Walker et Sillans, 1961; *Pharmacopée Française*, 1985; Bruneton, 1999).

4°) L'hygiène alimentaire et corporelle: les plantes ou parties de plante à essences sont souvent utilisées pour leurs propriétés bactéricides ou antioxydantes dans la conservation des produits alimentaires. D'autres présentent des propriétés répulsives contre les insectes, c'est le cas par exemple de l'essence de *Cymbopogon citratus* (citronnelle) qui est largement utilisée de nos jours, dans des pays tropicaux contre les moustiques.

5°) L'industrie chimique: elle exploite en général les huiles essentielles, comme matière première qu'elle transforme en produits chimiques plus élaborés; c'est l'isolement et la purification d'un constituant intéressant ou majoritaire qui sera utilisé, soit directement, soit comme produit de départ dans des hémisynthèses (Bruneton, 1999).

## 5- Méthodes d'extraction et d'analyse des huiles essentielles

### 5-1- Extraction des huiles essentielles

La grande diversité des propriétés physico-chimiques de ces composés permet d'utiliser plusieurs techniques d'extraction. Elles seront sélectionnées en fonction de la composition chimique de l'huile essentielle ou de l'organe de la plante à extraire. Nous parlerons ici des quatre principales méthodes d'extraction utilisées couramment:

- l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau et hydrodistillation,
- l'extraction par solvants organiques,
- l'expression à froid,
- l'enfleurage

#### 5-1-1- L'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation

Véritables méthodes d'obtention des huiles essentielles, elles sont basées sur un même principe: celui de l'extraction et de l'entraînement des composés volatils non miscibles à l'eau par la vapeur d'eau. Du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe, la plupart des substances odorantes volatiles sont entraînaibles à la vapeur d'eau; elles ne sont donc, ni retenues dans les biopolymères de la plante, ni solubilisées dans l'eau. Ainsi, après condensation des vapeurs, ces substances sont séparées du distillat par simple décantation.

Dans la pratique, l'entraînement à la vapeur consiste à faire circuler à travers le matériel végétal disposé sur une grille, un courant de vapeur d'eau qui extrait les principes volatils. Cette technique peut également se faire sous pression réduite.

Dans l'hydrodistillation, le matériel végétal est immergé dans une quantité d'eau représentant 3 à 5 fois son poids (**Paris et Moyse, 1976**).

Ces proportions sont déduites du principe de la distillation d'un mélange de composés non miscibles. Celui-ci stipule que la pression de vapeur au-dessus du mélange de 2 composés est la somme des pressions partielles de ces 2 composés et que le rapport entre les masses des 2 composés dans le distillat est égal au rapport de leurs pressions partielles multiplié par celui de leurs poids moléculaires.

Donc, pour 2 composés a et b non miscibles, on a :

$$P_t = p_a + p_b \quad \text{avec:}$$

$$\frac{m_a}{m_b} = \frac{p_a}{p_b} * \frac{M_a}{M_b}$$

$P_t$  = Pression de vapeurs au-dessus du mélange

$p_a$  et  $p_b$  = Pressions partielles des composés a et b à la température de distillation.

$M_a$  et  $M_b$  = Masse moléculaire de a et b

Ce procédé, réservé au dosage des huiles essentielles (**Pharmacopée Française, 1985**) est le plus utilisé pour l'extraction de celles-ci.

### 5-1-2-L'extraction par solvants organiques

Elle repose sur le fait que les huiles essentielles sont solubles dans la plupart des solvants organiques et particulièrement les hydrocarbures aliphatiques (pentane, hexane etc.) ou aromatiques (benzène). Ces extractions se font souvent à la température ambiante, ceci ayant l'avantage d'éviter d'éventuelles modifications ou altérations des structures moléculaires dues à la chaleur. Cette méthode est très utilisée dans l'industrie des parfums.

L'extraction par solvants organiques n'est pas très sélective car on extrait, en même temps que les huiles essentielles, les substances grasses non volatiles présentes dans la plante. Après élimination du solvant par évaporation sous pression réduite, on obtient une concrète. Un traitement de cette concrète par l'éthanol absolu entraîne une précipitation des cires. Par filtration et évaporation de l'alcool, on obtient l'absolue (**Paris et Moyse, 1976**).

### 5-1-3-L'expression à froid

Cette méthode s'applique particulièrement aux essences facilement altérables à la chaleur et peroxydables. On l'utilise souvent pour l'extraction des huiles essentielles des agrumes (citron, orange douce et amère, mandarine, bergamote etc.). Cette méthode peut se faire à la main (procédés à la cuillère, à l'écuelle), ou après scarifications mécaniques. On recueille l'essence avec l'eau des cellules que l'on peut ensuite séparer par décantation (**Paris et Moyse, 1976**).

#### 5-1-4-L'enfleurage et autres procédés

Cette technique est principalement utilisée dans le traitement des parties fragiles de la plante, telles que les fleurs. Elle consiste à mettre les organes végétaux en contact avec un corps gras qui se sature d'essence. Le corps gras est enfin épuisé par l'alcool absolu qui à son tour est évaporé sous vide à 0°C.

En dehors de ces quatre méthodes d'extraction, d'autres procédés plus rapides (et donnant dans bien des cas des extraits naturels de meilleure qualité) se sont développés depuis quelques années. C'est le cas de l'extraction par micro-ondes et l'extraction par le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) supercritique.

#### 5-1-5-Le rendement

C'est le rapport entre la quantité d'huile essentielle obtenue à la fin d'une extraction et la quantité de matériel végétal soumise à l'extraction. Ce rendement est souvent exprimé en pourcentage. Si les quantités sont exprimées en masse, nous aurons:

$$R\% = \frac{\text{Masse de l'huile essentielle extraite}}{\text{Masse du produit végétal utilisé}} \times 100$$

Le rendement en huile essentielle peut être influencé par plusieurs facteurs tant intrinsèques qu'extrinsèques à la plante. Il peut varier:

- selon les organes de la plante soumis à l'extraction,
- selon le cycle végétatif de la plante,
- selon les mutations biogénétiques (polyploïde, aberrations chromosomiques etc.),
- selon la récolte et le prétraitement du matériel végétal (période de récolte, conditions de conservation durant le transport, séchage, etc.),
- selon le climat et les facteurs édaphiques,
- selon les techniques d'extraction et les durées de celles-ci,
- selon la forme du récipient utilisé comme réacteur et selon le système de condensation des vapeurs.

#### 5-1-6-Conservation des huiles essentielles

L'altération, des huiles essentielles n'intervient pas uniquement pendant l'extraction; la plupart de leurs composants étant insaturés, celles-ci seront, dans certaines conditions de conservation (lumière, chaleur, présence de métaux, humidité etc.), sujettes à des réactions

secondaires telles que:

- des réactions d'auto-oxydation,
- des réactions de réarrangement moléculaire,
- des réactions de polymérisation,
- des réactions d'hydrolyse.

Pour éviter ces réactions secondaires, il est donc conseillé de conserver les huiles essentielles dans des flacons en verre sombre hermétiquement fermés et à basse température (réfrigérateur).

## 5-2- Analyse des huiles essentielles

En pratique, on distingue deux types d'analyses:

Le premier type a pour but de définir les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle:

- propriétés organoleptiques (couleur, aspect, odeur)
- propriétés physiques (densité, pouvoir rotatoire, indice de réfraction, point de congélation, etc.)
- propriétés chimiques globales (indices d'acide, d'ester, de carbonyle...).

Ces caractéristiques propres à chaque essence seront ensuite utilisées pour décrire l'huile essentielle, elles serviront de critères de qualité pour les transactions commerciales. Les méthodes techniques utilisées pour déterminer ces caractéristiques sont décrites avec précision dans le recueil de normes publié par l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

Le deuxième type d'analyses a pour objectif la connaissance de la composition chimique de l'huile essentielle en passant par l'identification des structures et l'évaluation des proportions de ses constituants. Pour l'étude des huiles essentielles, ces analyses peuvent être effectuées en faisant appel à différentes techniques; la plus utilisée à l'heure actuelle étant la chromatographie en phase gazeuse; parfois complétée par des méthodes spectrales telles que l'IR, l'UV, la spectrométrie de masse, la RMN, après isolement du constituant.

Au cours de nos travaux, les analyses ont été faites par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par CPG couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

### 5-2-1- Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse ou chromatographie gaz - liquide est basée sur

le principe de la chromatographie de partage. La phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti sur un support inerte; la phase mobile constituée du gaz vecteur, véhicule le soluté (échantillon vaporisé dans l'injecteur), qui se déplace par migration différentielle, le long de la phase stationnaire; il y a, à tout moment, équilibre entre la concentration du soluté dans la phase stationnaire et dans la phase gazeuse; la vitesse de migration de chaque composant dépendra de son coefficient de partage entre les deux phases (**Tranchant, 1982**). Dans la colonne les différents constituants vont cheminer à des vitesses différentes selon leur solubilité dans la phase stationnaire et leur volatilité.

La séparation des composés dépend du type de colonne utilisé, la phase stationnaire pouvant être de polarité variable. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange sont inégalement retenus par celle-ci pendant le cheminement. Il en résulte que les constituants du mélange sortiront de la colonne les uns après les autres et seront détectés. Au niveau de l'enregistreur on observera une succession de signaux, traduits par des pics, caractérisés chacun par un temps de rétention et une aire.

La chromatographie en phase gazeuse permet à la fois une analyse qualitative et une analyse quantitative des essences.

L'analyse qualitative est basée sur l'identification des différents constituants de l'huile. Celle-ci consiste à déterminer les structures des composés à partir d'un certain nombre de données (temps de rétention, indices de rétention, spectres de masse etc.) qui seront comparées avec celles de la littérature ou celles de substances de référence (standards) (**Garnero, 1985; Joulain et König, 1998; Jennings et Shibamoto, 1980; Adams, 2001**).

➤ L'indice de rétention

On a rapidement observé la non reproductibilité des grandeurs de rétention obtenues avec une même colonne, cette difficulté étant liée aux phénomènes complexes qui interviennent pendant l'élution (variation des conditions opératoires réelles). Certains auteurs ont proposé l'utilisation d'un indice de rétention en température programmée, en considérant que la montée de la température est linéaire, ce qui est souvent le cas. Il est défini par la relation:

$$IR = 100n + \frac{TR(A) - TR(Cn)}{TR(Cn+1) - TR(Cn)} \times 100$$

Où, A, élué entre  $C_n$  et  $C_{n+1}$ , est le composé inconnu,

TR(A) est le temps de rétention du composé inconnu

TR( $C_n$ ) est le temps de rétention de l'hydrocarbure à n atomes de carbone précédant immédiatement le composé;

TR( $C_{n+1}$ ) est le temps de rétention de l'hydrocarbure à n+1 atomes de carbone suivant immédiatement le composé.

L'indice de rétention varie très peu avec la température sur une même colonne, en revanche il varie beaucoup selon les types de colonnes (polarité de la phase stationnaire). Cette variation d'indice selon la polarité de la colonne permet de distinguer les constituants qui sont caractérisés par des indices très proches sur une colonne donnée. Généralement, on utilise deux types de colonnes: polaire et apolaire (**Tranchant, 1982**). Lorsque l'ambiguïté entre deux constituants persiste après utilisation de cette méthode, on peut procéder à un enrichissement.

#### 5-2-2-Identification par enrichissement

Il faut ajouter un composé connu dit «de référence » à une huile, puis comparer les chromatogrammes obtenus avec et sans ajout. La présence du composé recherché se traduit par une augmentation de l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme du mélange ou, lorsque le produit n'est pas le même, un épaulement ou un pic différent.

Dans certains cas, deux composés peuvent avoir le même temps de rétention sur une colonne donnée, donc conduire à un pic unique. Il faut alors changer de colonne pour les différencier.

#### 5-2-3- La spectrométrie de masse

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse permet l'analyse directe des constituants, séparés au préalable dans le chromatographe, par le spectromètre de masse. Cette méthode a l'avantage de ne nécessiter que des échantillons de l'ordre de  $10^{-3}$  microlitre pour l'analyse (**Masada, 1976; Jennings et Shibamoto, 1980; Boulain et König, 1998; Adams, 2001**).

- Le principe de la spectrométrie de masse par impact électronique

La spectrométrie de masse avec impact électronique est basée sur l'analyse des fragments chargés issus d'une molécule soumise à un bombardement électronique. Les

renseignements ainsi obtenus (spectres) sont ultérieurement combinés pour reconstruire la formule moléculaire. Les spectres de masse obtenus sont généralement comparés à des banques de données de référence.

Il arrive parfois que les techniques citées précédemment soient insuffisantes pour l'identification formelle d'un constituant. Dans ce cas on peut faire appel aux techniques spectrales classiques dont, en particulier, la résonance magnétique nucléaire (RMN). Mais les huiles essentielles qui sont souvent des mélanges de plusieurs produits et l'application de ces méthodes nécessite l'isolement préalable du produit inconnu, ce qui n'est pas toujours chose aisée.

Deuxième Partie:

**COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES  
ESSENTIELLES**

## 1 – FAMILLE DES ANNONACEAE

### 1-1- *Annona muricata* L.

Synonyme:	<i>Annona macrocarpa</i> Werk
Nom vernaculaires:	Goun: cha-cham, chap-chap, sapoti
Nom vulgaire:	Corosol
Nom usuel:	Corossolier; Grand corossol; Cachiman épineux

#### 1 -1- 1 - Botanique et utilisation

##### Caractéristiques morphologiques de la plante:

C'est un petit arbre, de 5 à 8m de hauteur, à ramilles pubescentes. Les feuilles sont à pétiole long de 8 à 25cm et large de 3 à 8 cm, à limbe papyracé, obové-oblong, légèrement acuminé au sommet. Les fleurs sont de couleur jaune ou jaune verdâtre, axillaires, solitaires, géminées, caulinaires; pétales épais; pédicelle recourbée de 1.5 à 2cm. Les fruits sont ovoïdes ou globuleux, verts, muriqués par les pointes coniques des carpelles soudés, longs de 15 à 25cm et de 10 à 15 cm de large, à pulpe blanche, légèrement fibreuse et pouvant peser jusqu'à 2kg. Les graines sont noires et brillantes à tégument dur (**Adjanohoun et coll., 1986; Adjanohoun et coll. 1988**).

##### Utilisation traditionnelle

Cette espèce d'Amérique tropicale et des Antilles, est actuellement cultivée dans plusieurs zones tropicales, particulièrement en Afrique (Bénin, Togo, Congo), aux Comores et Dominique pour son fruit comestible, le corossolier.

L'infusion des feuilles est considérée en médecine populaire comme hypnogène, béchique et fébrifuge. Certaines tribus de basse Casamance utilisent des emplâtres des feuilles pilées pour les plaies de la circoncision (**Kerharo et Adam, 1974**).

Cette espèce est utilisée au Bénin en médecine traditionnelle dans de nombreuses préparations thérapeutiques: une décoction des feuilles est utilisée par voie orale, pour soigner l'hypertension, les affections cardiaques, les crises nerveuses et les épilepsies.

Le décocté des mêmes feuilles, associées à celles de *Spondias mombin*, est utilisé pour os dans le traitement des ictères, des hémorragies du post partum et pour éviter les convulsions (**Adjanooun et coll., 1989**).

Les feuilles sont employées en cataplasme sur le front pour traiter la fièvre.

Les bourgeons et les fleurs sont utilisés contre la toux.

Les fruits verts, séchés et réduits en poudre sont utilisés en tisanes pour traiter les diarrhées et la dysenterie chronique.

Une décoction des fruits verts et des graines est également utilisée en bain de bouche contre les aphtes.

Les graines sont également utilisées en décoction, en usage externe, pour soigner les plaies.

Aux Comores, le jus des feuilles est employé dans le traitement des vertiges (**Adjanooun et coll., 1982**).

A Madagascar, les fruits verts et l'écorce du tronc sont utilisés dans le traitement de la dysenterie. Les racines sont vermifuges. Les feuilles fraîches, en cataplasme, sont cicatrisantes.

A Maurice, la décoction des feuilles est bue contre l'épilepsie et les crises d'origine nerveuse. Elle serait également fébrifuge et aurait des propriétés hypotensives (**Adjanooun et coll. 1983**).

A la Réunion les feuilles sont utilisées en infusion pour combattre l'insomnie et traiter les calculs rénaux. Elles soignent également l'hypertension, les crampes et les brûlures d'estomac, la fièvre etc. (**Lavergne et Véra, 1989**).

Les propriétés hypotensives observées seraient dues à la présence d'acide  $\gamma$ -amino butyrique dans les tiges et les feuilles (**Kerharo et Adam, 1974**).

Les extraits de graines d'*Annona muricata* présentent une activité insecticide: paralysie, tests d'immersion des blattes allemandes et des punaises de laitron, tests de protection pour les tissus, tests vis-à-vis de *Aedes aegypti* et *Anopheles quadrimaculatus*, etc (**Kerharo et Adam, 1974**).

L'extrait de l'écorce est toxique et produit chez la grenouille des convulsions tétaniques à des doses de 3mg (**Kerharo et Adam, 1974**).

## 1 -1 -2 -Travaux antérieurs

### ➤ Etude chimique

De nombreuses études ont été réalisées sur cette espèce dans les domaines phytochimique, pharmacologique et agroalimentaire. Les principales études chimiques portent sur les sucres, les lipides, les protides, les tannins, les stérols et les alcaloïdes isolés des fruits, des graines, des feuilles et des écorces d'*Annona muricata*.

**En 1982, Escarraman et coll.** ont identifié cinq composés volatils dans l'extrait obtenu à partir des fruits d'origine mexicaine, à savoir le (E)-2-hexénal, le caprylate de méthyle, le caproate de méthyle, l'acétaldéhyde et l'hexanoate de méthyle.

**En 1983, Paul et coll.** s'orientent vers une étude de la variation de la composition chimique relative aux acides organiques, aux sucres et à la fraction volatile au cours du mûrissement du fruit.

La même année, **Franco et coll.** ont effectué une étude comparative des fractions volatiles du jus de corossol avant et après sa pasteurisation.

**En 1993, Wong et coll.** ont mené des investigations sur la partie volatile des fruits de trois espèces d'*Annona* d'origine malaisienne. Il ressort de cette étude que la partie volatile du fruit d'*Annona muricata* est composée majoritairement d'esters : 19.7% de (E)-but-2-énoate de méthyle, 18.4% de (E)-hex-2-énoate de méthyle et (5.2%) de 2-hydroxy hexanoate de méthyle ainsi que des alcools, dont le (Z)-hex-3-en-1-ol (9.7%) et le linalol (9.3%).

**Iwaoka et coll.,** au cours de la même année, ont procédé à une étude de la composition chimique de la fraction volatile et de sa variation pendant le mûrissement du fruit; ils ont remarqué que, dans l'extrait volatil du fruit vert arrivé à maturité, on retrouve majoritairement le (Z)-3-hexen-1-ol, tandis que celui du fruit totalement mûr contient en majorité le (E)-2-hexénoate de méthyle, le (E)-2-buténoate de méthyle, l'hexanoate de méthyle et le butanoate de méthyle.

**Pelissier et coll.** ont réalisé en **1994** l'étude comparative de trois huiles essentielles obtenues à partir des feuilles, de la pulpe du fruit et du péricarpe de cette espèce et ils ont montré que l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles est riche en sesquiterpènes (74.4%); ceux-ci sont dominés par le  $\beta$ -caryophyllène (31.4%) accompagné d'élémane (8.1%) et de  $\delta$ -cadinène (6.7%). Les huiles essentielles du péricarpe et de la pulpe contiennent des esters et des acides aliphatiques dont le plus abondant est le (E)-2-hexénoate de méthyle (39.8%).

**Ayedoun**, au cours de sa thèse en 1995, avait montré que l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de cette espèce récoltées au Bénin était riche en  $\beta$ -caryophyllène (38.1%), accompagné de  $\delta$ -cadinène (11.2%), de  $\beta$ -élémente (10.7%) et d' $\alpha$ -muurolène (9.4%).

En 1996, **Fekam et coll.** ont analysé l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Annona muricata* récoltées au Cameroun; ils ont montré qu'elle est constituée essentiellement de sesquiterpènes (89,7%) avec le  $\beta$ -caryophyllène (40%), le  $\beta$ -élémente (14.4%), l' $\alpha$ -santalène (9.5%), le (Z)-hex-3-énol (5.2%), le  $\delta$ -cadinène (4.8%) et l' $\alpha$ -humulène (4.6%).

**Eyele-Mve-Mba (1997)**, au cours de sa thèse, trouve que l'essence obtenue à partir des feuilles récoltées à Makokou (Gabon), contient du  $\beta$ -caryophyllène (36,4%), du  $\beta$ -élémente (7,2%), du  $\delta$ -cadinène (6,0%), de l' $\alpha$ -muurolène (5,0%), de l'oxyde de caryophyllène II (5,0%) et de l' $\alpha$ -cadinol (5,0%).

**Pino et coll., en 2001** ont isolé les composés volatils dans l'extrait de cette espèce et ils ont trouvé le 3-phénylprop-2-énoate de méthyle, l'acide hexadécanoïque, le (E)-hex-2-énoate de méthyle et le 2-hydroxy-4-méthyl valérate de méthyle.

#### ➤ **Investigation biologique**

Très peu d'études biologiques ont été réalisées sur les huiles essentielles d'*Annona muricata*.

En 2001, **Rivera et coll.** ont montré que la décoction des feuilles d'*Annona muricata* à une action sur *Escherichia coli*.

Enfin, en 2006, **Tkhashi et coll.** ont montré que l'extrait d'*Annona muricata* du Brésil présente une activité antibactérienne à 100 $\mu$ g/mL.

### **1 -1- 3 - Résultats et discussion**

Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation des feuilles récoltées dans deux quartiers de Cotonou (Sikècodji et Gbégamey) avec des rendements faibles, inférieurs à 0,1% (m/m) (Tableau 1).

**Tableau 1: Extraction des huiles essentielles de feuilles d'*Annona muricata* L.**

Echantillons	Date et lieu de la récolte	Méthode d'extraction	Rendement (%)
1	14/12/04 à Sikecodji	hydrodistillation	0.05
2	12/02/05 à Gbégamey	hydrodistillation	0.06



**Planche 1: *Annona muricata* L.**

Les résultats de nos analyses chimiques sont rassemblés dans le tableau 2

**Tableau 2: Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles d'*Annona muricata* L.**

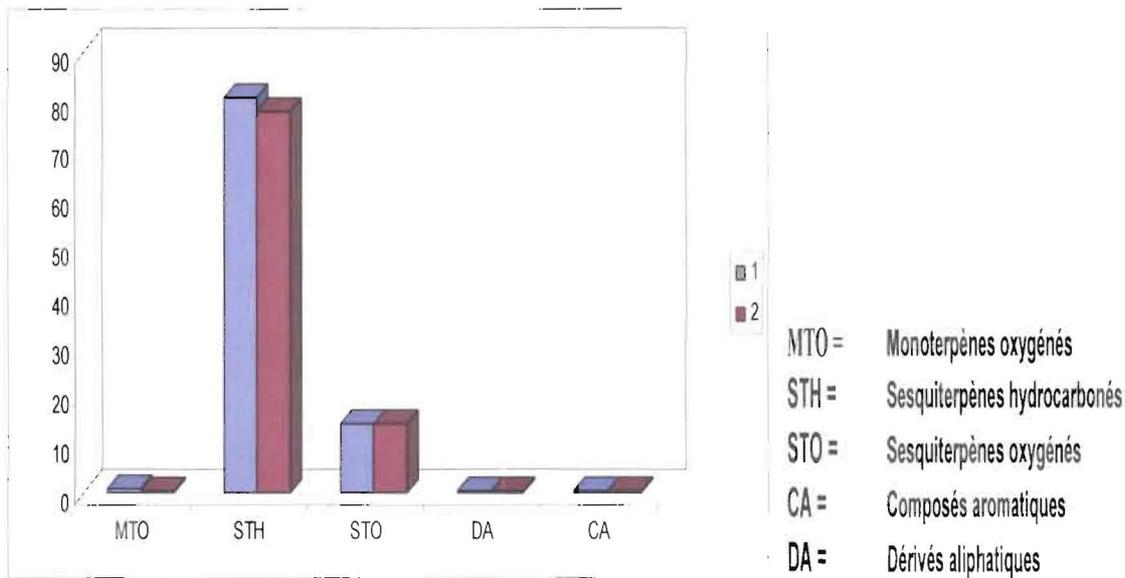
Nom des composés	*IR	1(%)	2(%)
méthyl chavicol	1177	0.7	0.4
δ-élémane	1334	0.4	4.5
α- copaène	1379	0.9	1.0
<b>β- élémène</b>	<b>1390</b>	<b>9.1</b>	<b>8.9</b>
<b>isocaryophyllène</b>	<b>1412</b>	<b>17.0</b>	<b>20.2</b>
<b>β-caryophyllène</b>	<b>1428</b>	<b>18.9</b>	<b>16.1</b>
<b>α-humulène</b>	<b>1460</b>	<b>6.7</b>	<b>3.4</b>
alloaromadendrène	1468	1.0	0.8
γ-muuroène	1476	1.9	1.8
germacrène D	1481	0.7	1.1
β-sélinène	1491	1.5	1.1
<b>α-muuroène</b>	<b>1500</b>	<b>7.9</b>	<b>6.9</b>
γ-cadinène	1514	1.2	1.1
<b>δ-cadinène</b>	<b>1523</b>	<b>13.8</b>	<b>11.4</b>
élémol	1544	0.4	0.7
muuro-5-èn-4-ol	1552	0.3	1.3
spathuléol	1560	0.2	0.2
oxyde de cayophyllène	1592	4.0	4.1
oxyde d'humulène II	1616	1.8	0.8
1-epicubénol	1628	0.8	1.0
NI	1632	0.7	0.7
epi-α- muurool + epi-α-cadinol	1643	5.3	5.3
NI	1658	0.2	3.7
α-cadinol	1661	1.3	0.9
heptadécane	1700	0.7	0.4
géraniate de méthyle	1778	0.8	0.4
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>0.8</b>	<b>0.4</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>81.0</b>	<b>78.3</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>14.1</b>	<b>14.3</b>
<b>Composés aromatiques</b>		<b>0.7</b>	<b>0.4</b>
<b>Dérivés aliphatiques</b>		<b>0.7</b>	<b>0.4</b>
<b>Total</b>		<b>97.3</b>	<b>93.8</b>

1= Récoltées à Sikecodji le 14/12/04

2= Récoltées à Gbégamey le 12/02/05

\*IR sur colonne DB1

Les spectres des composés non identifiés sont en annexe



**Figure 5:** Répartition des constituants dans les échantillons d'huile essentielle de feuilles d'*Annona muricata* L.

Les deux échantillons sont très semblables; ils sont dominés par les sesquiterpènes hydrocarbonés, en particulier par l'isocaryophyllène (17.0% et 20.2%), le  $\beta$ -caryophyllène (18.9% et 16.1%) et le  $\delta$ -cadinène (13.8% et 11.4%). On retrouve donc une composition chimique très comparable à celles obtenues pour les huiles essentielles des feuilles de l'espèce récoltée en Côte d'Ivoire (Pelissier et coll., 1994), au Bénin (Ayedoun, 1995), au Cameroun (Fekam et coll., 1996) ou au Gabon (Eyélé et coll., 1997).

Dans le tableau 3 ont été reportées les teneurs des constituants majoritaires de nos échantillons ainsi que celles obtenues lors des études antérieures, à des fins comparatives.

**Tableau 3:** Etude comparative des composés majoritaires et des principaux groupes de composés des essences de feuilles d'*Annona muricata* L.

Pays		Composés majoritaires						Groupe de composés					TOTAL
		isocaryophyllène	$\beta$ -caryophyllène	$\delta$ -cadinène	$\alpha$ -muuroloène	$\beta$ -élémiène	$\alpha$ -humulène	MTO	STH	STO	CA	D.A	
Bénin	1995	1.8	38.1	11.2	9.4	10.7	4.4	-	88.8	10.9	-	-	99.7
	2004	17.0	18.9	13.8	7.9	9.1	6.7	0.8	81	14.1	0.7	0.7	97.3
	2005	20.2	16.1	11.4	6.9	8.9	3.4	0.4	78.3	14.3	0.4	0.4	93.8
Cameroun.		-	40	4.8	-	14.4	4.6	1,1	82,4	6,6	7,8	-	97,9
Côte d'Ivoire		-	31.4	6.7	-	8.1	-	2,3	58,1	16,3	18,2	-	94,9
Gabon.		-	36,4	6	5,0	7,2	-	0,6	71,0	18,5	0,6	-	90,7

## 1 -2 – *Annona squamosa* L.

Synonyme :

Nom vernaculaire : wingle

Nom usuel : Pomme cannelle, Cœur de boeuf

### 1- 2- 1 - Botanique et utilisation

*Annona squamosa* est une espèce originaire d'Amérique tropicale, actuellement introduite dans tous les pays chauds et humides (**Adjanohoun et coll. 1985; Adjanohoun et coll. 1982**).

#### Caractéristiques morphologiques de la plante

C'est un arbuste ou un petit arbre de 5 à 6m de hauteur, très branchu, à rameaux lenticellés. Les feuilles sont glabres, vertes, ovales, courtement cunéiformes à la base avec 6 à 8 paires de nervures latérales, criblées de points translucides, aigües au sommet; le limbe mesure en moyenne 14cm de longueur et 6.5cm de largeur, avec un pétiole de 10 à 15mm, épaissi à la base et aminci sur la moitié ou les 2/3 supérieurs.

Les fleurs sont blanc crème, axillaires, isolées ou par deux, pendantes à l'extrémité d'un pédoncule de 10 à 15mm avec 3 sépales valvaires, lancéolés, de 2.5cm de longueur et 6 pétales plus courts.

Les fruits comestibles sont subsphériques ou ovoïdes, de 6 à 10 cm de diamètre, à épiderme vert glauque, avec une surface fortement mamelonnée, chaque mamelon représentant un carpelle soudé aux voisins et contenant une graine. La pulpe est blanchâtre farineuse et sucrée (**Kerharo et Adam, 1974**). Les graines sont marron foncé ou noires.

#### Utilisation traditionnelle

Contre le 'Tambave' chez l'enfant, une décoction préparée à partir des feuilles est indiquée en bain et également par voie orale.

Aux Comores, la plante est utilisée contre les vertiges après trituration et inhalation des feuilles fraîches (**Adjanohoun et coll., 1982**).

Au Bénin, le décocté des feuilles fraîches est utilisé per os en cas d'insomnie (Adjanohoun et coll. 1989).

Un décocté des graines est également utilisé comme insecticide.

## 1 -2- 2 -Travaux antérieurs

### ➤ Etude chimique

La plupart des études chimiques concernent les constituants non volatils de la plante (acétogénines des graines, alcaloïdes, flavonoïdes etc.) en association avec leurs propriétés biologiques qui seront décrites dans le paragraphe ci-après.

En revanche, les résultats sur les huiles essentielles sont peu nombreux.

En 1977, Balbaa et coll. ont trouvé dans l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Annona squamosa* de la carvone (24.9%), accompagnée du linalol (7.7%) et du diacétylène (9.3%).

En 1977, Oliveros a étudié l'huile essentielle extraite de la peau du fruit d'*Annona squamosa* et a trouvé qu'elle contient de l' $\alpha$ -pinène, du  $\beta$ -pinène, du limonène, du (E)- $\beta$ -ocimène et de l'acétate de bornyle.

En 1978, Krishna et coll., trouvent du  $\beta$ -caryophyllène dans l'huile essentielle extraite des racines de cette espèce.

Craveiro et coll., étudient en 1981, l'huile essentielle extraite de la peau du fruit de l'espèce et identifient 20 composés dont l' $\alpha$ -pinène, le camphène, le  $\beta$ -pinène, le limonène, le myrcène, l'acétate de bornyle, le  $\beta$ -caryophyllène, le p-cymène, le  $\gamma$ -terpinène, l' $\alpha$ -cubébène, le  $\delta$ -3-carène, l'aromadendrène, l' $\alpha$ -humulène, l' $\alpha$ -muurolène, le  $\gamma$ -muurolène, l' $\alpha$ -guaiène, le  $\beta$ -guaiène, le  $\delta$ -cadinène et l' $\alpha$ -cadinol.

### ➤ Investigation biologique

Toutes les investigations biologiques concernent les constituants non volatils.

Certains travaux sont relativement anciens. Ils se rapportent principalement aux activités antimicrobiennes, à l'action insecticide (Gurib-Fakim et coll., 1994). Mais, on peut citer également l'activité anti-tumorale de la bullatacine et de la bullatacinone contre le (MCF)-7 impliqué dans le cancer du sein, ainsi que, l'effet stimulant cardiaque de l'higénamine (Bruneton, 1987).

Mais on peut citer également des travaux plus récents.

En 2002, Kotkar et coll. mettent en évidence des activités antimicrobiennes et pesticides pour les flavonoides isolés d'un extrait au solvant de feuilles d'*Annona squamosa*.

Une équipe chinoise a travaillé sur les composés diterpéniques de type kaurane issus des tiges d'*Annona squamosa* et a mis en évidence une activité inhibitrice de l'aggrégation des plaquettes sanguines (Yang et coll., 2002) et une activité anti-inflammatoire (Yeh Shang et coll., 2005).

Des extraits au solvant des graines d'*Annona squamosa*, et notamment leurs constituants de la famille des acétogénines, présenteraient des propriétés antitumorales (Wei et coll., 2002; Pardhasaradhi et coll., 2004).

Des propriétés antioxydantes ont été mises en évidence pour l'extrait éthanolique des feuilles d'*Annona squamosa*, sur la base des différents tests in vitro (Shirwaikar et coll., 2004) tandis que Garcia et coll. ont étudié en 2003 les activités antioxydantes des fruits d'*Annona squamosa*.

### 1- 2- 3 - Résultats et discussion

L'hydrodistillation pendant 3h des feuilles d'*Annona squamosa* récoltées dans le même quartier de Cotonou à Sikécodji, mais à des périodes différentes, a donné des huiles essentielles avec des rendements de 0,1 et 0,2% (m/m) (Tableau 4).

**Tableau 4:** Extraction d'huiles essentielles de feuilles d'*Annona squamosa* L.

Echantillon	Date et lieu de la récolte	Méthode d'extraction	Rendement
1	06/11/04 à Sikecodji	hydrodistillation	0.1
2	18/02/05 à Sikecodji	hydrodistillation	0.2



Planche 2: *Annona squamosa* L.

Les résultats des analyses chimiques des deux échantillons sont consignés dans le tableau 5.

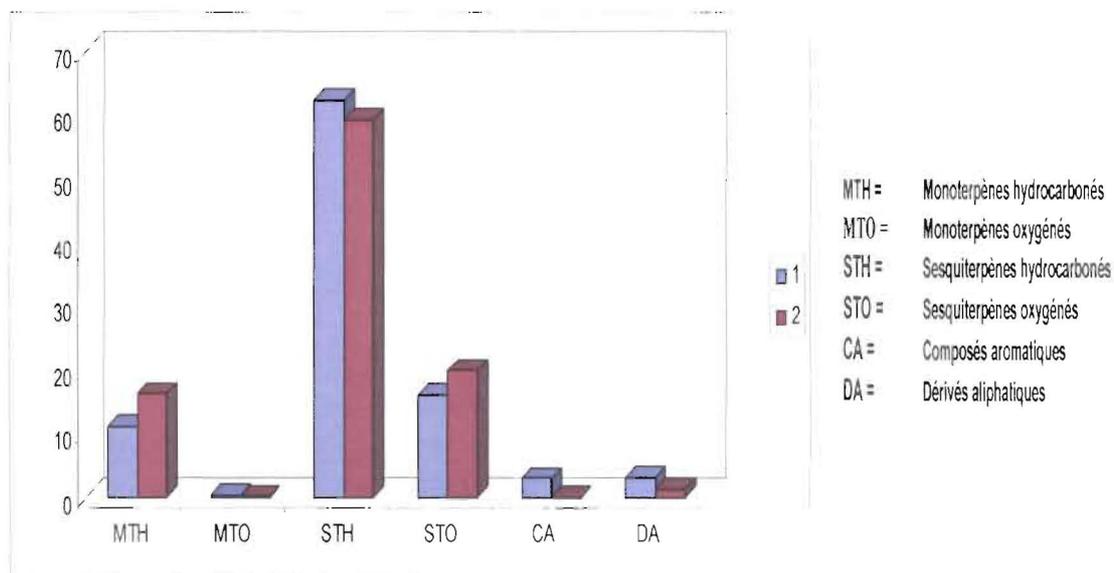
**Tableau 5:** Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles d'*Annona squamosa* L.

Nom des composés	IR*	1(%)	2(%)
$\alpha$ -pinène	936	2.4	3.8
<b>camphène</b>	<b>951</b>	<b>6.9</b>	<b>10.2</b>
myrcène	979	0.4	0.3
limonène	1014	1.5	2.0
linalol	1089	0.4	0.2
estragole	1187	3.0	-
acétate de bornyle	1282	0.2	0.2
bicycloélémente	1341	0.4	0.1
$\delta$ -élémente	1345	2.2	1.9
$\alpha$ -cubébène	1358	0.2	-
$\alpha$ -copaène	1389	1.1	0.2
$\beta$ -élémente + $\beta$ -bourbonène	<b>1398</b>	<b>6.8</b>	<b>4.7</b>
<b>isocaryophyllène</b>	<b>1421</b>	<b>13.1</b>	<b>24.9</b>
$\beta$ -caryophyllène	<b>1437</b>	<b>13.4</b>	<b>2.6</b>
$\beta$ -copaène	1444	0.4	0.2
<b>aromadendrène</b>	<b>1457</b>	<b>1.2</b>	<b>0.1</b>
$\alpha$ -humulène	1470	5.0	3.5
$\gamma$ -curcumène	1487	2.0	2.5
NI	1492	2.3	-
<b>germacrène D</b>	<b>1495</b>	<b>5.5</b>	<b>4.1</b>
$\beta$ -sélinène	<b>1502</b>	<b>1.1</b>	<b>6.6</b>
<b>bicyclogermacrène</b>	<b>1512</b>	<b>5.5</b>	<b>2.5</b>
$\gamma$ -cadinène	1526	1.9	2.4
$\delta$ -cadinène	1532	2.7	3.2
acide laurique	1558	2.9	1.1
spathuléol	1594	2.2	2.7
oxyde de caryophyllène	1601	3.5	2.2
isopathuléol	1639	1.5	2.1
<b>epi-<math>\alpha</math>-cadinol + epi-<math>\alpha</math>-muurolol</b>	<b>1653</b>	<b>6.4</b>	<b>9.2</b>
$\alpha$ -cadinol	1667	2.6	3.8
NI	1701	1.0	-
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>11.2</b>	<b>16.3</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>0.6</b>	<b>0.4</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>62.5</b>	<b>59.5</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>16.2</b>	<b>20.0</b>
<b>Composés aromatiques</b>		<b>3.0</b>	<b>-</b>
<b>Dérivés aliphatiques</b>		<b>2.9</b>	<b>1.1</b>
<b>Total</b>		<b>96.4</b>	<b>97.3</b>

1= Récoltées à Sikecodji le 06/11/04; 2= Récoltées à Sikecodji le 18/02/05

\*IR sur une colonne DB1

Les spectres des composés non identifiés sont donnés en annexe



**Figure 6:** Répartition des constituants dans les échantillons d'huile essentielle de feuilles d'*Annona squamosa* L.

L'analyse des résultats montre que les deux échantillons d'huile essentielle d'*Annona squamosa* étudiés sont constitués majoritairement de sesquiterpènes hydrocarbonés, dominés par l'isocaryophyllène (13.1%;24.9%) et le  $\beta$ -caryophyllène (2.6%;13.4%) respectivement. Cette variation est peut être due à la période de récolte. On peut se poser la question sur la présence d'oestragole (3%) dans l'échantillon 1, surprenante compte tenu des autres constituants présents dans le mélange.

Hormis l'identification de ce composé aromatique, les résultats obtenus sont comparables à ceux publiés par **Krishna et coll., en 1986.**

### 1-3 – *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal

Synonymes :	<i>Annona myristica</i> Gaertn. <i>Monodora grandiflora</i> Benth <i>Monodora borealis</i> Sc. Elliott, Journ. Linn. <i>Monodora claessensii</i> De Wild.
Nom vernaculaire :	
Fon :	Sasalikoun
Goun :	Sasslogbakwin
Yoruba :	Ariwo
Mina :	Asisanti
Nom usuel :	Muscadier d'Afrique ou Fausse noix muscade.

#### 1- 3- 1 - Botanique et utilisation

*Monodora myristica* est une espèce de forêt dense humide, poussant en sous-bois, de préférence dans les lieux relativement humides; on la trouve depuis le Libéria jusqu'en Angola et à Sao Tomé. (Adjanooun et coll., 1986; Adjanooun et coll. 1988).

#### Caractéristiques morphologiques de la plante

C'est un arbre de 25 m de hauteur, à tronc quelquefois cannelé, avec de grandes feuilles obovées elliptiques ou obovées oblongues, arrondies à la base, courtement acuminées, longues de 15 à 45cm et larges de 5 à 25cm, glauques sur leur face inférieure.

Les feuilles possèdent de nombreuses nervures latérales bien marquées, réunies par des nervilles parallèles. Chez les jeunes feuilles, la nervure médiane est rose.

Les fleurs, sont grandes, solitaires extra-axillaires, pendantes, jaunâtres, tachetées de rouge; le pédicelle est long et grêle.

Le fruit est une boule verte, de la taille d'une orange (10 à 15 cm de diamètre), qui pend à l'extrémité d'un fort pédoncule et qui reste vert à maturité. Il est rempli de très nombreuses graines d'odeur aromatique, enfouies dans une pulpe blanche.

### Utilisation traditionnelle

Le macéré des feuilles associées à celles de *Hoslundia opposita* et aux fruits de *Xylopia aethiopica* est donné per os dans le traitement de la rougeole.

Les graines sont utilisées comme condiment dans de très nombreuses recettes. Ces mêmes graines sont utilisées en médecine traditionnelle comme vermifuge par la population Gabonaise, Congolaise et Togolaise (Adjanooun et coll., 1988; Raponda-Walker et Sillans, 1961; Adjanooun et coll. 1986).

Au Bénin, on utilise également les graines en association avec le rhizome de *Zingiber* dans le traitement de la toux. En association avec les fruits de *Xylopia aethiopica*, du sulfate de cuivre et une feuille de *Nicotiana tabacum*, elles sont administrées per os dans l'urine de vache ou de boeuf, en cas de convulsions (Adjanooun et coll. 1989).

L'albumen de la graine est consommé pour calmer les céphalées.

### 1-3- 2 -Travaux antérieurs

#### ➤ Etude chimique

Les études sur les constituants volatils de *Monodora myristica* sont nombreuses.

La plupart concernent les **fruits** de cette espèce, qui fournissent une huile essentielle avec des rendements élevés, allant de 4-6%.

Les compositions chimiques décrites pour ces extraits volatils ont la particularité d'être très «homogènes», puisque l'on retrouve, dans tous les articles scientifiques se rapportant à cette huile essentielle, une majorité de structures de type p-menthane:  $\alpha$ -phellandrène/p-cymène/limonène.

En 1987, Lamaty et coll., décrivent l'huile essentielle des graines de l'espèce camerounaise, dominée par l' $\alpha$ -phellandrène (48.8%), accompagné d' $\alpha$ -pinène (15.9%) et de limonène (8.7%).

Fekam, en 1992, analyse un échantillon de même origine, caractérisé par un taux particulièrement élevé d' $\alpha$ -phellandrène (80%).

Les résultats se rapportant à l'espèce rencontrée dans différents pays du continent africain, sont globalement similaires.

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des graines récoltées au Nigeria (**Ekundayo et Coll., 1988**) contient du p-cymène (17.1%) et du linalol (4.6%).

Celle des fruits récoltés au Bénin, (**Ayedoun, 1995**) contient deux constituents majeurs : le p-cymène (30.5%) et l' $\alpha$ -phellandrène (26.1%). L'échantillon du Congo (**Cimanga et coll., 2002a et b**) se caractérise par l' $\alpha$ -phellandrène (37.8%), le p-cymène (19.3%), accompagné d' $\alpha$ -pinène (10.2%).

Enfin l'espèce de la Côte d'Ivoire fournit une huile essentielle, par hydrodistillation de ses graines, avec 32% de p-cymène et 24.4% d' $\alpha$ -phellandrène (**Oussou et coll., 2004**).

Quelques études se rapportent à l'huile essentielle des feuilles de *Monodora myristica*, qui sont beaucoup moins riches en huile essentielle, avec des rendements de l'ordre de 0.02%.

On peut citer l'échantillon obtenu à partir des feuilles de l'espèce camerounaise (**Fekam et coll., 1996**) dominé par les sesquiterpènes:  $\beta$ -caryophyllène (66.6%),  $\alpha$ -humulène (7.2%) et l' $\alpha$ -copaène (6.6%).

L'huile essentielle obtenue avec un rendement de 1.3% à partir de l'écorce de l'espèce gabonaise contient également un taux élevé de  $\beta$ -caryophyllène (19.3%), accompagné d' $\alpha$ -santalène (21.3%) et de trans- $\alpha$ -bergamotène (11.1%) (**Agnaniet et coll., 2004**).

En 1999, **Fournier et coll.**, ont analysé les huiles essentielles de *Monodora myristica* obtenues à partir des feuilles, des graines et des fruits; ils ont montré que:

- Les feuilles contenaient du  $\beta$ -caryophyllène, de l' $\alpha$ -humulène, de l' $\alpha$ -pinène et du myrcène.
- Les fruits, étaient riches en  $\alpha$ -phellandrène,  $\alpha$ -pinène, limonène, p-cymène et myrcène.
- Les graines, étaient riches en  $\alpha$  et  $\beta$ -phellandrène, 1,8-cinéole, p-cymène et  $\alpha$ -pinène.

Enfin on peut citer le travail de la thèse de **Ndoye en 2001**, qui fait une étude comparative des différentes parties de la plante originaire du Cameroun, elle trouve que:

- Les graines contiennent majoritairement l' $\alpha$ -phellandrène 64.4% accompagné de p-cymène 10.3% et d' $\alpha$ -pinène 7.1%.

➤ Les écorces sont riches en  $\alpha$ -muurolool (19.2%), accompagné d' $\alpha$ -cadinol (10.2%) et d'alloaromadendrène (7.8%).

➤ Les feuilles sont riches en  $\alpha$ -pinène (22.4%) accompagné d'oxyde d'humulène (11.1%) et de  $\beta$ -caryophyllène (8.9%).

➤ Et enfin les fleurs, contiennent majoritairement l' $\alpha$ -pinène (32.3%), le  $\beta$ -pinène (7.2%) et le  $\beta$ -caryophyllène (7.2%).

### ➤ **Investigation biologique**

*Monodora Myristica* a fait l'objet de plusieurs études biologiques. Toutes les évaluations ont été réalisées sur les extraits au solvant ou les huiles essentielles des fruits (ou graines), bien que les feuilles de cette espèce soient également utilisées en médecine traditionnelle.

Concernant les actifs «non volatils», on ne citera qu'une étude ethnopharmacologique récente, réalisée par **Okepkon et coll., en 2004** sur les extraits polaires, non polaires et les alcaloïdes de 17 plantes ivoiriennes, dont *Monodora myristica* à laquelle ont été attribuées diverses activités antiparasitaires.

On attribue à l'huile essentielle des fruits (ou des graines) de *Monodora myristica* plusieurs propriétés intéressantes.

Une activité antimicrobienne a été mise en évidence sur *Klebsiella pneumoniae* (**Chalchat et coll., 1997**); les résultats des tests d'inhibition réalisés par **Cimanga et coll., 2002b** indiquent une bonne activité de l'huile essentielle sur 18 souches microbiennes, les plus sensibles étant *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus vulgaris*. Plus récemment, une équipe ivoirienne (**Oussou et coll., 2004**) a mis en évidence les propriétés bactéricides et bactériostatiques pour l'huile essentielle des graines de *Monodora myristica*, sur une douzaine de microorganismes.

Des propriétés antifongiques ont également été mises en évidence pour l'huile essentielle de cette espèce. On peut citer les travaux de **Cimanga et coll., en 2002a**, qui décrivent, toujours pour l'espèce congolaise, une activité inhibitrice de l'huile essentielle des graines sur plusieurs champignons, les deux plus sensibles étant *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporum canis*.

En revanche, au cours d'une étude destinée à évaluer les potentialités de l'utilisation des huiles essentielles dans la protection des denrées alimentaires contre l'attaque des champignons (notamment ceux produisant les aflatoxines dont la toxicité est bien connue), **Nguefack et coll.**, n'ont montré, **en 2004**, qu'une activité inhibitrice «modérée» (inférieure à celle d'autres huiles essentielles comme *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris* et *Cymbopogon citratus*) pour l'huile essentielle des graines de *Monodora myristica* contre *Fusarium monoliforme*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatum*.

Un extrait des graines de *Monodora myristica* du Ghana avait déjà été testé **en 1996** pour voir son action inhibitrice sur la production d'aflatoxine (**Awuah et coll.**). Enfin, on peut citer, dans le même domaine, l'observation d'une action détoxifiante de l'extrait alcoolique de *Monodora myristica* (**Oluwafemi et coll., 2004**) vis-à-vis de l'aflatoxine B1.

L'huile essentielle des feuilles n'ayant, à notre connaissance, jamais été testée du point de vue de son activité biologique, nous nous sommes intéressés à ses potentialités antiradicalaires et anti-inflammatoires. Les résultats de nos investigations sont donnés dans le chapitre suivant.

### 1- 3- 3 - Résultats et discussion

L'hydrodistillation des feuilles de *Monodora myristica* récoltées à Abomey-Calavi, le 24 mai 2003 a donné une huile essentielle avec un rendement de 0.5% (m/m). La composition chimique de cet échantillon est donnée dans le tableau 6:

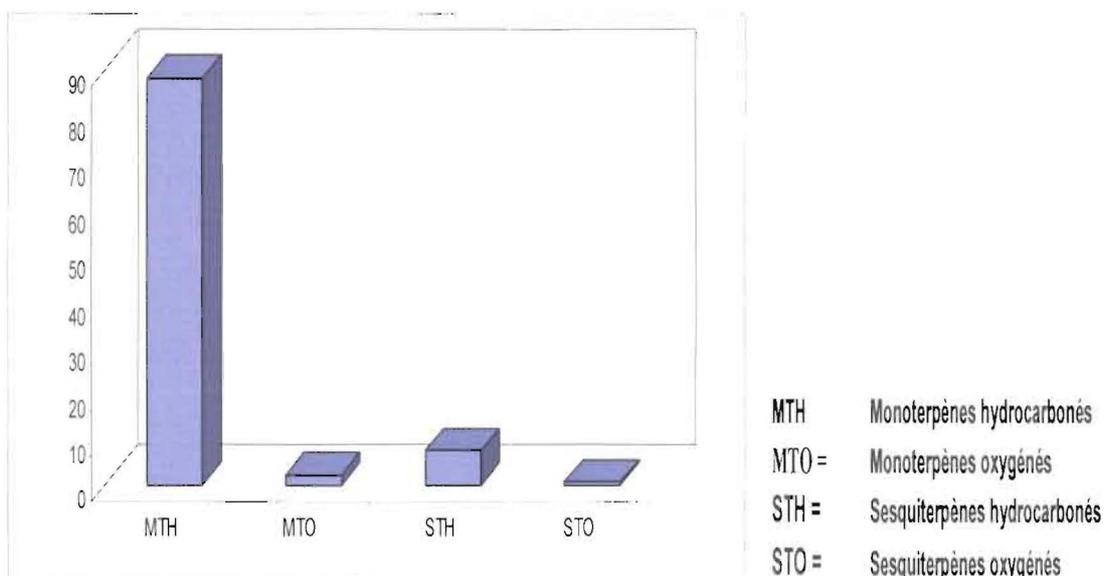


**Planche 3: *Monodora myristica* (Gaertn) Dunal**

**Tableau 6:** Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal récoltées au Bénin

Nom des composés	*IR	%
$\alpha$ -thujène	927	2.4
$\alpha$ -pinène	937	6.2
sabinène	979	0.1
$\beta$ -pinène	985	4.8
$\alpha$ -phellandrène	1009	65.5
$\alpha$ -terpinène	1016	0.1
p-cymène	1020	4.5
limonène	1029	4.2
(E)- $\beta$ -ocimène	1040	0.1
$\gamma$ -terpinène	1056	0.1
linalol	1090	1.6
$\alpha$ -terpinéol	1186	0.1
sabinol	1197	0.4
$\alpha$ -cubébène	1358	0.4
$\alpha$ -copaène	1389	0.1
$\beta$ -caryophyllène	1398	0.1
$\gamma$ -muurolène	1506	0.1
$\alpha$ -muurolène	1509	0.8
$\gamma$ -cadinène	1526	2.1
$\delta$ -cadinène	1533	3.6
$\alpha$ -cadinène	1550	0.1
germacrène D-4-ol	1590	0.2
epi- $\alpha$ -cadinol	1652	0.2
$\alpha$ -cadinol	1666	0.1
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>88.0</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>2.1</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>7.3</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>0.5</b>
<b>Total</b>		<b>97.9</b>

\*IR sur une colonne DB1



**Figure 7:** Répartition des terpénoïdes dans l'huile essentielle des feuilles de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal.

L'huile essentielle est exclusivement terpénique, dominée par l' $\alpha$ -phellandène (65.5%), accompagné du p-cymène (4.5%), du limonène (4.2%) mais également des pinènes ( $\alpha$  et  $\beta$ , respectivement 6.2 et 4.8%). On trouve donc une composition chimique proche de celles décrites précédemment.

#### 1- 4 – *Xylopia aethiopica* Dunal A. Richard

Synonymes : *Unona aethiopica* Dunal  
*Uvaria aethiopica* (Dunal) A. Rich.  
*Habzelia aethiopica* (Dunal) A. DC.  
*Xylopicrum aethiopicum* (Dunal) Kuntze  
*Xylopia eminii* A. Chev.  
*Xylopia dekeyzeriana* De Wild  
*Xylopia gillettii* De Wild

Nom vernaculaires :

Fon : Kpejelekoun

Watchi : Kpédjerekou

Yoruba : Erunje

Mina : Eso

Nom usuel : Poivrier d’Ethiopie, Poivrier de Guinée, Poivrier de Sédhiou, Poivrier nègre

##### 1- 4 - 1 - Botanique et utilisation

###### Caractéristiques morphologiques de la plante:

*Xylopia aethiopica* est un arbre très connu en Afrique intertropicale, que l’on trouve en région forestière humide, du Sénégal au Congo et à l’Ile de Principe (**Adjanooun et coll., 1984; Adjanooun et coll., 1985; Adjanooun et coll., 1986; Adjanooun et coll., 1988; Adjanooun et coll., 1989**). C’est un arbre de 12 à 15m de haut, au fût généralement droit, élancé, avec une écorce lisse et finement striée.

Ses feuilles sont elliptiques, régulièrement acuminées au sommet, obtuses ou arrondies à la base, atteignant plus de 15cm chez les rejets ; limbe épais, gras au toucher, glauque à la face supérieure; nervure médiane très large, vert clair; nervures secondaires peu marquées.

Ses fleurs sont blanc verdâtre, parfumées, les pétales externes atteignent 5cm de longueur.

Ses fruits, à nombreux carpelles (12-15, ou plus), sont cylindriques, linéaires, de 4 à 5cm de longueur, disposés en capitules et forment des bouquets de 12-20 capsules bacciformes. **(Kerharo et Adam, 1974)**

Les graines sont noires, entourées par un arille jaune.

#### Utilisation traditionnelle

Les fruits sont utilisés comme condiment aromatique sous le nom de «poivre d’Ethiopie» et comme antitussifs **(Adjanohoun et coll., 1989)**. Ils sont en vente sur tous les marchés du Bénin.

L’extrait ou le décocté des fruits ou des racines, ou du mélange des deux, sont utilisés pour le traitement des bronchites, de la dysenterie, mais également pour stimuler la fertilité chez les femmes.

Le même extrait est utilisé en lotion contre les furoncles, les éruptions et en massage pour les lombagos.

Les fruits pilés, malaxés avec du beurre de Karité, sont utilisés comme produit cosmétique parfumé.

Les fruits sont utilisés au Sénégal comme condiment aromatique et comme antitussifs; sous diverses formes, mais généralement pilés avec les graines, on leur attribue des propriétés révulsives mises à profit dans le traitement externe des rhumatismes. Consommés, en association avec *Cassia occidentalis* sous forme de macéré ou de décocté aqueux, ils sont considérés comme stimulant aphrodisiaque. En Casamance, on les utilise également, avec des fragments de racines, pour purifier et épurer par brassage, puis repos, les eaux bourbeuses puisées aux marigots et réparties dans les calebasses **(Kerharo et Adam, 1974)**.

Les racines très odorantes, sont employées en décocté *per os*, comme vermifuge et en bains de bouche comme antidontalgique **(Kerharo et Adam, 1974)**.

### **1- 4- 2 - Travaux antérieurs**

#### ➤ **Etude chimique**

De nombreux travaux anciens, rapportés par Kerharo et Adam en 1974, indiquent la présence d’un alcaloïde dont l’action serait comparable à celle de la morphine.

Les mêmes auteurs font état de la présence de constituants volatils terpéniques dans les graines, mais également d’une huile fixe et de rutine. Plusieurs composés diterpéniques

ont également été identifiés dans les fruits de l'espèce Nigériane: l'acide xylopique, l'acide kauran-16- $\alpha$ -ol, l'acide kaurénoïque et l'acide 15-oxo-kaurénoïque; il y a également des composés acycliques. Nous ne nous intéresserons qu'aux études les plus récentes réalisées sur les fractions volatiles de l'espèce, issues des différentes parties de la plante.

Dans la littérature, on rencontre un grand nombre de travaux consacrés à l'étude de l'huile essentielle extraite des fruits de *Xylopia aethiopica* largement utilisées comme condiment. Ces études donnent généralement peu de détails sur l'état de conservation de ces fruits (Ayedoun, 1995).

Lamaty et coll., en 1987, analysent deux annonacées du Cameroun et mettent en évidence dans l'huile essentielle des fruits de *Xylopia aethiopica*, des monoterpènes hydrocarbonés (66,6%) dont le plus abondant est le sabinène (23,9%), des monoterpènes oxygénés (en particulier le terpinèn-4-ol et l' $\alpha$ -terpinéol) et des sesquiterpènes hydrocarbonés comme l' $\alpha$ -muurolène (4,3%).

Au Bénin, en 1996, Guigues de Souza et coll. ont étudié l'huile essentielle extraite des fruits du *Xylopia aethiopica*; ils ont trouvé, parmi les 40 composés identifiés, du sabinène (36%), du 1,8-cinéole (12,8%), et du terpinèn-4-ol (7%).

En 1997, Chalchat et coll., retrouvent, dans l'huile essentielle extraite des fruits de *Xylopia aethiopica* du Cameroun, des taux élevés de sabinène (23.9%), de  $\beta$ -pinène (17.4%) et de terpinèn-4-ol (12.9%); le 1,8-cinéole ne représente que 2,1% du mélange.

Tairu et coll., en 1999, caractérisent les arômes caractéristiques des fruits par analyse sensorielle de la fraction aromatique obtenue par sublimation de l'extrait à l'éther diéthylique; ils montrent que le linalol, le (E)- $\beta$ -ocimène, l' $\alpha$ -farnésène, les pinènes, le myrténol et le  $\beta$ -phellandrène participent le plus à l'impression olfactive globale, avec des facteurs de dilution (déterminées par la méthode AEDA) les plus élevés. La vanilline et le 3-éthylphénol ont été identifiés pour la première fois en faible quantité dans les fruits secs.

Ndoye Foe-Belinga, en 2001, a analysé au cours de sa thèse, l'huile essentielle obtenue à partir des fruits récoltés au Cameroun; elle a trouvé du sabinène (21,8%), du  $\beta$ -pinène (14,5%), de l' $\alpha$ -pinène (7,1%), du myrténol (6,4%) et de l'acétate d'octyle (6,4%).

Keita et coll. en 2003, montrent que l'huile essentielle extraite des fruits séchés récoltés au Mali est riche en  $\beta$ -pinène (19.1%) accompagné de  $\gamma$ -terpinène (14.7%), de *trans*-pinocarvéol (8.6%) et de p-cymène (7.3%).

Asekun et Kunle indiquent en 2004 que l'huile essentielle obtenue avec un rendement de 0.42% par hydrodistillation des fruits de *Xylopia aethiopica*, est constituée majoritairement

de monoterpènes; ceux-ci sont dominés par le 1,8-cinéole (15.2%) accompagné du sabinène (6.6%) et de terpinèn-4-ol (4,1%).

Enfin les études les plus récentes ont été menées sur les fruits de l'espèce camerounaise (**Jirovetz et coll., 2005**) et de l'espèce nigériane (**Ogunwande et coll., 2005**).

Une composition chimique (classique) est donnée pour l'espèce camerounaise :  $\beta$ -pinène (18%), terpinèn-4-ol (8.9%) et sabinène (7.2%) tandis que des résultats «surprenants» sont relevés pour l'espèce nigériane; celle-ci contiendrait le  $\beta$ -santalol (14.5%), l' $\alpha$ -cadinol (13.0%) et le benzoate de benzyle avec de l'acide dodécanoïque (10%) et de la zerumbone (4%). On peut s'interroger sur la validité de ces résultats.

On peut relever également quelques travaux effectués sur les **feuilles**:

**Ayedoun et coll. (1997)**, trouvent que l'huile essentielle extraite des feuilles de cette espèce contient du  $\beta$ -pinène (34.9%), de l'élémol (14.9%) et de l' $\alpha$ -pinène (11.6%) tandis que celle obtenue à partir des fruits est riche en sabinène (32.8%) accompagné du  $\beta$ -pinène (16.1%) et du 1,8-cinéole (14.5%).

Les **écorces** ont également été étudiées:

**Eyale-Mve-Mba en 1997**, au cours de sa thèse, trouve que les essences obtenues à partir des écorces de l'espèce récoltées au Gabon, contiennent du  $\beta$ -pinène, de l' $\alpha$ -copaène, de l' $\alpha$ -gurjunène et du trans- $\alpha$ -bergamotène.

**En 2003, Fekam et coll.** ont étudié la composition chimique et les activités anti-plasmodiques de l'huile essentielle extraite de l'écorce du *Xylopiya aethiopica* du Cameroun; ils ont montré qu'elle contient 55% de monoterpènes avec une majorité de composés oxygénés (30.9%).

Enfin, **Karioti et coll., en 2004**, étudient les huiles essentielles obtenues à partir de toutes les parties de la plante récoltée au Ghana (feuilles, écorce des branches et des racines, fruits secs et frais), pour tester leur composition antioxydante. Il trouvent que le  $\beta$ -pinène prédomine dans tous les échantillons sauf dans ceux issus des écorces caractérisés par une teneur élevée en dérivé mentha-1(7),8-diène.

Les résultats de leurs investigations biologiques sont donnés dans le paragraphe suivant.

### ➤ **Investigation biologique**

Nous ne rapporterons ici que les résultats des études biologiques sur les huiles essentielles de *Xylopiya aethiopica*.

En 1997, Chalchat et coll., au cours d'une étude réalisée sur plusieurs huiles essentielles issues de plantes aromatiques africaines, montrent que l'huile essentielle extraite des fruits de *Xylopiya aethiopica* présente une activité antimicrobienne intéressante contre *Klebsiella pneumoniae*.

En 1997 et 1998, Masotti et coll. indiquent que l'huile essentielle extraite des fruits du *Xylopiya aethiopica*, riche en sabinène, germacrène D et en  $\beta$ -pinène, présente des activités antimicrobiennes et antifongiques intéressantes; la fraction hydrocarbonée est particulièrement active contre les champignons.

L'huile essentielle des écorces de *Xylopiya aethiopica* récoltées au Cameroun a montré une activité inhibitrice intéressante de *Plasmodium falciparum* (Fekam et coll., 2003).

Asekun et Adeniyi, en 2004 indiquent que l'huile essentielle extraite des fruits du *Xylopiya aethiopica* du Nigeria présente des propriétés antimicrobiennes sur 4 microorganismes ainsi que des propriétés antitumorales (lignée cellulaire Hep-2).

On peut citer également les activités insecticides observées pour l'huile essentielle des fruits de *Xylopiya aethiopica* du Cameroun (Jirovetz et coll., 2005 et Kouninki et coll., 2005).

Enfin, on notera certaines activités antioxydantes intéressantes observées avec différents extraits de *Xylopiya aethiopica*:

- Des propriétés réductrices intéressantes pour l'extrait au solvant des fruits récoltés aux Nigéria, sont attribuées à des composés polyphénoliques non volatils (Adegoke et coll., 2003).

- L'étude chimique exhaustive réalisée sur les huiles essentielles obtenues à partir des différentes parties de *Xylopiya aethiopica* récoltées au Ghana (Karioti et coll., 2004) s'accompagnait d'une évaluation des potentialités antioxydantes (piégeage du DPPH et du radical superoxyde): les auteurs ont montré que tous les échantillons présentaient une activité significative, l'huile essentielle obtenue à partir des fruits frais étant beaucoup plus active que celle obtenue à partir des fruits secs.

Aucun effet de concentration n'ayant été étudié et les conditions expérimentales utilisées étant différentes de celles utilisées au laboratoire (concentration en DPPH 50 $\mu$ M, une seule concentration en huile essentielle étudiée 0.48g/L), il nous a semblé intéressant de vérifier l'activité antioxydante potentielle de l'huile essentielle obtenue à partir de l'espèce rencontrée au Bénin.

### 1- 4- 3 - Résultats et discussion

L'huile essentielle, a été obtenue par hydrodistillation des feuilles de *Xylopi*  
*aethiopica* récoltées à Abomey-Calavi le 11 juillet 2003 avec un rendement faible de 0,07%  
(m/m); il est comparable à celui trouvé par **Ayédon et coll.** en 1997.

Les résultats de l'analyse chimique de cette essence sont donnés dans le tableau 7



Planche 4: *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich

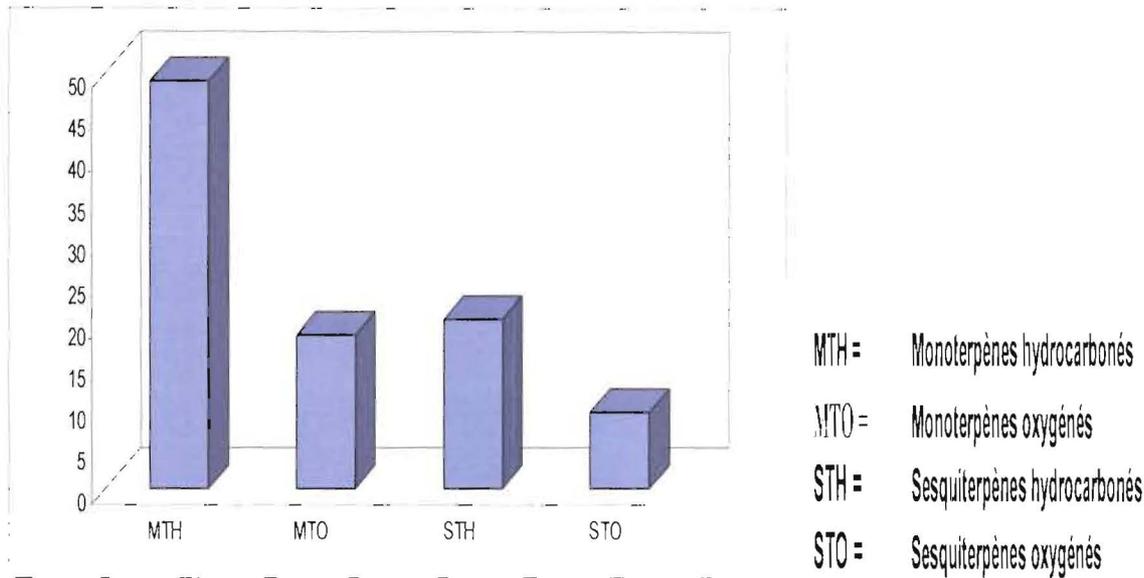
**Tableau 7: Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich du Bénin**

Nom des composés	*IR	%
$\alpha$ -thujène	928	1.9
$\alpha$ -pinène	937	3.5
<b>sabinène</b>	<b>974</b>	<b>12.6</b>
$\beta$ -pinène	<b>981</b>	<b>7.1</b>
<b>p-cymène</b>	<b>1022</b>	<b>16.0</b>
<b>limonène</b>	<b>1032</b>	<b>7.9</b>
<i>trans</i> -oxyde de linalol (furanoid)	1064	0.2
<i>cis</i> -oxyde de linalol (furanoid)	1087	0.1
linalol	1091	2.4
<i>cis</i> -p-menth-2-èn-1-ol	1119	0.6
<i>trans</i> -p-menth-2-èn-1-ol	1136	0.4
<i>trans</i> -pinocarvéol	1140	0.7
<b>terpinèn-4-ol</b>	<b>1179</b>	<b>11.3</b>
$\alpha$ -terpinéol	1188	2.6
N.I (M = 150)	1282	1.2
$\delta$ -élémente	1346	2.8
$\alpha$ -copaène	1378	0.6
<b><math>\beta</math>-élémente</b>	<b>1402</b>	<b>10.6</b>
$\gamma$ -élémente	1476	2.3
$\gamma$ -muurolène	1487	1.3
germacrène D	1503	1.0
$\beta$ -sélinène	1512	0.8
$\alpha$ -sélinène	1526	0.5
$\delta$ -cadinène	1536	0.2
calaménène	1550	0.1
élémol	1558	2.9
salvialénone	1566	0.6
oxyde de caryophyllène	1604	1.5
NI	1610	0.8
oxyde d'humulène II	1628	1.1
isopathuléol	1641	1.1
$\gamma$ -eudesmol	1642	0.2
epi-a-muurolol	1648	0.3
$\alpha$ -cadinol	1655	0.4
$\beta$ -eudesmol	1669	1.3
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>49.0</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>18.3</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>20.2</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>9.1</b>
<b>Total</b>		<b>96.6</b>

Spectres de masse des composés non identifiés: NI: m/z (%)

\*IR sur une colonne DB1

Spectres des composés non identifiés en annexe



**Figure 8:** Répartition des terpénoides dans l'huile essentielle des feuilles de *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich

L'huile essentielle étudiée est dominée par les terpènes hydrocarbonés (69.2%) avec une majorité de monoterpènes, notamment le sabinène (12.6%), le p-cymène (16.0%), et le limonène (7.9%). Parmi les dérivés oxygénés le terpinèn-4-ol est le plus abondant (11.3%).

On retrouve donc une huile essentielle proche de l'huile essentielle des fruits généralement décrite, notamment celle du Cameroun. Cependant, l'échantillon des feuilles récoltées au Bénin et étudiées précédemment (Ayedoun et coll., 1997) se caractérisait par un taux beaucoup plus élevé en  $\beta$ -pinène. Le sesquiterpène le plus abondant est le  $\beta$ -élémane, soit une structure apparentée à l'élémol, majoritaire dans l'échantillon du Bénin décrit précédemment.

Les résultats de nos investigations biologiques sur cet échantillon seront présentés dans la troisième partie.

## 2 – FAMILLE DES BURSERACEAE

### 2- 1 - *Commiphora africana* A. Rich. Engl.

Synonymes : *Heudelotiana africana* A. Rich.  
*Balsamodendrum africana* (A. Rich.) Arn.

Nom vernaculaire : Peul : babadi, badi, badé, garté, adras.

#### 2- 1- 1 - Botanique et utilisation

Le *Commiphora* d'Afrique est un petit arbre ou arbuste parfois buissonnant pouvant atteindre 2m de hauteur. Généralement il porte des épines et il est caractérisé par des feuilles et une écorce produisant une résine à forte odeur balsamique.

On le rencontre couramment dans toutes les zones sèches de l'Afrique Tropicale, plus particulièrement dans les terrains calcaires mais également dans les zones sablonneuses sur fond calcaire. (Hutchinson et Dalziel, 1958).

Les branches de cet arbre, facilement bouturées, sont utilisées pour la constitution de haies vives (Berhaut, 1974).

#### Caractéristiques morphologiques de la plante

- Feuilles trifoliolées alternes. Ces folioles sont ovales, la médiane est surtout beaucoup plus développée que les deux autres. Les folioles latérales ne dépassent guère 2cm de long et 15mm de large, parfois beaucoup plus petites, leur base est souvent dissymétrique; la foliole médiane est longue, en général, de 3 à 4cm et large de 12 à 20mm, mais ces folioles atteignent parfois 7cm de long et 35mm de large. Les folioles ont trois à quatre nervures latérales avec des bords à dents arrondies plutôt larges et peu nombreuses. La face supérieure est presque glabre, et le dessous à peine pubescent. Les trois folioles sont sessiles au sommet du pédoncule.

- Pétiole long de 5 à 30mm, généralement plus court que la foliole médiane. Les rameaux latéraux courts, se terminent souvent en épine.

- Fleurs rouges, petites, fasciculées sur les rameaux à l'aisselle des feuilles tombées, et paraissant quand l'arbre est défeuillé, de janvier à mai. La corolle tubulaire longue de 7 à 8mm, présente un sommet à lobes jaunâtres étalés en croix. Les étamines sont oranges. Le calice est tubulaire rougeâtre et long de 4mm.

- Fruits drupes ovoïdes, rouges à maturité, longs de 10 mm, larges de 8 à 9mm, et pédicellés de 1 à 2mm.

### Utilisation traditionnelle

La plante exsude une résine odorante qui peut servir à parfumer la maison, les habits. On l'utilise aussi pour faire des vernis. Elle était aussi employée comme cosmétique par les populations du pays.

Le bois est utilisé comme cure-dent (brosse végétale). Le noyau des graines, qui devient blanc, sert à faire des colliers odorants.

L'écorce est odorante: on peut la mettre dans les habits pour les parfumer, et s'en servir comme la lavande.

Au Bénin, le macéré d'écorce du tronc est préconisé en boisson contre les douleurs rhumatismales (Adjanooun et coll., 1989).

Les feuilles pilées et mélangées avec du lait sont prises comme stomachique.

La macération dans l'huile des feuilles pilées est donnée en boisson comme calmant et soporifique.

La décoction des feuilles serait un remède efficace contre la stérilité masculine.

Contre les piqûres de scorpion on mâche l'écorce et on l'applique avec du carbonate de calcium.

Pour le traitement de l'inflammation des yeux, on fait bouillir l'écorce et on prend un bain de vapeur sur le visage au-dessus du récipient.

Diverses préparations d'écorces sont utilisées en bain et lavages contre les dermatoses.

Au Togo, le décocté aqueux de la tige feuillée est pris en boisson pour le traitement de la blennorragie (Adjanooun et coll., 1986).

## 2 -1 -2 - Travaux antérieurs

### ➤ Etude chimique

Les résines de nombreuses espèces de la famille des Burseraceae sont utilisées pour leurs propriétés olfactives : *Boswellia carteri* (encens) ou *Commiphora myrrha* (myrrhe).

Mais la myrrhe, utilisée et commercialisée depuis l'antiquité, désigne également la résine de différentes espèces de *Commiphora*.

Les huiles essentielles obtenues à partir des résines de *Commiphora africana*, *Commiphora campestris* et *Commiphora orgadensis* contiennent une grande majorité de monoterpènes hydrocarbonés ( $\alpha$ -thujène,  $\alpha$  et  $\beta$ - pinènes, p-cymène, sabinène et myrcène) (Provan et coll., 1987), tandis que le limonène est le constituant majoritaire de l'essence obtenue à partir de la résine de *Commiphora terebenthinum* et *Commiphora cyclophylla* (Abegaz et Dagne, 1989).

En revanche, les études sont beaucoup moins nombreuses sur les autres parties, de la plante notamment sur les feuilles.

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de *Commiphora africana* récoltées au Bénin est dominée par une cétone sesquiterpénique, l' $\alpha$ -oxobisabolène (Ayedoun et coll., 1997; Ayedoun et coll., 1998) elle est accompagnée par d'autres structures sesquiterpéniques avec un squelette bisabolane.

Nous avons voulu développer ces premières études en exploitant les activités biologiques potentielles de l'huile essentielle issue des feuilles de cette espèce.

### 2- 1 -3 - Résultats et discussion

L'hydrodistillation des feuilles du *Commiphora africana* récoltées à Bohicon, en octobre 2002, a donné une huile essentielle à forte odeur boisée, avec un rendement faible inférieur à 0.1% (m/m).

Les résultats de l'analyse chimique de cet échantillon sont repris dans le tableau 8.

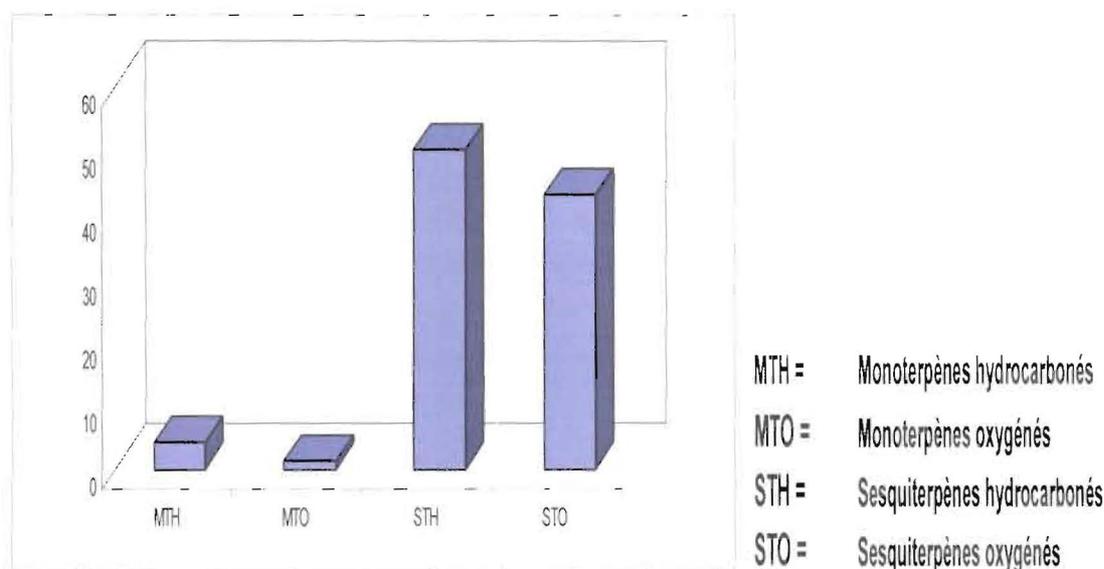


**Planche 5** : *Commiphora africana* A. Rich. Engl.

**Tableau 8:** Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl.

Nom des composés	*IR	%
$\alpha$ -thujène	930	0.1
$\alpha$ -pinène	939	1.2
sabinène	975	0.1
$\beta$ -pinène	980	0.1
myrcène	989	0.1
p-cymène	1023	0.1
1,8-cinéole	1029	0.1
(Z)- $\beta$ -ocimène	1033	2.1
(E)- $\beta$ -ocimène	1044	0.4
linalol	1093	0.2
terpinèn-4-ol	1179	0.3
$\alpha$ -terpinéol	1189	0.2
thymol	1283	0.4
isoitalicène	1399	0.8
italicène	1406	0.6
$\beta$ -caryophyllène	1419	3.9
(Z)- $\beta$ -farnesène	1442	2.1
(E)- $\beta$ -farnesène	1452	0.6
$\alpha$ -humulène	1455	2.4
<b>ar-curcumène</b>	<b>1480</b>	<b>8.2</b>
<b><math>\gamma</math>-curcumène</b>	<b>1485</b>	<b>6.7</b>
<b><math>\beta</math>-bisabolène</b>	<b>1502</b>	<b>5.2</b>
<b><math>\beta</math>-sesquiphellandrène</b>	<b>1520</b>	<b>19.1</b>
(E)- $\gamma$ -bisabolène	1527	0.7
(Z)-nérolidol	1535	0.6
(E)-nérolidol	1563	0.8
$\beta$ -bisabolol	1673	0.7
$\alpha$ -bisabolol	1685	1.3
bisabolone (isomère erythro)	1737	1.4
<b>bisabolone (isomère thréo)</b>	<b>1748</b>	<b>38.4</b>
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>4.2</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>1.2</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>50.3</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>43.2</b>
<b>Total</b>		<b>98.9</b>

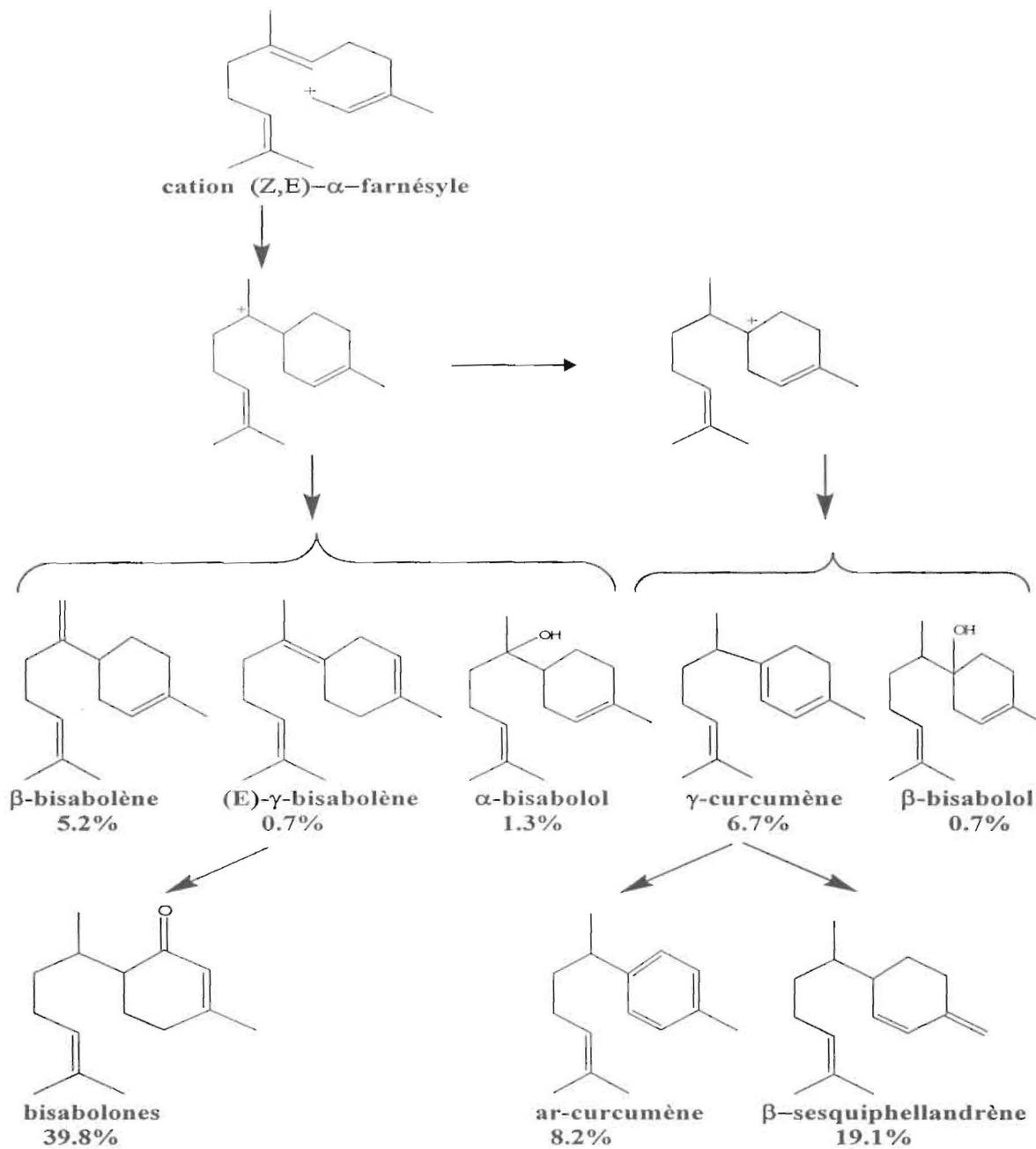
\*IR sur une colonne DB1



**Figure 9** : Répartition des terpénoïdes dans l'huile essentielle des feuilles de *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl.

On trouve une majorité de structures sesquiterpéniques avec un squelette bisabolane (de l'ordre de 82%) dominée par le dérivé carbonyle (bisabolone) avec un taux de 39.8%; ce taux est nettement inférieur à celui précédemment obtenu. En revanche, on trouve, à des taux importants, plusieurs structures hydrocarbonées caractérisées par le même squelette ( $\beta$ -sesquiphellandrène 19.1%,  $\alpha$ -curcumène 8.2% et  $\gamma$ -curcumène 6.7%), minoritaires ou non identifié ( $\beta$ -sesquiphellandrène) dans l'échantillon précédent.

La filiation biosynthétique de ces structures sesquiterpéniques est représentée à la figure 11.



**Figure 10:** Filiation biosynthétique des structures sesquiterpéniques à squelette bisabolane identifiées dans l'huile essentielle de *Commiphora africana*

La représentation graphique des différentes classes chimiques de composés montre une nette domination sesquiterpénique (93.5%), avec un équilibre hydrocarbonés/composés oxygénés, très proche finalement de celui déjà obtenu (91.7%) (Ayedoun et coll., 1998).

Cette composition chimique, dominée par des structures sesquiterpéniques relativement peu volatiles, correspond bien à une huile essentielle à caractère boisé (telles que

le *Patchouli* ou le *Vetiver*) utilisée comme fixateur dans les compositions parfumantes. Cependant, le faible rendement obtenu, rend peu probable l'exploitation des feuilles de cette espèce pour la production d'huile essentielle.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 2005 (**Avlessi et coll., 2005**) dans une revue internationale.

### 3 – FAMILLE DES CHENOPODIACEAE

#### 3 -1 - *Chenopodium ambrosioides* L.

Synonyme :

Nom usuel :           Anserine, Chénopode, Thé Mexicain

Nom vernaculaire :

Fon :                Matruzu, Godo, Azogbidiwa, Gboswaloukoun.

Yoruba :           Lakure

#### 3 -1- 1 – Botanique et utilisation

##### Caractéristiques morphologiques de la plante

C'est une plante annuelle ou vivace, dressée, atteignant plus d'un mètre de hauteur, plus ou moins pubescente, odorante, glabre avec des glandes ambrées. Elle est parfumée lorsqu'on la froisse. Ses feuilles sont ovales lancéolées à bords largement dentés, à sommet obtus ; la partie inférieure est longuement cunéiforme presque jusqu'à la base du pétiole; le limbe, de 3 à 6 cm de longueur et de 10 à 15 mm de largeur, se caractérise par 2 à 4 paires de nervures latérales. Les fleurs sont petites, verdâtres, en glomérules spéciformes axillaires, denses, vers l'extrémité des rameaux (Kerharo et Adam, 1974). Les fruits sont déhiscents à graines lisses et luisantes, brunâtres, légèrement réniformes (Adjanooun et coll., 1985; Adjanooun et coll., 1986).

##### Utilisation traditionnelle

Originnaire d'Amérique, cette plante est largement répandue dans les régions humides et chaudes du globe. Elle est plantée le plus souvent autour des villages et utilisée comme plante médicinale.

La plante est présente dans de nombreuses pharmacopées africaines.

Au Togo, la pulpe des feuilles est utilisée en applications locales sur les abcès. Le décocté aqueux des feuilles associées aux petits oignons est prescrit per os dans le traitement de l'épilepsie. Le macéré de la pulpe des feuilles est utilisé par voie orale en cas de vomissements (Adjanooun et coll., 1986).

Au Congo, le macéré aqueux des feuilles fraîches est fébrifuge par voie rectale. Le suc de la feuille fraîche pilée est conseillé per-os dans les dermatoses cutanées; le résidu des feuilles, imbibé d'huile de palme, est utilisé pour masser le malade souffrant de névralgies intercostales (Adjanohoun et coll., 1988).

Au Bénin, la principale indication de cette plante est son emploi comme vermifuge.

Le décocté des feuilles associées à celles de *Citrus aurantiifolia* ou encore le suc, cette préparation en usage externe est recommandée dans les dermatoses et les fractures (Adjanohoun et coll., 1989).

A la Dominique et à la Réunion, l'indication la plus courante de cette plante est son emploi comme vermifuge. L'infusé de la tige feuillée est utilisé comme anthelminthique et pour calmer les douleurs abdominales (Adjanohoun et coll., 1985; Lavergne et Véra, 1989).

Contre la gale, on prépare une décoction concentrée à prendre en bain. On fera également une infusion à boire contre la jaunisse à la Réunion. (Lavergne et Véra, 1989).

Au Sénégal, *Chenopodium ambrosioides* est une drogue classique. Sous le nom d'Ansérine vermifuge ou Chenopode vermifuge la plante entière, à l'exception des racines, était officinale en France jusqu'en 1965 (Kerharo et Adam, 1974).

On signalera enfin que les feuilles et racines de *Chenopodium ambrosioides* sont utilisées pour soigner certaines tumeurs (Leung et Foster, 1996); en Chine les racines fraîches sont utilisées pour traiter les rhumatismes articulaires (Leung et Foster, 1996).

### 3- 1- 2 – Travaux antérieurs

#### ➤ Etude chimique

Cette espèce a fait l'objet de plusieurs travaux en raison de ses vertus thérapeutiques: (antibactérienne et antifongique, activité anthelminthique, spécifiquement contre les ascaris et les ankylostomes).

Les premières études sur cette huile essentielle remontent à plus d'un siècle selon Guenther (1952). Ces études ont permis d'avoir sa composition chimique et d'en connaître le composé majoritaire l'ascaridole, dont la teneur peut avoisiner 75%.

En 1991, Ouamba a étudié l'huile essentielle extraite de plantes récoltées au Congo et trouvé qu'elle contient 36.8% d' $\alpha$ -terpinène, 29.3% d' $\alpha$ -pinène et 14.8% d'ascaridole.

Ayedoun, en 1995, a étudié l'huile essentielle extraite de feuilles de *Chenopodium ambrosioides* récoltées à Savè (Bénin). Il a fait une comparaison avec des échantillons récoltés au Cameroun et au Congo et il a montré qu'elles contenaient respectivement (70.5%,

31.5 et 36.8%) d' $\alpha$ -terpinène, du p-cymène (16.3%, 32.6% et 29.3%) et de l'ascaridole (7.4%, 19.6% et 14.8%).

En 1995 Sagrero-Nieves et Bartley ont montré que l'huile essentielle du Mexique contient 32.5% de limonène et 26.7% de *trans*-pinocarveol.

Muhayimana et coll., en 1998, ont analysé l'huile essentielle de Rwanda; sa composition est semblable à celle des huiles essentielles du Bénin avec 72,7% d' $\alpha$ -terpinène, 15,3% de p-cymène et 7,2% d'ascaridole. Une revue de la littérature, les amène à classer les huiles essentielles de cette espèce en trois catégories:

- Celles dont le composé majoritaire est l'ascaridole (70-91%) (Amérique du Nord);
- Celles dont l'ascaridole est le composé majoritaire (20 à 67%) associé au p-cymène, au limonène et au myrcène (Inde, Argentine, Brésil, Russie);
- enfin celles riches en  $\alpha$ -pinène (30 à 32%) avec du pinocarvéol (40 à 42%) et/ou de la pinocarvone (62 à 65%) (Japon).

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles récoltées au Nigeria, étudié par Onocha et coll., en 1999 contenait 16% d'acétate de terpinyle à coté de l' $\alpha$ -terpinène (56%) et du p-cymène (15%).

Lawrence, en 1999, dans un article bibliographique consacré à *Chenopodium ambrosioides*, explique qu'il existe deux variétés pour cette espèce botanique: la variété *anthelminticum* (syn. *Teloxys ambrosioides* (L.) W. A. Weber) et la variété *ambrosioides*. L'ascaridole serait généralement majoritaire chez la première tandis que les huiles essentielles de la deuxième contiendraient de faibles teneurs en cet endopéroxyde.

En 2000, Ahmed a fractionné l'huile essentielle extraite des feuilles récoltées en Egypte, il a isolé deux polyhydroxymenthanes: le 1,4-dihydroxy-p-menth-2-ène et le 1, 2, 3, 4-tétrahydroxy-p-menthane identifiés par RMN du  $^{13}\text{C}$ .

La même année, Jirovetz et coll. analysent l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum* récoltée en Inde et décrivent une composition chimique caractérisée par une très forte teneur en monoterpènes hydrocarbonés ( $\alpha$ -terpinène 65.4% et p-cymène 29.4%) et une très faible proportion d'ascaridole (0.7%). Ce résultat leur semble surprenant pour la variété *anthelminticum*.

En 2001 Ndoye Foe-Beling, a montré que les huiles essentielles extraites de la plante entière récoltée dans différentes régions du Cameroun (Mbang, Lomié et Eboué) contiennent des taux importants d'ascaridole (58.7%, 86.6%, 24.6%), à coté de l' $\alpha$ -terpinène

(0.5%, 2.6%, 36.5%), du p-cymène (-, -, 34.1%), de l'hydroxyascaridole (24.7%, -, -) et du carvacrol (13%, 5%, 2.4%) respectivement.

**Huang et Kong, en 2002**, trouvent une huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* récoltée en Chine riche en ascaridole (23.5%), p-cymène (29.7%) et  $\alpha$ -terpinolène (31.2%); le taux d' $\alpha$ -terpinène est faible (9%).

La même année, **Gupta et coll.** ont montré qu'une huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* obtenue à partir de la partie aérienne de la plante récoltée au Sud de l'Inde contenait 63.9% d' $\alpha$ -terpinène, 19.5% de p-cymène et seulement 6.2% d'ascaridole.

**En 2003, Pino et coll.** n'ont pas repéré l'ascaridole dans l'huile essentielle de la plante récoltée au Cuba; celle-ci contenait 73.9% d'acétate d' $\alpha$ -terpinyle et 4.3% de p-cymène.

**En 2004, Cavalli et coll.** ont réalisé une étude approfondie sur l'huile essentielle obtenue à partir de feuilles récoltées à Madagascar. Les analyses par GC, GC/MS, et  $^{13}\text{C}$ -NMR ont montré qu'elle contenait 40 à 55% d'ascaridole, 5 à 18% d'isoascaridole et des quantités variables de p-cymène, d' $\alpha$ -terpinène et de limonène. Les analyses RMN ont confirmé la présence de polyhydroxy-menthanes déjà identifiés par **Ahmed en 2000**.

**En 2006, Kasali et coll.** ont récolté à Badagry (Nigeria) une plante dont les parties aériennes ont fourni une huile essentielle riche en  $\alpha$ -terpinène (55%), en p-cymène (17%), et en 1,4-époxy-p-menth-2-ène (18%). Les auteurs montrent que l'ascaridole est thermodégradable. Si cette assertion est exacte, elle pourrait expliquer les grandes variations des taux d'ascaridole dans les nombreuses huiles essentielles analysées jusqu'ici. Ce point particulier nécessitait d'être vérifié.

### ➤ **Investigation biologique**

Faisant référence à des travaux relativement anciens, **Kerharo et Adam** indiquaient **en 1974** que l'ascaridole est le principe actif de l'essence; il serait toxique pour les animaux à sang froid et il paralyse et tue les vers parasites. L'essence est plus efficace contre les ascaris et les ankylostomes que contre les oxyures et les ténias.

Son emploi chez l'homme doit néanmoins être surveillé car des phénomènes d'intolérance peuvent se manifester: vertige, vomissements, céphalées.

Des études plus récentes menées sur cette espèce sont peu nombreuses:

**En 2000, Delespaul et coll.** ont montré que l'huile essentielle de la variété *anthelminticum* riche en ascaridole (59.2%) présentait une forte activité antifongique aussi

bien par contact que par la méthode en «micro-atmosphère» utilisant la phase «vapeur» de l'huile essentielle.

En 2002, Kiuchi et coll. ont étudié la concrète obtenue à partir de la partie aérienne fraîche de *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum* par extraction à l'acétate d'éthyle à la température ambiante; ils ont trouvé que cet extrait contient majoritairement l'ascaridole et qu'il montre une forte activité anti-trypanosomique.

### 3- 1- 3 – Résultats et discussion

L'hydrodistillation des feuilles de *Chenopodium ambrosioides* récoltées à Cotonou et à Sèhouè en 2003, 2004, 2005, 2006 a permis d'obtenir des huiles essentielles avec des rendements compris entre 0.1 à 1.3% (m/m) ce qui représente une variabilité relativement importante des valeurs (tableau 9). Ces rendements sont comparables à ceux de la littérature (Sagrero-Nieves et Bartley, 1995; Muhayimana et coll., 1998; Gupta et coll, 2002; Pino et coll, 2003; Kasali et coll, 2006; Ayedoun, 1995)

L'extrait au pentane de cette même espèce a donné un rendement de 0.3%, probablement en raison du traitement «à froid» de l'échantillon végétal (tableau 9, échantillon 8).

Les résultats des analyses chimiques de ces différents échantillons sont rassemblés dans les tableaux 10 et 11.

Dans le tableau 10, ont été rassemblés les résultats relatifs à des échantillons récoltés entre 2003 et 2004 dans deux régions du Bénin.

Le tableau 11 correspond à des échantillons récoltés en 2006 dans la région de Sèhouè et donne les résultats obtenus sur trois échantillons d'huiles essentielles et un extrait au pentane (échantillon 8), étudié pour contrôler l'influence du mode d'extraction sur la composition chimique des constituants volatils de la plante.

Une analyse chromatographique a également été effectuée en réglant la température de l'injecteur à 100°C au lieu de 200°C (échantillon 9) pour tester la «thermostabilité» de l'ascaridole.

**Tableau 9:** Extraction d'huiles essentielles de feuilles de *Chenopodium ambrosioides* L.

Echantillons	Date et lieu de la récolte	Méthode d'extraction	Rendement (%)
1	12/02/04 à Cotonou	hydrodistillation	0.4
2	20/12/03 à Cotonou	hydrodistillation	0.3
3	31/05/04 à Sèhouè	hydrodistillation	1.2
4	08/08/04 à Sèhouè	hydrodistillation	1.3
5	22/02/06 à Sèhouè	hydrodistillation	0.9
6	22/02/06 à Sèhouè	hydrodistillation	0.9
7	22/02/06 à Sèhouè	hydrodistillation	0.1
8	22/02/06 à Sèhouè	Extrait au pentane	0.3

Les échantillons 5, 6 et 7 sont des huiles essentielles et 8 est un extrait obtenus par hydrodistillations distinctes ou extraction d'échantillons végétaux issus d'un même lot.



**Planche 6:** *Chenopodium ambrosioides* L.

**Tableau 10:** Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles de *Chenopodium ambrosioides* L. récolté dans deux régions du Bénin

Nom des composés	*R	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)
myrcène	984	0.1	0.1	0.1	0.1
$\alpha$ -terpinène	1027	69.2	48.8	60.0	82.3
p-cymène	1030	10.0	19.1	15.4	0.6
limonène	1034	0.6	0.6	0.6	0.1
$\gamma$ -terpinène	1058	0.8	0.7	0.8	0.6
terpinolène	1086	0.1	0.1	0.1	0.1
p-cyménène	1088	0.1	0.1	0.1	0.1
M = 126	1104	0.1	0.5	0.5	0.1
M = 152	1166	0.1	-	0.2	0.1
terpinèn-4-ol	1176	-	0.2	-	0.1
p-cymèn-8-ol	1188	0.1	0.2	0.2	0.1
$\alpha$ -terpinéol	1215	0.2	0.1	-	0.1
N.I	1225	0.1	0.2	0.4	0.1
ascaridole	1226	14.9	19.7	13.8	12.6
oxyde de carvénone	1230	0.1	0.5	0.3	0.1
cis-oxyde de pipéritone	1235	0.2	0.6	0.4	0.2
trans-oxyde de pipéritone	1239	0.8	1.1	0.8	0.2
trans-glycol ascaridole	1256	0.3	1.0	1.4	0.1
cis-glycol ascaridole	1272	0.2	0.7	1.1	0.1
thymol	1283	0.2	0.5	-	0.1
carvacrol	1292	0.2	0.5	0.5	0.1
isoascaridole	1299	1.3	2.5	1.6	1.6
N.I	1305	0.1	0.8	0.8	0.1
tiglate d'hexyle	1325	0.1	-	0.1	-
N.I	1329	-	-	0.5	-
périllaldéhyde	1340	-	0.4	-	-
N.I	1375	-	-	0.2	-
acétate de 9-menthényle	1405	-	-	-	0.1
$\beta$ -caryophyllène	1439	-	0.5	-	-
N.I	1473	-	0.1	0.1	0.1
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>80.9</b>	<b>69.5</b>	<b>77.1</b>	<b>83.9</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>18.6</b>	<b>28.0</b>	<b>20.3</b>	<b>15.7</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		-	<b>0.5</b>	-	-
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		-	-	-	-
<b>Autres composés</b>		<b>0.1</b>	-	<b>0.1</b>	-
<b>Total</b>		<b>99.6</b>	<b>98.0</b>	<b>97.5</b>	<b>99.6</b>

1 = Cotonou 1 le 12/02/04;

2 = Cotonou 2 le 20/12/03;

3 = Sèhouè le 31/05/04;

4 = Sèhouè le 08/08/04;

\*IR sur une colonne DB1

**Tableau 11:** Composition chimique d'huiles essentielles et d'un extrait au pentane de feuilles de *Chenopodium ambrosioides* L. récolté à Sèhouè en 2006.

Nom des composés	*IR	5(%)	6(%)	7(%)	8(%)	9(%)
myrcène	984	0.1	0.1	-	-	-
<b>α-terpinène</b>	<b>1027</b>	<b>63.7</b>	<b>44.9</b>	<b>37.7</b>	<b>34.1</b>	<b>67.7</b>
<b>p-cymène</b>	<b>1030</b>	<b>19.0</b>	<b>19.1</b>	<b>30.2</b>	<b>14.1</b>	<b>17.0</b>
limonène	1034	0.6	0.5	0.6	0.3	0.6
γ-terpinène	1058	0.9	0.7	0.9	0.5	0.9
terpinolène	1086	0.1		0.3	-	-
p-cyménène	1088	0.1	0.1	0.5	-	-
M = 126	1104	-	-	-	-	-
M = 152	1166	-	-	-	-	-
terpinèn-4-ol	1176	-	-	-	-	-
p-cymèn-8-ol	1188	0.1		1.0	-	-
α-terpinéol	1215	0.1	-	1.3	0.1	-
NI	1225	-	0.2	0.1	-	-
<b>ascaridole</b>	<b>1226</b>	<b>11.7</b>	<b>22.7</b>	<b>8.2</b>	<b>33.1</b>	<b>11.5</b>
oxyde de carvénone	1230	0.2	0.1	0.8	-	0.2
cis-oxyde de pipéritone	1235	0.2	0.4	-	-	0.7
trans-oxyde de pipéritone	1239	0.5	1.3	-	0.4	-
trans-glycol ascaridole	1256	0.2	6.7	0.6	0.7	0.2
cis-glycol ascaridole	1272	0.2	1.1	1.0	-	-
thymol	1283	-	0.1	0.2	-	-
carvacrol	1292	-	0.1	0.2	-	-
<b>isoascaridole</b>	<b>1299</b>	<b>0.7</b>	<b>1.7</b>	<b>2.9</b>	<b>16.4</b>	<b>0.4</b>
N.I	1305	0.2	0.5	1.1		-
tiglate d'hexyle	1325	0.1	-	0.4		-
N.I	1329	0.1	-	0.8		-
périllaldéhyde	1340	-	-	0.4		-
N.I	1375	-	-	1.0	0.3	-
acétate de 9-menthényle	1405	-	-		-	-
β-caryophyllène	1439	0.3	0.1	1.8	-	0.3
N.I	1441	0.3		1.5	-	0.2
N.I	1473	0.3		0.8	-	0.2
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>84.5</b>	<b>65.4</b>	<b>70.2</b>	<b>49.0</b>	<b>86.2</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>13.9</b>	<b>34.2</b>	<b>16.6</b>	<b>50.7</b>	<b>13.0</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>0.3</b>	<b>0.1</b>	<b>1.8</b>	<b>-</b>	<b>0.3</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Autres composés</b>		<b>0.1</b>	<b>-</b>	<b>0.4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Total</b>		<b>98.8</b>	<b>99.7</b>	<b>89.0</b>	<b>99.7</b>	<b>99.5</b>

5 = Sèhouè 1 le 22/02/06;

6 = Sèhouè 2 le 22/02/06

7 = Sèhouè 4 le 22/02/06;

8 = Sèhouè extrait au pentane le 22/02/06

9 = Echantillon 5 du 22/02/06 injecté à 100°C au lieu de 200°C qui représente la température de l'injecteur pour toutes les autres analyses.

\*IR sur une colonne DB1

Les huiles essentielles sont principalement constituées de métabolites volatils à structure p-menthanique, conformément aux résultats de la littérature.

L'étude comparative des compositions chimiques des huiles essentielles (1) à (7) montre que l' $\alpha$ -terpinène est le constituant majoritaire (42-82%) dans tous les échantillons, accompagné de p-cymène, la somme des pourcentages relatifs de ces 2 composés représentant de 64 à 83% du mélange.

Les deux autres composés «caractéristiques» de ces huiles essentielles sont l'ascaridole formé par addition d'une molécule d'oxygène sur l' $\alpha$ -terpinène (8.2-22.7%) et son dérivé diépoxy, l'isoascaridole (0.7-2.9%), toujours minoritaire.

L'ascaridole est décrit comme une molécule fragile, sensible aux chocs thermiques et aux agressions chimiques.

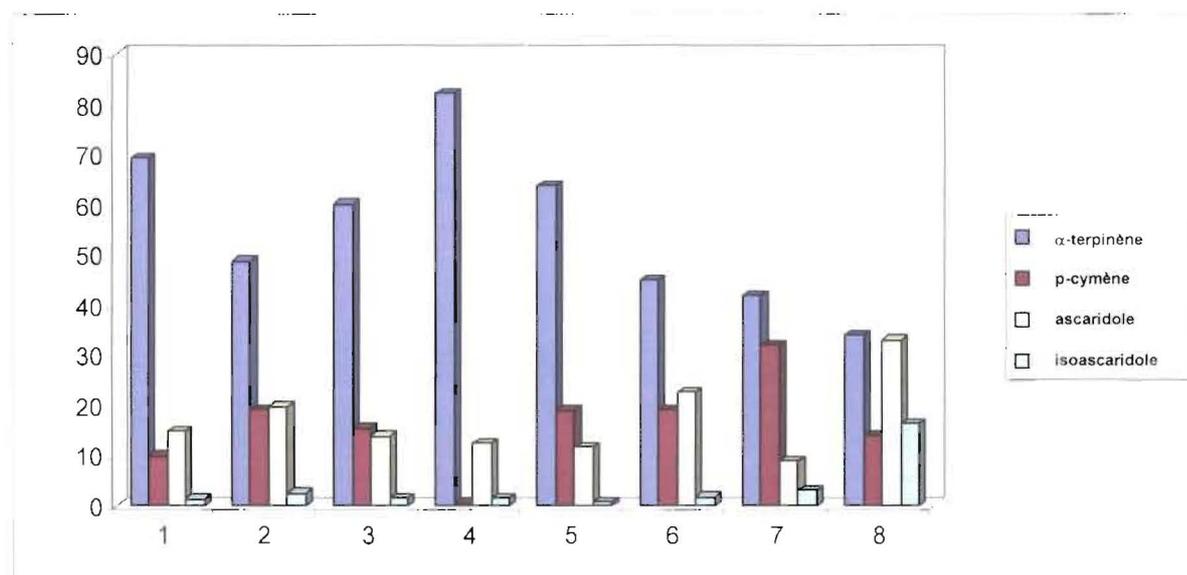
Ces considérations s'accordent mal avec les analyses chromatographiques qui impliquent une volatilisation des échantillons à des températures élevées; cependant, des travaux récents de **Cavalli et coll., 2004** ont montré que la décomposition thermique de l'ascaridole reste limitée aux températures d'injections usuelles.

Nous avons voulu vérifier cette affirmation et pour cela nous avons réalisé 2 types d'expériences

1- Nous avons répété plusieurs fois l'analyse d'un même échantillon en maintenant la température à 200°C c'est-à-dire selon les mêmes conditions opératoires que celles appliquées à l'ensemble de nos échantillons. Nous avons observé une très bonne reproductibilité des résultats.

2- Nous avons réinjecté l'échantillon 5 en fixant la température à 100°C au lieu de 200°C et avons obtenu des résultats très comparables à ceux réalisés à 200°C ce qui valide l'ensemble de nos analyses.

La figure 11 donne la répartition des quatre constituants caractéristiques de *Chenopodium ambrosioides* dans les différents échantillons. Sur ce même graphique, sont représentées les valeurs obtenues pour l'échantillon 8, obtenu par extraction au pentane à froid du même échantillon de plante utilisé pour produire les huiles essentielles (5 à 7).

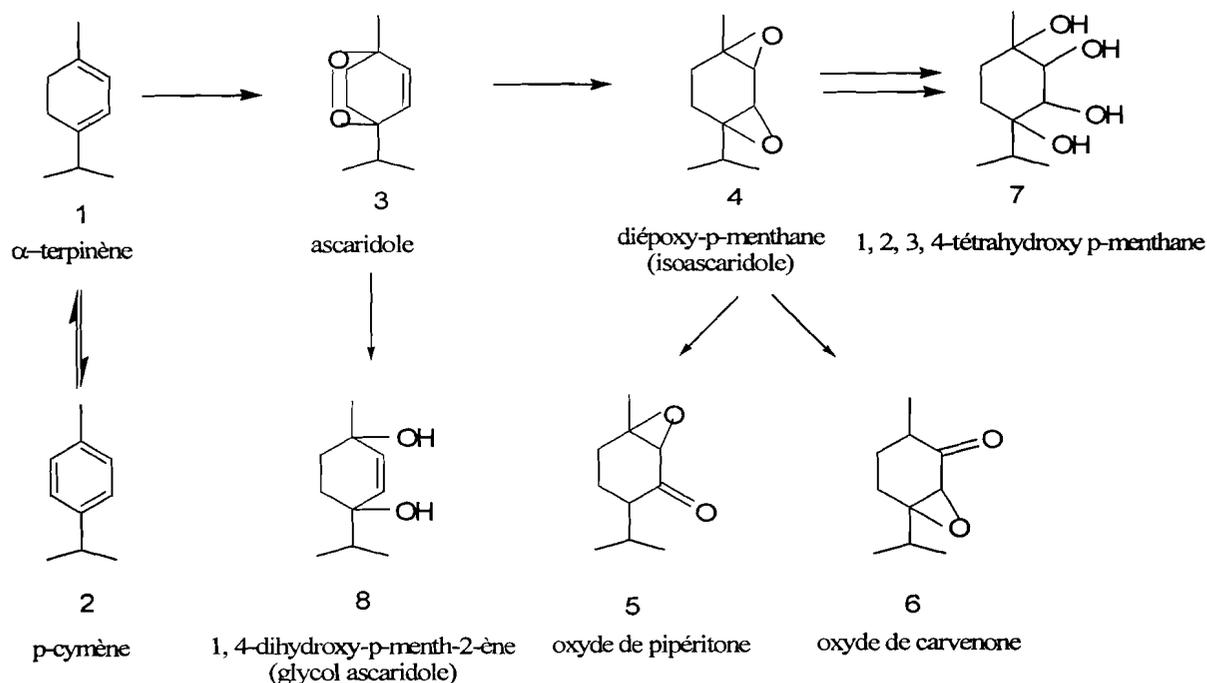


**Figure 11** : Répartition des composés caractéristiques dans les échantillons d'huiles essentielles et dans l'extrait au pentane de feuilles de *Chenopodium ambrosioides* L.

On observe très nettement une diminution des teneurs en  $\alpha$ -terpinène plus p-cymène (48.2% au total) dans l'extrait au pentane (échantillon 8), alors que la teneur en ascaridole (33.1%) et en isoascaridole (16.4%) sont nettement plus élevées.

On note également, dans l'huile essentielle, outre la faible teneur en isoascaridole, l'apparition de divers produits oxygénés: pipéritone, oxyde de pipéritone (5), oxyde de carvénone (6) et glycol ascaridole (8).

Ces observations sont cohérentes avec les transformations explicitées dans le **Figure 12**. Le végétal génère initialement de l' $\alpha$ -terpinène (1) et ce monoterpène est ultérieurement oxydé en composés (3) et (4); il peut conduire également au p-cymène (2) ce qui explique que les proportions relatives de ces composés soient directement liées.



**Figure 12:** Filiation biogénétique et chimique des composants volatils de *Chenopodium ambrosioides* L.

Les conditions d'extraction sont également très importantes; les faibles teneurs en isoascaridole dans l'huile essentielle laissent supposer que lors de l'hydrodistillation, le diépoxy-p-menthane (4) est simultanément isomérisé et hydrolysé sous l'action des protons du milieu (pH = 4-5) aqueux bouillant. La première transformation donne les oxydes (5) et (6), la seconde conduit finalement au tétrol (1, 2, 3, 4-tétrahydroxy p-menthane 7).

Nous n'avons pas identifié ce composé dans nos échantillons; il est en effet très polaire et se dégrade probablement au niveau de l'injecteur du chromatographe en phase gazeuse. Il a cependant été observé par d'autres auteurs (Ahmed, 2000 et Cavalli et coll., 2004) par étude RMN, technique qui préserve l'intégralité des structures.

Dans nos huiles essentielles nous avons également identifié les deux glycols diastéréoisomères (8a) et (8b); ils sont vraisemblablement formés par réduction de l'ascaridole (3). Ces produits ont déjà été identifiés dans d'autres huiles essentielles de *Chenopodium*.

Nous avons donc voulu vérifier ces hypothèses concernant les transformations chimiques représentées à la figure 12 et tester l'influence des conditions d'hydrodistillation sur la composition chimique des huiles essentielles.

Pour cela nous avons repris l'hydodistillation de l'échantillon (7); cette huile essentielle de couleur noire avait probablement été surchauffée (d'où probablement ce rendement anormalement bas obtenu) et effectivement, la teneur en ascaridole est particulièrement faible dans cet échantillon, caractérisé parallèlement par une teneur très élevée en p-cymène.

Les conditions de l'hydrodistillation sont données dans le tableau 12.

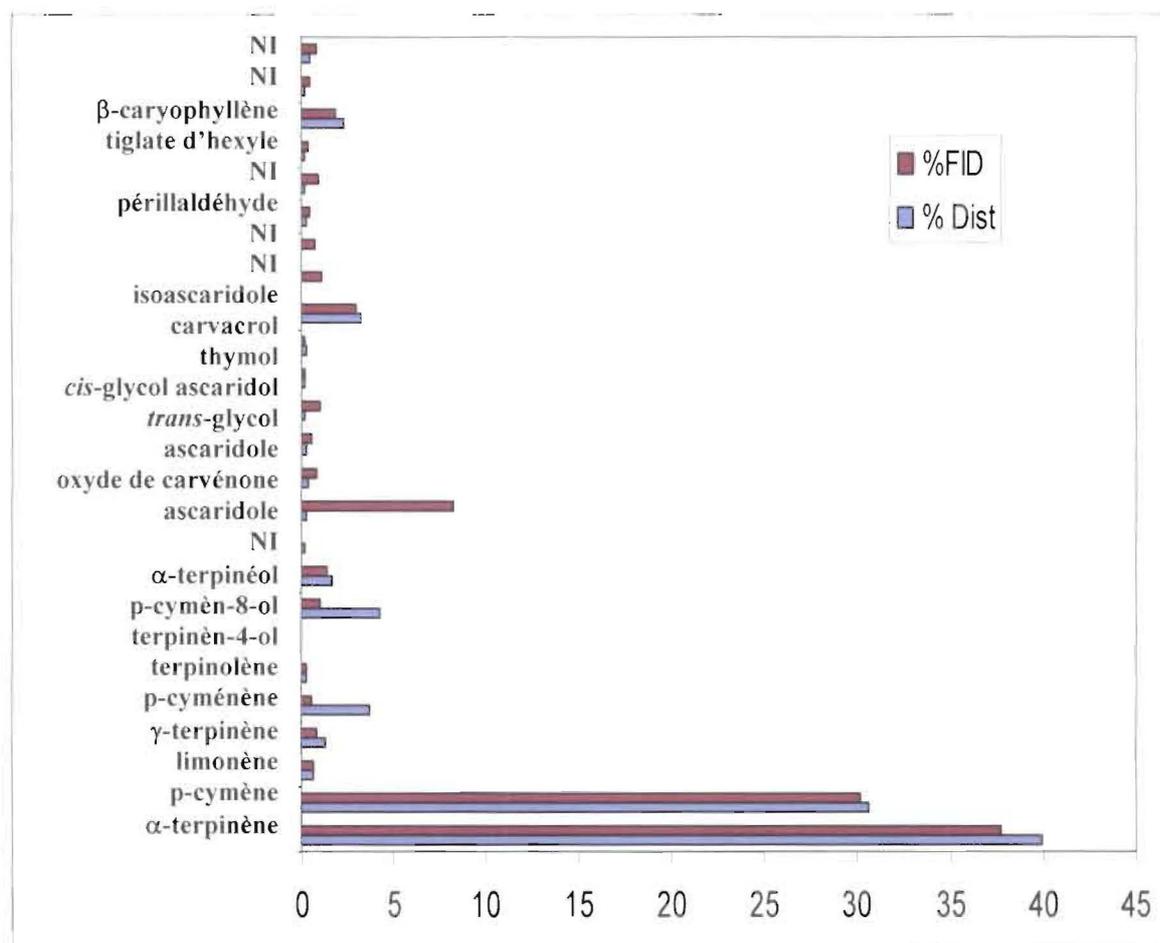
**Tableau 12:** Différentes fractions obtenues après hydrodistillation de 1 g d'huile essentielle de l'échantillon 7 de *Chenopodium ambrosioides* L (pH = 4).

Fractions obtenues	F1	F2	F3	F4	F5
Température	93°C-96°C	96°C	96°C	96°C	96°C
Temps de distillation (minutes)	15	5	10	15	30
Masse des fractions (mg)	456	22	22	37	27

Le pH de la solution a été contrôlé à pH=4 et la distillation a été menée pendant 75 minutes. La température du distillat est restée constante pendant toute la durée de l'hydrodistillation (96°C); la majorité de l'échantillon est distillée pendant les 15 premières minutes (F1), la poursuite de la distillation a permis de recueillir quatre autres fractions, en quantités beaucoup plus faibles, laissant un «résidu de distillation» complètement noir. Toutes les fractions ont été analysées (tableau 13) et les «quantités de chaque constituant récupérées après distillation» calculées en prenant en compte les masses de chaque fraction permettant ainsi d'évaluer leur pourcentage relatif après distillation [noté (% Dist)]. Les valeurs obtenues sont comparées aux pourcentages relatifs obtenus dans l'échantillon (7) initial (% FID). L'ensemble des résultats est présenté sous la forme d'un graphique (figure 13).

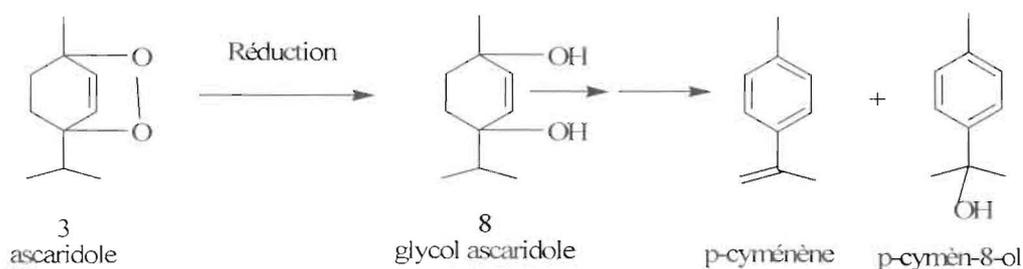
**Tableau 13: Composition chimique de l'huile essentielle de l'échantillon 7 de *Chenopodium ambrosioides* L fractionnée par hydrodistillation**

Nom des composés	F 1	x 456 (masse de chaque constituent dans F1)	F 2	x 22 (masse de chaque constituent dans F2)	F 3	x 22 (masse de chaque constituent dans F3)	F 4	x 37 (masse de chaque constituent dans F4)	F 5	x 27 (masse de chaque constituent dans F5)	Total (masse de chaque constituent récupéré par hydrodistillation	% Dist	%FID
$\alpha$ -terpinène	49.1	22389,60	4.0	88	1.3	29	0.1	4	0.2	5	22515,30	39,92	37,7
p-cymène	37.2	16963,20	8.1	178	4.0	88	0.4	15	1.5	41	17284,70	30,65	30,2
limonène	0.8	364,80		0		0		0		0	364,80	0,65	0,60
$\gamma$ -terpinène	1.2	547,20	2.1	46	2.5	55	1.9	70	0.9	24	743,00	1,32	0,9
p-cyménène	3.9	1778,40	4.4	97	3.6	79	1.7	63	2.6	70	2087,50	3,70	0,5
terpinolène	0.4	182,40		0		0		0		0	182,40	0,32	0,3
p-cymèn-8-ol	1.7	775,20	20.9	460	15.6	343	13.3	492	11.4	308	2378,10	4,22	1,0
$\alpha$ -terpinéol	1.2	547,20	7.2	158	3.7	81	2.1	78	1.9	51	916,00	1,62	1,3
NI		0,00	0.6	13	0.8	18	1.0	37	0.9	24	92,10	0,16	0,02
ascaridole		0,00	0.9	20	1.2	26	1.8	67	1.8	49	161,40	0,29	8,20
oxyde de carvénone	0.2	91,20	2.5	55	1.6	35	0.9	33		0	214,70	0,38	0,8
trans-glycol ascaridole	0.1	45,60	1.4	31	1.0	22	0.9	33	0.6	16	147,90	0,26	0,6
cis-glycol ascaridole		0,00	0.5	11	0.8	18	1.0	37	0.6	16	81,80	0,15	1,0
thymol		0,00	1.4	31	1.7	37		0	0.7	19	87,10	0,15	0,2
carvacrol		0,00	0.6	13	1.2	26	1.3	48	2.0	54	141,70	0,25	0,2
isoascaridole		0,00	8.8	194	12.4	273	15.5	574	28.7	775	1814,80	3,22	2,9
NI		0,00	0.5	11		0		0	0.6	16	27,20	0,05	1,1
tiglate d'hexyle		0,00	0.7	15	0.7	15	1.7	63		0	93,70	0,17	0,4
NI		0,00		0		0		0	0.9	24	24,30	0,04	0,8
périllaldéhyde		0,00	1.0	22	1.3	29	1.5	56	1.4	38	143,90	0,26	0,4
NI		0,00		0		0	1.1	41	1.7	46	86,60	0,15	1,0
$\beta$ -caryophyllène	0.8	364,80	6.3	139	3.4	75	2.0	74	23,00	621	1273,20	2,26	1,8
NI		0,00		0		0		0		0	0,00	0,00	1,5
NI		0,00	2.3	51	5.6	123	1.6	59	0.6	16	249,20	0,44	0,8



**Figure 13 :** Répartition des différents constituants de l'huile essentielle de l'échantillon 7 de *Chenopodium ambrosioides* L (%FID) comparée à celle obtenue après hydrodistillation fractionnée (% Dist).

On observe la quasi disparition de l'ascaridole; parallèlement on a relevé l'augmentation des taux de certains composants secondaires, dont le p-cyménène et le p-cymèn-8-ol. Il est difficile de rationaliser ce résultat; on peut supposer que l'ascaridole a été réduit en glycol ascaridole (8) qui, lui-même, a donné naissance à plusieurs sous-produits dont le p-cyménène et le p-cymèn-8-ol (figure 14)



**Figure 14 :** Transformation chimique probable de l'ascaridole sous l'effet d'une hydrodistillation

Ces résultats expliquent donc probablement la variabilité des compositions chimiques décrites dans la littérature pour l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* et remet peut être en question la distinction des variétés *anthelminticum* et *ambrosioides* sur la base de leur teneur en ascaridole. Cette espèce demeure néanmoins dominée, dans tous les cas, par les structures p-menthaniques avec les proportions relatives variables de ces dérivés, suivant le stade végétatif de la plante mais probablement également, suivant les conditions de l'extraction.

## 4- FAMILLE DES GUTTIFERAE

### 4- 1 - *Pentadesma butyracea* Sabine

Synonymes:            *Pentadesma leucantha* A. Chev.  
                              *Pentadesma nigritiana* Bak.  
                              *Pentadesma grandifolia* Bak.  
                              *Pentadesma kerstingii* Engl.

Nom usuel        :        Arbre à beurre

#### 4- 1- 1 - Botanique et utilisation

C'est un arbre des régions forestières de l'Afrique occidentale de 30 m de hauteur, au maximum avec un fût cylindrique pouvant atteindre 100 cm de diamètre; l'écorce rugueuse et profondément fendillée laisse exsuder un suc résineux épais, de couleur jaune rougeâtre. Les feuilles sont oblongues, à limbe coriace (**Hutchinson et Dalziel, 1954**).

Les fleurs sont très grandes, blanches, ou parfois rougeâtres.

Les fruits sont volumineux, ovoïdes, à sommet apiculé, et surface grisâtre, plus ou moins rugueuse, renfermant des amandes oléagineuses.

C'est un très beau bois rouge, assez commun dans certaines contrées.

Les graines servent d'appât pour attraper les porcs-épics (**Raponda-Walker et Sillans, 1961**).

L'aire de distribution de *Pentadesma butyracea* en Afrique Tropicale s'étend de la Sierra Leone en République Démocratique du Congo. Au Bénin, on connaît quatre zones de présence de cet arbre dans la zone centre-ouest, limitrophe du Togo (Bassila, Agbassa, Natitingou et Gbassé).

Les graines de *Pentadesma butyracea* contiennent 30 à 40% d'une matière grasse connue sous le nom de beurre de Lamy ou de Kanya (**Kerharo et Adam, 1974**).

Il est utilisé pour la cuisson des aliments mais également pour la fabrication des bougies, dans les cosmétiques et la fabrication des savons. (**Sinsin et Sinadouwirou, 2003**).

L'écorce macérée sert en lotions pour le traitement des maladies parasitaires de la peau; bouillie elle est utilisée comme remède antidiarrhétiq. (**Raponda-Walker et Sillans 1961**).

La décoction des racines est utilisée pour lutter contre les vers intestinaux (Abbiw, 1990).

Une préparation cosmétique à base de ce «beurre» de *Pentadesma* a été brevetée par la Société Clarins (Courtin, 1986).

#### 4-1-2 - Travaux antérieurs

Aucune étude chimique n'a été réalisée à ce jour sur le genre *Pentadesma* dans le domaine des huiles essentielles.

#### 4-1-3 - Résultats et discussion

L'hydrodistillation pendant 3 heures des feuilles et des écorces récoltées sur différents individus dans trois zones de la région de Natitingou a donné des huiles essentielles dont les rendements sont donnés dans le tableau 14.

Les rendements en huile essentielle sont faibles dans tous les cas, inférieurs ou égaux à 0.1% (m/m), les écorces étant un peu plus riches en constituants volatils que les feuilles.

**Tableau 14:** Extraction des huiles essentielles de *Pentadesma butyracea* Sabine du Bénin (feuilles et écorces)

Echantillons		Date et lieu de la récolte	Méthode d'extraction	Rendement (%)
Feuilles	1	14/09/05 à Peperko (Natitingou)	Hydrodistillation	0.01
	2	14/09/05 à Natitingou centre	Hydrodistillation	0.01
Ecorces	1	14/09/05 à Peperko (Natitingou)	Hydrodistillation	0.08
	2	14/09/05 à Natitingou centre	Hydrodistillation	0.09
	3	14/09/05 à Natitingou centre	Hydrodistillation	0.1



**Planche 7: *Pentadesma butyracea* Sabine**

Les résultats de l'analyse chimique des différents échantillons étudiés sont reportés dans le tableau 15.

**Tableau 15 : Composition chimique d'huiles essentielles de *Pentadesma butyracea* Sabine (feuilles, écorces).**

Nom des composés	*IR	Feuilles		Ecorces		
		%1	%2	%1	%2	%3
$\alpha$ -cubébène	1356	0.4	0.5	-	0.5	-
$\alpha$ -copaène	1392	14.3	14.4	1.2	1.1	0.6
$\beta$ -caryophyllène	1447	58.3	61.2	76.8	73.8	77.1
$\alpha$ -humulène	1474	9.4	10.4	12.8	14.1	14.0
zingibérène	1485	-	-	0.1	0.8	0.2
germacrène D	1486	0.8	0.9	-	-	-
$\beta$ -sélinène	1501	0.4	0.4	0.1	0.2	0.1
$\beta$ -bisabolène	1532	2.1	2.4	5.4	3.2	4.6
$\delta$ -cadinène	1538	3.2	3.5	0.4	1.4	0.4
M = 222	1549	0.3	0.6	-	-	-
NI	1564	0.3	-	-	-	-
caryophyllène alcool	1587	0.9	0.7	0.1	0.3	0.3
oxyde de caryophyllène	1600	3.9	1.5	1.7	2.5	1.5
oxyde d'humulène II	1612	0.8	0.3	0.3	0.5	0.3
M = 220	1621	0.6	0.3	0.2	0.3	0.2
M = 222	1632	0.5	-	-	-	-
NI	1643	0.5	0.6	-	-	-
caryophylladiénol*	1647	1.2	0.3	-	-	-
M = 220	1661	0.7	0.3	0.1	0.2	0.2
M = 220 + M = 222	1674	0.9	0.9	0.2	0.4	0.2
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>88.9</b>	<b>93.7</b>	<b>96.7</b>	<b>94.3</b>	<b>96.8</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>6.8</b>	<b>2.8</b>	<b>2.1</b>	<b>3.3</b>	<b>2.1</b>
<b>Total</b>		<b>95.7</b>	<b>96.5</b>	<b>98.8</b>	<b>97.6</b>	<b>98.9</b>

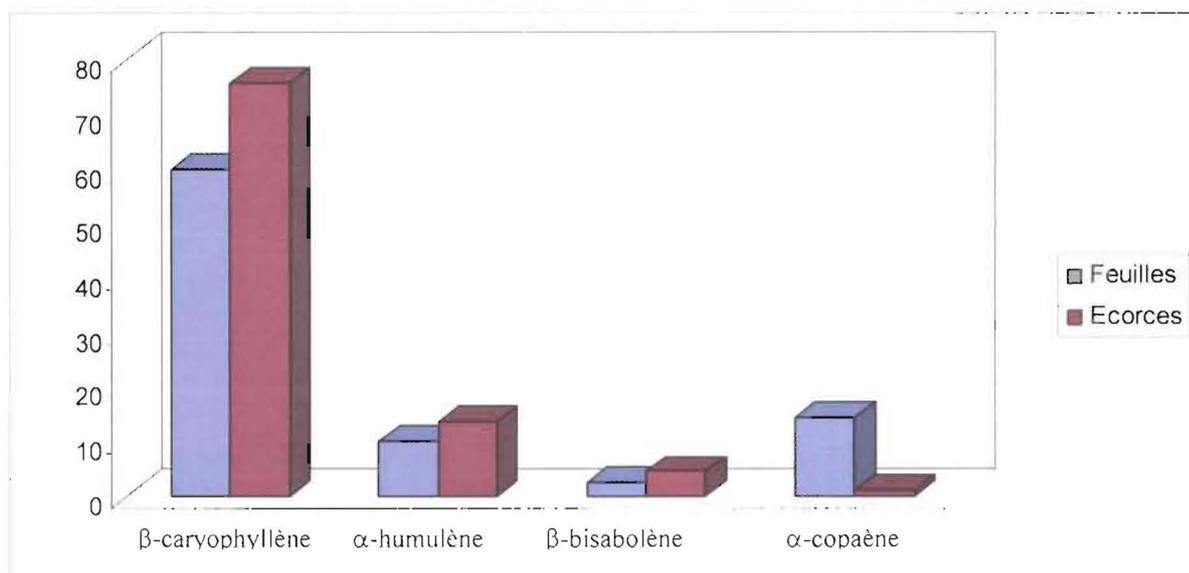
\* Spectres des composés non identifiés (NI) en annexes

Feuilles: 1 = 14/09/05 à Peperko (Natitingou); 2 = 14/09/05 à Natitingou centre

Ecorces: 1 = 14/09/05 à Peperko (Natitingou); 2 = 14/09/05 à Natitingou centre;

3 = 14/09/05 à Natitingou centre.

\* caryophylla-4(14), 8(15)-dièn-5-ol



**Figure 15:** Répartition des composés majoritaires dans les échantillons d’huiles essentielles de *Pentadesma butyracea* Sabine issues des feuilles et des écorces.

On trouve des compositions chimiques comparables pour les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles et des écorces de *Pentadesma butyracea*.

Dans les deux cas, les huiles essentielles sont exclusivement de type sesquiterpénique, dominées par le β-caryophyllène accompagné d’un taux d’α-humulène voisin de 10%. L’huile essentielle des feuilles se distingue par un taux relativement élevé d’α-copaène (environ 14%) alors que le 3<sup>ème</sup> composé le plus abondant de l’huile essentielle des écorces est le β-bisabolène.

On trouve dans les deux types d’échantillons un certain nombre de composés sesquiterpéniques oxygénés que nous n’avons pu identifier sur la base de leur simple spectre de masse. Malheureusement, compte tenu du faible rendement d’obtention de ces huiles essentielles, nous n’avons pas pu envisager d’isoler ces constituants pour une analyse spectrale plus complète.

Les résultats de nos investigations biologiques sur ces échantillons seront présentés dans la troisième partie.

## 5- FAMILLE DES LABIATAE

### 5- 1- *Aeolanthus pubescens* Benth.

Synonyme : *Aeolanthus guettneri* Gurke  
*Solenostemon pubescens* A. Chev.

#### 5- 1- 1 - Botanique et utilisation

C'est une plante herbacée annuelle très odorante, relativement peu décrite (**Brunel et coll., 1984; Adjanohoun et coll., 1986; Guyot 1992**). La tige est quadrangulaire de 30 à 90 cm de hauteur, généralement très ramifiée, souvent ligneuse à la base, de couleur rougeâtre et plus ou moins pubescente. Les feuilles, longues de 6 cm et larges de 2.5cm en moyenne, sont opposées, pétiolées, oblongues ou lancéolées et arrondies à l'apex. Le limbe est pourvu de nombreux poils glanduleux. L'inflorescence est composée d'épis denses terminaux, formant une panicule. La fleur est réduite à une petite corolle bilabée de couleur bleue, violette ou rose. Le calice est persistant et zygomorphe (**Hutchinson et Dalziel, 1963**). Cette espèce est répertoriée dans plusieurs pays de l'Afrique de l'Ouest notamment dans les savanes et sur les zones montagneuses du Togo, ainsi qu'au Bénin où elle pousse généralement sur les affleurements rocheux.

#### 5- 1- 2 - Travaux antérieurs

##### ➤ Etude chimique

Seules quelques publications font état de travaux menés sur des extraits volatils d'*Aeolanthus pubescens*.

En 1999, **Sanda et coll.** analysent les huiles essentielles obtenues à partir de sommités fleuries de l'espèce cultivée au Togo. Les deux constituants majoritaires sont le thymol (46-50%) et le  $\gamma$ -terpinène (12-13%).

Les huiles essentielles des feuilles et fleurs de l'espèce récoltée au Bénin (**Sohounhloue et coll., 2002**) contiennent en majorité pour les feuilles du thymol (48.4%), accompagné de son acétate (24%) et pour les fleurs (68.2%) de thymol, accompagné de son acétate (10.3%).

En 2004, Koba et coll., analysent les huiles essentielles des feuilles et des inflorescences de l'espèce récoltée dans sept régions (Lomé, Bassan, Sagbadè, Baga, Igboloudja, Ogou-kinko, Kamina) du Togo. Les auteurs concluent à l'existence de 5 chémotypes: les chémotypes à thymol, à carvacrol, à thymol/carvacrol, à carvacrol/acétate de thymyle et à fenchone.

La moitié des échantillons sont représentatifs d'un chémotype thymol, (Lomé, Sagbadè et Kamina), avec du thymol (54 à 58%), de l'acétate de thymyle (6 à 14%), du  $\gamma$ -terpinène (3 à 13%) et du p- cymène (5 à 7%).

Le chémotype à carvacrol, récolté à Bassan, fournit une huile essentielle dominée par le carvacrol (58.2%), l'acétate de carvacryle (12.6%), le thymol (10.8%), le  $\gamma$ -terpinène (5.7%) et le p- cymène (4.6%).

Le chémotype récolté à Igboloudja donne une huile essentielle contenant 41% de carvacrol et 27% de thymol, les autres constituants majoritaires sont le  $\gamma$ -terpinène (7%), le p- cymène (6%) et l'acétate de carvacryle (8%), les auteurs le désignent comme à « chémotype thymol/carvacrol ».

Le chémotype à carvacrol/acétate de thymyle est issu de Baga. L'huile essentielle contient du carvacrol (55.4%), de l'acétate de thymyle (35%), du  $\beta$ -caryophyllène (2.1%), de l'acétate de carvacryle (1.3%), et de l'oxyde de caryophyllène (1.3%).

Enfin un cinquième chémotype, avec des caractéristiques chimiques totalement différentes a été identifié à partir des résultats relatifs à l'échantillon récolté à Ogou-Kinko; son huile essentielle contient 83.7% de fenchone.

#### ➤ **Investigation biologique**

Des évaluations biologiques ont été réalisées par l'équipe de **Chaumont et coll., (2001)**; elle a testé, en particulier l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de chémotype à thymol.

### **5- 1 -3- Résultats et discussion**

L'hydrodistillation des feuilles sèches récoltées dans différentes régions de Dassa-Zoumè a donné des huiles essentielles avec des rendements compris entre 1,2% et 1,5% (m/m) (tableau 16). Ces rendements sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus lors des études précédents (1.1-1.3%).

**Tableau 16 : Extraction des huiles essentielles de feuilles d'*Aeolanthus pubescens* Benth**

<b>Echantillons</b>	<b>Date et lieu de la récolte</b>	<b>Méthode d'extraction</b>	<b>Rendement (%)</b>
1	28/06/03 à Togon	hydrodistillation	1.5
2	28/06/03 à Tré	hydrodistillation	1.2
3	28/06/03 à Awaya	hydrodistillation	1.2
4	10/08/04 à Tré	hydrodistillation	1.4



**Planche 8 : *Aeolanthus pubescens* Benth**

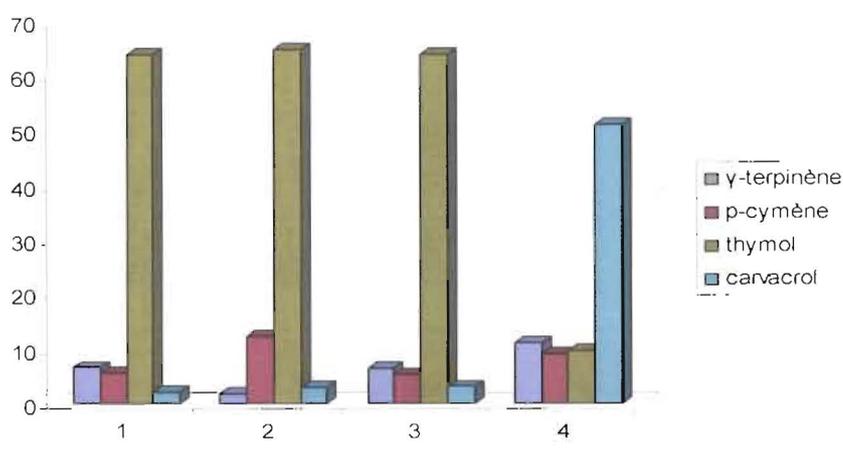
Les résultats des analyses chimiques des différents échantillons sont rassemblés dans le tableau 17.

**Tableau 17** : Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles d'*Aeolanthus pubescens* Benth

Nom des composés	*IR	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)
$\alpha$ -thujène	930	1.4	1	1.1	1.6
$\alpha$ -pinène	939	0.5	0.6	0.5	0.7
camphène	954	0.1	-	-	-
$\beta$ -pinène	981	0.1	-	-	-
myrcène	987	1.5	1.5	1.4	1.9
$\alpha$ -phellandrène	1006	0.2	-	0.2	0.2
$\alpha$ -terpinène	1018	2.0	-	1.8	2.1
<b>p-cymène</b>	<b>1023</b>	<b>5.5</b>	<b>12.2</b>	<b>5.6</b>	<b>9.0</b>
limonène	1031	0.6	0.6	0.6	0.6
(E)- $\beta$ -ocimène	1042	0.1	-	0.1	0.1
<b><math>\gamma</math>-terpinène</b>	<b>1060</b>	<b>6.6</b>	<b>1.8</b>	<b>6.4</b>	<b>11.2</b>
p-cyménène	1084	0.2	0.3	0.2	0.2
terpinolène	1089	0.1	0.1	0.1	0.1
bornéol	1152	0.1	0.3	0.2	0.1
terpinèn-4-ol	1178	1.8	1.3	1.8	2.0
<b>thymol</b>	<b>1298</b>	<b>63.8</b>	<b>64.7</b>	<b>63.9</b>	<b>9.7</b>
<b>carvacrol</b>	<b>1303</b>	<b>2.1</b>	<b>2.9</b>	<b>3.1</b>	<b>51.1</b>
acétate de thymyle	1346	10.2	9.3	9.8	0.8
acétate de terpinyle	1352	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>acétate de carvacryle</b>	<b>1360</b>	<b>0.7</b>	<b>0.7</b>	<b>0.8</b>	<b>6.1</b>
$\beta$ -caryophyllène	1439	0.2	-	0.1	0.1
$\gamma$ -gurjunène	1473	0.1	-	-	0.3
(Z)- $\alpha$ -bisabolène	1503	0.7	0.1	0.1	0.2
$\beta$ -bisabolène	1514	0.7	1.4	1.2	1.4
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>18.9</b>	<b>18.1</b>	<b>18</b>	<b>27.7</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>78.8</b>	<b>79.3</b>	<b>79.7</b>	<b>69.9</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>1.7</b>	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>	<b>2.0</b>
<b>Total</b>		<b>99.4</b>	<b>98.9</b>	<b>99.1</b>	<b>99.6</b>

1 = Récolté à Togon le 28/06/03 ; 2 = Récolté à Tré le 28/06/03 ; 3 = Récolté à Awaya le 28/06/03; 4 = Récolté à Tré le 10/08/04

\*IR sur une colonne DB1



**Figure 16** : Répartition des composés majoritaires dans les échantillons d'huile essentielle d'*Aeolanthus pubescens* Benth (feuilles)

Tous les échantillons sont dominés par des structures de type p-menthane, essentiellement aromatiques.

Trois échantillons se caractérisent par une teneur élevée en thymol (63,8 – 64,7%) accompagné de son acétate (9,3–10,2%): il s'agit des échantillons 1 à 3, récoltés à Togon, Tré et Awaya.

Le quatrième échantillon (récolté à Tré en 2004) se distingue par une teneur élevée en carvacrol (51,1%) et en son acétate (9,7%). On retrouve donc deux chémotypes, comme pour les variétés décrites au Togo.

La distinction entre les deux variétés chimiques localisées au Bénin apparaît clairement dans la représentation graphique réalisée à partir des résultats des 4 constituants majoritaires (Figure 17).

Il a été montré que l'huile essentielle à thymol présentait une activité antimicrobienne. De plus, la composition chimique de nos échantillons, riches en composés phénoliques, laisse prévoir une activité antiradicalaire que nous avons testée et dont les résultats sont présentés dans la troisième partie.

## 5-2- *Ocimum canum* Sims.

Synonymes : *Ocimum americanum* L.  
*Ocimum hispidulum* Schum. et Thonn.  
*Ocimum thymoides* Bak.

Noms vernaculaires:

Fon : Akéman, hissi hissi  
Watchi : késsou Késsou; ahamè  
Sahouè : kékéssou  
Yoruba : Efinrin  
Adja : hanassè, héhétchi, hessi hessi

### 5 -2- 1 - Botanique et utilisation

C'est une plante herbacée odoriférante qui ressemble beaucoup à l'espèce voisine *Ocimum basilicum*, mais qui se distingue par sa taille plus réduite : 30 à 40 cm de hauteur. Elle a des feuilles dentées, ovales, cunées à la base et acuminées au sommet, avec des pétioles de 5 à 15mm, des limbes de 6 à 12cm. Les épis terminaux longs de 10 à 20cm portent des fleurs blanches pubescentes.

C'est une espèce pantropicale qui est rudérale, parfois cultivée.

La classification donnée par **Paton et coll., en 1999** donne *O. canum*, comme un synonyme de la variété *americanum* d'*O. americanum* L., l'autre variété étant var. *pilosum* (anciennement *O. graveolens*)

Aux Seychelles, les feuilles sont utilisées en infusion pour leurs propriétés antitussives et antipyrétiques (**Adjanohoun et coll., 1983**).

Au Togo, le macéré du décocté aqueux chaud des tiges feuillées est utilisé pour masser les articulations dans les arthroses (**Adjanohoun et coll., 1986**).

Plus généralement, l'*Ocimum canum* est utilisé en médecine traditionnelle contre différentes affections: vomissements, coliques et diarrhées au Bénin, affections oculaires au Rwanda ou bronchites au Cameroun. (**Ndoye F., en 2001**).

En aromathérapie, les parties aériennes de cette espèce sont utilisées après simple froissement suivant diverses modalités contre l'essoufflement, les courbatures, les migraines et l'asthénie.

Le décocté des feuilles est recommandé en boissons et en lavages auriculaires pour soigner les oreillons, en massage pour les parotides et en gargarismes pour les gingivites et les pyorrhées.

En parfumerie, on utilise l'huile essentielle des feuilles du chémotype à cinnamate de méthyle. L'espèce est également utilisée comme aromate pour assaisonner de nombreux plats.

### 5- 2- 2 - Travaux antérieurs

#### ➤ Etude chimique

L'essence d'*Ocimum canum* a fait l'objet de plusieurs travaux sans doute pour les multiples vertus qui lui sont attribuées.

Les résultats obtenus montrent l'existence de plusieurs chémotypes identifiés dans des zones géographiques différentes.

**Xaasan et coll., en 1981** ont montré que l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles récoltées en Somalie était riche en camphre (60%).

**En 1986, Ntezurubanza et coll.** ont étudié deux échantillons d'huiles essentielles obtenues à partir de l'espèce récoltée au Rwanda, contenant majoritairement du linalol dans les proportions variant de 61% et 88.1%.

**En 1989, Ekundayo et coll.** ont montré que l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles récoltées à Ibadan (Nigeria) contient 66.4% d'eugénol, accompagné de  $\delta$ -cadinène (9.8%).

**Fun et coll. (1990)** analysent l'essence de l'espèce originaire d'Aruba et trouvent qu'elle contient 45.6% de (E)-cinnamate de méthyle.

**Sinha et coll. (1990)** ont montré que l'huile essentielle obtenue à partir de la plante «sauvage» originaire d'Inde contient 53.5% de camphre.

**Gupta et coll. (1990)** ont analysé les huiles essentielles de deux chémotypes, l'une à méthyl chavicol et l'autre à citral.

**Gupta et Sobti (1991)** ont étudié deux chémotypes d'*O. canum* l'un a linalol, l'autre à camphre.

**Sarin et coll. (1992)** analysent l'huile essentielle d'un échantillon récolté en Inde et trouvent qu'elle contient 76% de citral.

**Khosla et coll., en 1994** ont étudié une variété d'*O. canum* récoltée dans le Sud de l'Inde qui est riche en méthyl cinnamate.

**Ayedoun en 1995** a analysé deux échantillons d'huiles essentielles obtenues à partir des feuilles récoltées à Abomey-Calavi et à Savè (Bénin). Le premier (Abomey-Calavi) est riche en linalol (63.5%), le deuxième (Savè) est riche en terpinèn-4ol (30.8%) et en linalol (28.7%).

**Tchoumboungang en 1996**, analyse trois échantillons d'huiles essentielles extraites de feuilles récoltées dans différentes régions (Banganté, Mutenguéné et Yaoundé) du Cameroun. Le premier échantillon de Banganté, est constitué essentiellement d'un mélange des stéréoisomères (Z) et (E) du cinnamate de méthyle, le deuxième échantillon de Mutenguéné est riche en linalol (52.8%) et le troisième récolté à Yaoundé a une forte teneur en 1,8-cinéole (78.3%).

**Gupta en 1996** a identifié 2 chémotypes d'*O. canum* (type linalol, type camphre) et 2 chémotypes d'*O. americanum* (type méthyl chavicol et type citral).

**En 1997** la même équipe étudie une lignée hybride d'*Ocimum canum* riche en linalol (74%) sélectionnée pour une application en parfumerie.

**Ravid et coll., en 1997**, trouvent dans l'huile essentielle d'*O. canum* l'énantiomère (S) (+)-linalol.

**Chalchat et coll., en 1997**, analysent l'huile essentielle de l'espèce récoltée au Bénin et trouvent qu'elle contient 40% de  $\beta$ -caryophyllène, avec 6 à 24% de linalol.

**Amvam Zollo et coll., en 1998**, analysent l'huile essentielle d'*O. canum* obtenue à partir de feuilles récoltées au Cameroun et trouvent qu'elle contient 78.3% de 1,8-cinéole accompagné de  $\beta$ -pinène (5.8%).

**Sanda et coll., en 1998(a)**, ont étudié les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles et des inflorescences récoltées au Togo; ils ont montré qu'elles contiennent du terpinèn-4-ol (21-30%) comme composé majoritaire, suivi du linalol (17-19%) et du  $\gamma$ -terpinène (7-11%).

Ces résultats sont confirmés sur des échantillons de feuilles et de fleurs récoltés dans 14 régions différentes du Togo (1998b).

**En 1998**, **Yayi** travaille sur une douzaine d'échantillons récoltés au Bénin et confirme le résultat d'Ayedoun: type à linalol (32-52%) suivi du terpinèn-4ol (14-27%) auxquels s'ajoute le  $\beta$ -caryophyllène. Certains échantillons d'huiles essentielles ont néanmoins comme composant majoritaire le terpinèn-4-ol (25-53%).

**Chalchat et coll., en 1999**, rapportent des analyses réalisées sur 16 échantillons d'huiles essentielles d'*Ocimum canum* du Mali et ils identifient deux nouveaux chémotypes, l'un à  $\alpha$ -terpinéol (48-64%) et l'autre à méthyl chavicol/ $\alpha$ -terpinéol (44-52% et 20-27%).

**En 1999, Martins et coll.** ont mis en évidence l'existence d'un chémotype à trans-cinnamate de méthyle aux îles S. Tomé.

**En 2000, Vieira et coll.** ont étudié l'huile essentielle de l'espèce cultivée au Brésil et ont montré qu'elle contient plus de 90% de (E)-cinnamate de méthyle.

**Chagonda et coll., en 2000** ont réalisé l'étude d'un chémotype à camphre (39.5%-39.8%) pour l'espèce récoltée au Zimbabwe, accompagné d'un taux élevé de limonène (24.4%-25.1%).

**En 2001, Yayi et coll.** ont étudié deux chémotypes présents au Bénin: l'un à linalol (32-50%) et l'autre à terpinèn-4-ol (25-53%).

**Ndoye, en 2001** a étudié les huiles essentielles extraites de feuilles récoltées Bitouala et d'un autre lot acheté au marché de Bertoua au Cameroun et trouve qu'elles contiennent respectivement (70% et 66.1%) de 1,8-cinéole.

**En 2002 Mondello et coll.** ont étudié deux chémotypes de l'espèce *O. canum*, l'un à citral (37.7% de géraniol et 27.9% de néral), l'autre à camphre avec un taux de 38.6%.

**En 2002, Naithani et Kakkar** ont étudié l'huile essentielle de cette espèce et ont montré qu'elle contient du (E)-cinnamate de méthyle, accompagné du camphre et du citral.

**Jirovetz et coll., en 2003**, étudient l'espèce récoltée au Sud de l'Inde et trouvent qu'elle contient le (E)-cinnamate de méthyle (72.1%), le (Z)-cinnamate de méthyle (9.1%), le camphre (6.0%) et le  $\beta$ -sélinène (3.4%).

**De Vasconcelos et coll., en 2003**, trouvent que les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles, des inflorescences et des racines récoltées au Nord Est du Brésil contiennent comme composé majoritaire dans les feuilles et les inflorescences le (E)-cinnamate de méthyle (82.7%-97.5%) et de l'eugénol (88.2%) dans les racines.

**Ngassoum et coll., en 2004** ont étudié les huiles essentielles de deux variétés chimiques de l'espèce *O. canum* cultivée au Cameroun: la variété de type I est riche en linalol (44.9%) et géraniol (38.2%) tandis que la variété de type II est caractérisée par un taux élevé de limonène (41.5%) et de 1,8-cinéole (10.1%).

**Djibo et coll., en 2004**, ont étudié l'espèce du Burkina Faso et ont montré que le composé majoritaire est le 1,8-cinéole.

On peut conclure que plusieurs chémotypes ont été identifiés pour *O. canum* (ou *O. americanum*):

- certains sont dominés par des composés terpéniques: on peut citer le **linalol** (susceptible d'être associé à des taux élevés de terpinèn-4-ol, de  $\beta$ -caryophyllène ou de géraniol), le **camphre**, le **1,8-cinéole**, l' $\alpha$ -terpinéol, le **limonène** et enfin le **citral**;

- trois autres chémotypes sont dominés par des constituants aromatiques issus de la voie de l'acide shikimique: le **(E)-cinnamate de méthyle**, l'**eugénol** ou le **méthyl chavicol**.

Ces résultats confirment la variabilité chimique généralement observée au sein du genre *O. canum* et qui se retrouve pour l'espèce *O. canum*. On peut donc s'attendre à des effets biologiques différents suivants les chémotypes considérés.

#### ➤ **Investigation biologique**

Nous ne citerons que les études biologiques les plus récentes relative à l'huile essentielle *O. canum*.

**Amvam Zollo et coll., en 1998** ont étudié les activités antifongiques des huiles essentielles de plantes aromatiques camerounaises; ils ont montré que l'huile essentielle d'*O. canum* riche en 1,8-cinéole ne présentait aucune activité antifongique vis à vis de *Microsporum gypseum*, d'*Aureobasidium pullulans*, d'*Aspergillus flavus*, de *Trichoderma viride* et de *Candida albicans* selon la méthode en «micro-atmosphère».

**Singh et coll., en 1998** ont montré que l'huile essentielle extraite des feuilles d'*O. canum* originaire d'Inde présentait une activité antifongique à 300ppm vis à vis de *Colletotrichum falcatum*, *R. solani* et de *Colletotrichum paradoxa*.

**Chaumont et coll., en 2001**, ont testé cette huile essentielle contre différentes souches bactériennes de la microflore cutanée.

L'espèce *O. canum* riche en (E)-cinnamate de méthyle, en camphre et citral a présenté des activités antifongiques et antibactériennes potentielles. (**Cimanga et coll., 2002**).

**Cimanga et coll., en 2002a**, trouvent que l'huile essentielle d'*O. americanum* présente une faible activité antifongique et qu'il n'y a aucune corrélation entre l'activité antifongique et la composition chimique caractérisée par la présence d'un taux élevé de 1,8-cinéole,  $\alpha$  et  $\beta$ -pinène et de p-cymène, dans une essence obtenue à partir des feuilles récoltées en République Démocratique du Congo.

Les mêmes auteurs effectuent la même étude, également **en 2002b**, sur l'activité antibactérienne d'autres échantillons; et ils trouvent qu'il n'y a aucune corrélation entre l'activité antibactérienne et la composition chimique (1,8-cinéole,  $\alpha$  et  $\beta$ -pinène, p-cymène,

cryptone ou thymol) de cette essence obtenue à partir des feuilles récoltées en République Démocratique du Congo.

Une étude réalisée à partir d'extraits aqueux d'*O. canum* du Ghana a montré les potentialités de cette espèce dans le traitement cardio-vasculaires (Nyarho et coll., 2003).

Oussou et coll., en 2004 trouvent que l'huile essentielle riche en terpinèn-4-ol (26.9%) et  $\beta$ -caryophyllène (22.4%) obtenue à partir des feuilles récoltées en Côte d'Ivoire présente une activité antibactérienne intéressante.

En 2005, Bassole et coll. ont trouvé que les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles et des fleurs d'*O. canum* récoltées au Burkina Faso contiennent respectivement du 1,8-cinéole (60.1%) et du pipéritol (68.5%). Ils ont ensuite montré que les essences obtenues à partir des feuilles présentent une forte activité contre les bactéries Gram + tandis que celles obtenues à partir des fleurs ne présentent pas d'activité antimicrobienne significative.

### 5- 2- 3 - Résultats et discussion

L'hydrodistillation pendant 3 heures des feuilles d'*Ocimum canum* récoltées à Adjahonmè le 18 septembre 2003 a donné une huile essentielle avec un rendement de 0.5% (m/m).

Les résultats de l'analyse chimique de cet échantillon sont consignés dans le tableau 18.

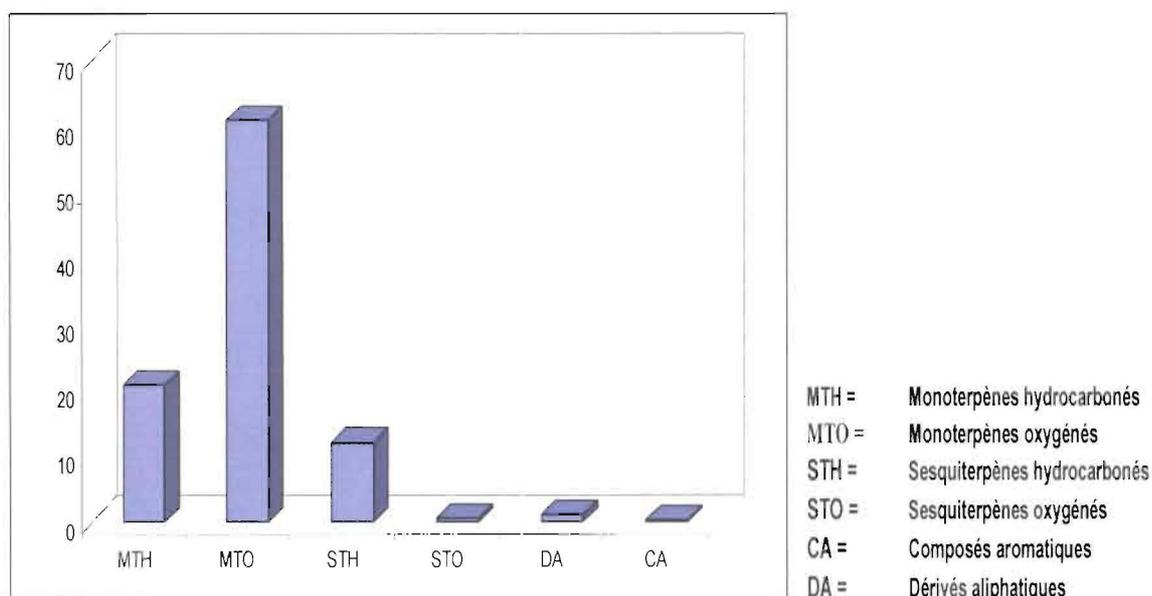


**Planche 9 : *Ocimum canum* Sims**

**Tableau 18** : Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles d' *Ocimum canum*

<b>Sims.</b>		
<b>Nom des composés</b>	<b>*IR</b>	<b>%</b>
$\alpha$ -thujène	928	1.3
$\alpha$ -pinène	937	2.0
camphène	952	0.3
sabinène	968	0.2
$\beta$ -pinène	972	0.1
acetate de (Z)-3-hexényle	979	0.2
myrcène	985	2.1
$\alpha$ -phellandrène	1016	1.4
$\alpha$ -terpinène	1020	1.7
limonène	1030	3.4
$\gamma$ -terpinène	1058	6.9
hydrate de sabinène	1065	1.0
terpinolène	1087	1.3
<b>linalol</b>	<b>1097</b>	<b>14.7</b>
acétate d'octèn-3-yle	1101	0.6
camphre	1139	1.0
bornéol	1150	0.3
<b>terpinèn-4-ol</b>	<b>1189</b>	<b>41.1</b>
p-cymèn-8-ol	1192	0.6
$\alpha$ -terpinéol	1205	0.4
acétate de fenchyle	1219	0.9
acétate de phenyl éthyle	1238	0.2
acétate de bornyle	1282	0.4
acétate de myrtényle	1318	0.4
butyrate de (Z)-3-hexényle	1368	0.2
$\beta$ -caryophyllène	1439	4.1
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotène	1446	4.8
$\alpha$ -humulène	1470	0.5
germacrène D	1486	2.4
$\beta$ -bisabolène	1510	0.2
nérolidol	1598	0.4
oxyde de caryophyllène	1611	0.1
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>20.7</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>60.8</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>12.0</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>0.5</b>
<b>Dérivés aliphatiques</b>		<b>1.0</b>
<b>Composé aromatique</b>		<b>0.2</b>
<b>Total</b>		<b>95.2</b>

\*IR sur une colonne DB1



**Figure 17** : Répartition des constituants dans l'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum canum* Sims

L'analyse des résultats montre que l'huile essentielle est riche en monoterpènes oxygénés, dominée par le terpinèn-4-ol (41.1%) accompagné du linalol (14.7%). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Ayedoun en 1995** sur un l'échantillon récolté à Savè.

Cette composition chimique rappelle également celle décrite par **Yayi en 1998** pour certains échantillons riches en terpinèn-4-ol, lors de l'étude d'un chémotype à «linalol/terpinèn-4-ol/ $\beta$ -caryophyllène», le plus souvent dominé par le linalol.

Compte tenu de cette composition chimique, on ne prévoit pas d'activité antiradicalaire, en revanche une activité anti-inflammatoire pourrait être observée compte tenu de la teneur élevée en alcools terpéniques. Les résultats de ces investigations biologiques seront présentés dans la troisième partie.

### 5-3- *Ocimum gratisimum* L.

Synonyme : *O. viride* Willd.

Nom usuel : Gros Basilic

Noms vernaculaires : Fon: Tchao

Yoruba : Simonua

Mina : Esuru

#### 5- 3- 1 - Botanique et utilisation

C'est une plante herbacée sous ligneuse atteignant 1,5m de haut, avec des feuilles opposées, elliptiques ou ovales elliptiques, à marge dentée, d'environ 10cm de long.

Les inflorescences sont des épis de petites fleurs à corolle blanche. Le calice est persistant après la chute de la corolle, renflé à la base.

L'*Ocimum gratissimum* est une espèce pantropicale, introduite et cultivée.

En médecine traditionnelle, le macéré aqueux de la pulpe ou des parties aériennes est administré per os dans les dictocies, les douleurs pelviennes, les dysménorrhées, les colliques, les candidoses digestives, les vomissements.

Le décocté aqueux des feuilles, additionné de jus de citron, est un antitussif per os.

Le suc des feuilles est administré per os dans les angines, la géophagie et la malnutrition.

Le suc des feuilles fraîches écrasées, est un antidiarrhéique et un antidyentérique par voie orale (**Adjanohoun et coll., 1986**).

Les feuilles fraîches sont conseillées aux femmes après accouchement, pour les consommer après cuisson.

Les feuilles triturées, appliquées sur les dents, sont utilisées contre les algies dentaires; en décoction, elles sont utilisées contre le diabète ou la constipation douloureuse: associées aux pétioles de bananier, elles servent à préparer un emplâtre placé sur les fractures (**Adjanohoun et coll., 1988**).

L'infusé des feuilles utilisé par voie orale combat les flatulences (**Adjanohoun et coll., 1983**).

Les inflorescences de la plante sont indiquées comme aromates dans la composition de nombreuses préparations culinaires.

### 5-3-2 - Travaux antérieurs

#### ➤ Etude chimique

Les études chimiques menées sur l'espèce *Ocimum gratissimum* sont anciennes et très nombreuses.

**Guenther**, dès 1948, indiquait que les huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* pouvaient être classées en deux groupes, riches en thymol ou en eugénol.

En 1997, dans une revue des travaux réalisés sur cette espèce, **Lawrence**, rapportait l'existence d'autres chémotypes caractérisés par:

- des teneurs élevées en méthyl eugénol/eugénol (47%/19%) chez une espèce récoltée au Brésil dans la région amazonienne (**Votrowscky et coll., 1990**)
- des teneurs élevées en eugénol/1,8-cinéole (40%/12%) chez une espèce malgache (**De Medici et coll., 1992**)
- des teneurs élevées en eugénol/ $\beta$ -caryophyllène (20%/40%) dans l'huile essentielle d'un échantillon récolté en Aruba (**Fun et coll., 1990**).
- des teneurs élevées en linalol/méthyl chavicol (46%/21%) (**Lawrence et coll., 1992**).

On peut citer également l'identification d'autres chémotypes, caractérisés par:

- Une forte proportion de géraniol (84-88%) (**Denys et Simon, 1992**).
- Une teneur élevée en cinnamate d'éthyle (67%) (**Ali et Shamsuzzaman, 1967**).
- Un taux élevé en citral (**Hegnauer R., 1966**)

De nombreuses investigations ont été menées sur des échantillons de l'espèce *O. gratissimum* d'origines diverses sans qu'ait été mis en évidence un nouveau chémotype:

- **Menut et Valet, en 1985**, ont montré que l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de l'espèce cultivée au Cameroun, est particulièrement riche en thymol (65.4%) accompagné de p-cymène (9.9%), du  $\beta$ -pinène (8.9%), du camphène (4.2%) et de l'eugénol (0.6%).
- **Bissangou, en 1993**, analyse deux échantillons d'huile essentielle du Congo et trouve 34.3 et 47.7% de thymol, 27.2 et 17.2% de p-cymène et du myrcène (4.2 et 1.4%).

- **Pino et coll., en 1996** analysent les huiles essentielles extraites des feuilles et des fleurs récoltées à Cuba; ils montrent qu'elles sont comparables, puisque les constituants majoritaires sont les mêmes: thymol (19.4 et 27.3%), p-cymène (14.0 et 12.8%) et  $\beta$ -caryophyllène (7.2 et 11.5%).

- **Vahirua et coll., en 1997**, analysent 11 échantillons d'*O. gratissimum* récoltés à Teva i Uta, 8 étant obtenus à partir des feuilles et les 3 autres à partir des sommités fleuries. Les huiles essentielles montrent une grande similitude en regard des constituants majoritaires: dans les feuilles, on a l'eugénol (71.1%-82%), accompagné du 1,8-cinéole (7.5%-15.6%) et dans les sommités fleuries on a 74.5%-77.2% d'eugénol avec 5.5%-15.6% de 1,8-cinéole.

Plusieurs études sont parues en 1998:

- **Pino et coll.**, ont réalisé une étude comparative sur les méthodes d'extraction (hydrodistillation, extraction au solvant et extraction au CO<sub>2</sub> supercritique) d'*Ocimum gratissimum* et ils ont étudié l'influence du mode d'extraction sur la teneur en thymol.

- **Sanda et coll. (1998a)** ont fait des investigations sur le genre *Ocimum* du Togo, ils ont confirmé que le thymol, le  $\gamma$ -terpinène et le p-cymène étaient les composés majoritaires de l'*Ocimum gratissimum*.

- **Amvam Zollo et coll.**, analysent l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles récoltées au Cameroun et trouvent qu'elle contient 46.2% de thymol accompagné du  $\gamma$ -terpinène (20%).

- **Yusuf et coll.** ont montré que les huiles essentielles obtenues à partir de plantes originaires de Bengladesh et d'Inde contiennent respectivement 58.2% de thymol et 66.5% d'eugénol.

- **En 1999, Martins et coll.**, ont étudié les huiles essentielles de S. Tomé et ils ont montré qu'elles contiennent du thymol (48.1%) et du p-cymène (12.5%).

- **En 2000, Kéita et coll.** ont trouvé le thymol (46%), le p-cymène (12%) et le  $\gamma$ -terpinène (17%) dans l'huile essentielle des feuilles récoltées en République de Guinée.

- **Kishore Dubey et coll., en 2000**, montrent que l'huile essentielle d'*O. gratissimum* récoltée en Inde, riche en cinnamate d'éthyle, présente une activité antifongique intéressante.

- **En 2000, Vieira et coll.** ont trouvé l'eugénol (40-66%), et le thymol (31%), dans l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de l'espèce récoltée au Brésil.

- En 2001, Pandey et coll., ont analysé l'huile essentielle de la partie aérienne de l'*O. gratissimum* récoltée à Madhya Pradesh; ils montrent qu'elle contient de l'eugénole (84.8%), du linalol (1.9%), du limonène (1.7%) et du méthyleugénole (1.5%).

- Sanda K. et coll., en 2001, trouvent que la composition de l'huile essentielle d'*O. gratissimum* récoltée au Togo dépend de la période de récolte; elle contient majoritairement du p-cymène (23%) après sa plantation, mais, cinq mois après, le thymol devient le composé majoritaire (27-30%).

- En 2001, Yayi E. et coll., ont identifié le thymol, le p-cymène et le  $\gamma$ -terpinène comme composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum gratissimum* récoltée au Bénin.

- En 2004, Silva et coll. ont étudié un chémotype à fort taux d'eugénole (54.0%) et de 1,8-cinéole (21.6%).

- La même année, Yayi. et coll. confirment l'existence d'un chémotype à thymol dans l'huile essentielle extraite des feuilles d'*O. gratissimum* récoltées au Bénin dans une étude complète de variabilité chimique des échantillons en fonction de la croissance de la plante.

- En 2005, Owusu-Ansah et coll. ont montré que l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de l'espèce *Ocimum gratissimum* récoltées au Ghana est riche en thymol.

- La même année, Jirovetz et coll. ont également décrit un chémotype à thymol pour l'espèce Camerounaise et ils ont testé son activité insecticide.

En résumé on peut considérer que le chémotype à thymol est généralement présent sur le continent africain (Yayi, 2004) tandis que le chémotype à eugénole est répandu sur le continent asiatique (Yusuf, 1998).

Enfin les huiles essentielles obtenues à partir de l'espèce *O. viride* (qui est considéré comme un synonyme d'*O. gratissimum*) sont également caractérisées par un taux élevé en thymol (Gupta, 1996; Gulati, 1979; Ekundayo, 1986; Talalaj, 1964; Sobti, 1978) avec un taux compris entre 33% (Talalaj, 1964) et 75% (Sobti, 1978).

#### ➤ Investigation biologique

Différentes investigations biologiques ont été menées sur l'huile essentielle ou les extraits d'*Ocimum gratissimum*.

Amvam Zollo et coll., en 1998 ont montré que l'huile essentielle d'*O. gratissimum* riche en thymol présentait une activité antifongique vis à vis du *Microsporum gypseum*,

*Aureobasidium pullulans*, de *Aspergillus flavus*, du *Trichophyton rubrum*, de *Candida albicans* et de *Cryptococcus neoformans*, ceci a été démontré par la méthode de «micro-atmosphère».

**Nakamura et coll., en 1999**, montrent que l'huile essentielle d'*O. gratissimum* riche en eugénol inhibe le *Staphylococcus aureus* à une concentration de 0.75µg/mL, tandis que la concentration minimale inhibitrice observée pour *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* et *Proteus mirabilis* varie de 3 à 12µg/mL.

**Kishore Dubey N. et coll., en 2000**, montrent que l'huile essentielle d'*O. gratissimum* récolté en Inde et riche en cinnamate d'éthyle présente une activité antifongique intéressante.

**En 2001, Chaumont J. P. et coll.** ont étudié les activités anti-microbiennes de l'huile essentielle d'*O. gratissimum* à thymol; ils ont montré qu'elle inhibe le développement de plusieurs champignons pathogènes.

**En 2002, Cimanga K. et coll.** ont testé l'activité antimicrobienne de l'essence d'*Ocimum gratissimum* de la République Démocratique de Congo, riche en thymol, ils ont montré que cette huile essentielle avait une faible activité vis-à-vis des bactéries étudiées.

**En 2003 Sahouo G. et coll.** ont étudié l'activité anti-inflammatoire potentielle de l'huile essentielle d' *O. gratissimum* en testant son action inhibitrice sur deux enzymes: la cyclooxygénase (Prostaglandine H Synthèse) et la lipoxygénase L-1 de soja. Ils ont trouvé des pourcentages d'inhibition (IC50) de 125µg/mL et 144µg/mL respectivement.

**En 2004, Oussou K. R. et coll.,** ont montré que l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* présentait une activité bactéricide et bactériostatique.

La même année, **Nakamura C. et coll.,** ont montré que l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* présentait une activité antifongique intéressante sur 4 espèces de *Candida*.

**Tchoumboungang et coll., en 2005** ont mis en évidence une faible activité antimalariale pour un échantillon d'huile essentielle d'*O gratissimum* à thymol (11.2%) et  $\gamma$ -terpinène (21.9%).

Une activité insecticide a également été mise en évidence la même année par **Jirovetz et coll.,** pour une huile essentielle d'*O gratissimum* d'origine camerounaise et dominée par le thymol (47.7%) et le  $\gamma$ -terpinène (14.3%)

Enfin **Agnaniet et coll., en 2005a**, ont mis en évidence l'existence de deux chémotypes pour l'*Ocimum gratissimum* au Gabon : le premier est riche en eugénol (75.4%), et germacrène D (6.2%); le deuxième est caractérisé par une forte teneur en p-cymène (33.3%) et en thymol (31.5%). La variété chimique la plus active pour ses propriétés

antiradicalaires étant la variété riche en eugenol (7.5mg/L) contre 317mg/L pour l'huile essentielle riche en thymol.

### 5-3-3- Résultats et discussion

L'hydrodistillation des feuilles et fleurs récoltées à Gbégamey (Cotonou) a donné des huiles essentielles avec des rendements de 0.8% et 0.2% (m/m) respectivement (tableau 19).

Les résultats de nos investigations sur la composition chimique de ces échantillons sont consignés dans le tableau 20.

**Tableau 19** : Extraction des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* L.

Echantillons	Date et lieu de la récolte	Méthode d'extraction	Rendement (%)
1 feuilles	18/08/02 à Cotonou	hydrodistillation	0.8
2 Sommités fleuries	20/08/02 à Cotonou	hydrodistillation	0.2



**Planche 10** : *Ocimum gratissimum* L.

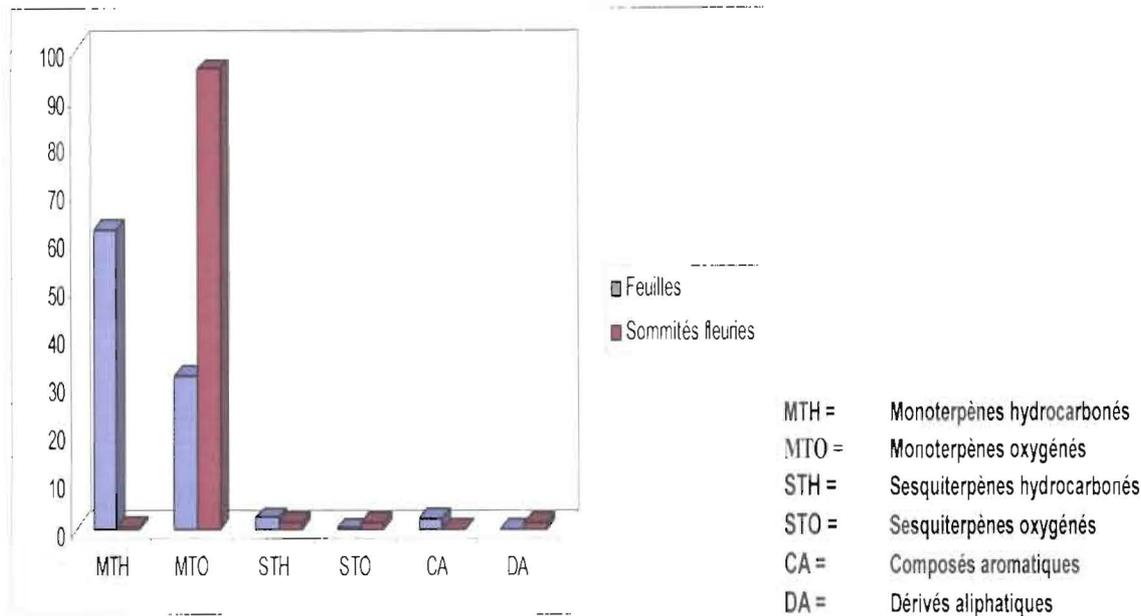
**Tableau 20** : Composition chimique des échantillons d'huiles essentielles d' *Ocimum gratissimum* L.

Nom des composés	*IR	1 (%)	2 (%)
$\alpha$ -thujène	922	8.2	-
$\alpha$ -pinène	934	1.2	-
camphène	948	0.3	-
sabinène	969		-
$\beta$ -pinène	974	0.7	-
<b>myrcène</b>	<b>985</b>	<b>6.4</b>	0.5
$\alpha$ -phellandrène	997	0.5	-
$\alpha$ -terpinène	1011	4.2	-
<b>p-cymène</b>	<b>1018</b>	<b>17.6</b>	-
limonène	1024	2.5	-
1,8-cinéole	1025	2.1	2.9
(E)- $\beta$ -ocimène	1041	0.3	-
<b><math>\gamma</math>-terpinène</b>	<b>1054</b>	<b>20.0</b>	-
<i>trans</i> -oxyde de linalol	1067	-	3.2
<i>cis</i> -oxyde de linalol	1071	-	2.4
p-cyménène	1077	2.2	-
terpinolène	1085	0.1	-
<b>linalol</b>	<b>1091</b>	0.2	<b>85.7</b>
bornéol	1160	0.2	-
butanoate de méthyle	1172	-	1.2
terpinèn-4-ol	1180	1.2	-
p-cymèn-8-ol	1185	0.2	-
$\alpha$ -terpinéol	1188	0.1	1.4
thymol méthylether	1235	0.3	-
<b>thymol</b>	<b>1281</b>	<b>26.9</b>	-
carvacrol	1288	0.7	-
$\alpha$ -copaène	1370	0.1	-
$\beta$ -caryophyllène	1417	1.2	1.2
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotène	1429	0.1	-
$\alpha$ -humulène	1449	0.2	-
germacrène D	1478	0.1	-
$\beta$ -selinène	1485	0.4	-
$\alpha$ -selinène	1592	0.2	-
$\delta$ -cadinène	1515	0.1	-
oxyde de caryophyllène	1611	0.2	1.2
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>62.3</b>	<b>0.5</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>31.9</b>	<b>95.6</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>2.4</b>	<b>1.2</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>0.2</b>	<b>1.2</b>
<b>Composés aromatiques</b>		<b>2.2</b>	<b>-</b>
<b>Dérivés aliphatiques</b>		<b>-</b>	<b>1.2</b>
<b>Total</b>		<b>99.0</b>	<b>99.7</b>

1 = Feuilles récoltées à Cotonou le 18/08/02.

2 = Sommités fleuries récoltées à Cotonou le 20/08/02.

\*IR= sur une colonne DB1



**Figure 18 :** Répartition des constituants dans les huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* L. (feuilles et sommités fleuries)

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles récoltées sur plusieurs pieds localisés dans un même champ de culture contient majoritairement 26.9% de thymol accompagné de 20% de  $\gamma$ -terpinène et de 17.6% de p-cymène. Elle est de type «thymol» (Vahirua-Lechat et coll., 1997; Martins et coll., 1999).

L'essence obtenue à partir des sommités fleuries récoltées sur un autre lot de plantes donne des résultats complètement différents : cet échantillon peut être classé dans le chémotype à linalol (85.7%).

Enfin, sachant que les huiles essentielles à thymol présentent généralement une activité antimicrobienne et antiradicalaire, la composition chimique de l'échantillon 1, riche en composés phénoliques, laisse prévoir une activité antiradicalaire que nous avons testée; les résultats sont présentés dans la troisième partie.

Les résultats de notre analyse chimique de l'échantillon de type «thymol» (échantillon 1) ont été publiés (Tchoumboungang, 2006) conjointement à d'autres variétés ou espèces récoltées dans différentes zones géographiques africaines; ils illustrent la variabilité chimique observée au sein du genre *Ocimum*.

## 6 – FAMILLE DES MYRTACEAE

### 6- 1 - *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore.

Synonyme :	<i>Pimenta acris</i> Kostel <i>Syzygium racemosum</i> DC <i>Pimenta racemosa</i> (Mill.) J. W. Moore.
Noms usuels :	Bay rum tree, «Bois d'Inde» (en Guadeloupe).

#### 6- 1- 1 - Botanique et utilisation

C'est un arbre pouvant atteindre 15m de hauteur, avec une écorce lisse, blanchâtre et un bois dur et lourd. Les feuilles sont elliptiques de 4 à 12 cm de longueur, 2,5 à 8 cm de largeur, à nervures saillantes dessus et dessous. Son tube floral est cupuliforme; son calice 5-lobé; ses pétales blancs, longs de 3mm (Adjanooun et coll., 1985).

Il est cultivé au Vénézuéla, au Puerto Rico, dans les Caraïbes, surtout en République Dominicaine et en Jamaïque pour la production d'huile essentielle à partir des feuilles; l'huile est communément appelée «bay oil» ou «Myrcia oil».

Cette espèce ne doit pas être confondue avec *Pimenta dioica* (L) Merr., l'*Allspice*, *Pimenta*, ou «Quatre épices» à Maurice, où elle est occasionnellement cultivée pour aromatiser les mets, dont les curry etc. (Leung et Foster, 1996).

Les usages culinaires sont les mêmes que ceux du «laurier sauce» (*Laurus nobilis*) mais ils sont beaucoup moins répandus.

Les feuilles de *Pimenta racemosa* sont exploitées dans l'industrie pour l'obtention de l'huile essentielle de «bay». Au Bénin, elles sont utilisées dans les préparations culinaires où l'espèce est connue sous le nom de «laurier sauce».

Cette espèce est également utilisée pour diverses propriétés thérapeutiques.

Une décoction de morceaux d'écorce, prise en tisane, est utilisée contre l'hypertension.

L'huile essentielle extraite des feuilles présente des propriétés antiseptiques et astringentes; elle est modérément toxique par voie orale à cause de sa teneur élevée en phénol, mais en principe elle ne donne pas lieu à des réactions allergiques chez l'homme. (Opdyke, 1973).

Elle est utilisée dans la fabrication de crèmes, lotions, détergents, ou dans les shampoings. Elle est également utilisée en parfumerie (Opdyke, 1973).

*Pimenta racemosa* var. *grisea*, mieux connu sous le nom de «ozua» (Germosen, 1995), est utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires et analgésiques (Duke, 1986; Robineau, 1991).

Les feuilles sont utilisées per os en association avec les feuilles d'*Ocimum basilicum* et de *Chenopodium ambrosioides* ou avec celles de *Pluchea symphitifolia* comme fébrifuge (Ayedoun, 1995).

## 6- 1- 2 - Travaux antérieurs

### ➤ Etude chimique

On distingue cinq variétés dans l'espèce *Pimenta racemosa*: var. *grisea* (Kiaerskov), var. *hispaniolensis* (Urban) Landrum, var. *ozua* (Urban et Ekman) Landrum, var. *terebinthina* (Burret) Landrum et var. *racemosa* (Landrum, 1986).

McHale et coll. (1977) ont analysé les huiles essentielles de trois variétés de bay: *Pimenta racemosa*, *P. acris* var. *citriifolia* et une variété «anisée»; l'eugénol (56.2%) et le chavicol (21.6%) sont les constituants majoritaires de la 1<sup>ère</sup> espèce tandis que le méthyleugénol (43.1%) et le méthylchavicol (31.1%) dominent pour la variété anisée.

L'huile essentielle de *P. acris* var. *citriifolia* se caractérise par un taux de citral supérieur à 80%.

En 1991, Tucker et coll. ont étudié la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de trois variétés de *P. racemosa* de la République Dominicaine: *P. racemosa* var. *grisea*, est dominée par le géraniol, le méthyl eugénol ou le trans-méthyl isoeugénol; *P. racemosa* var. *hispaniolensis* est dominée par le 1,8-cinéole, le méthyl chavicol, le méthyl eugénol, le  $\gamma$ -terpinène, le terpinèn-4-ol ou le thymol; *P. racemosa* var. *ozua* est caractérisée par des taux élevés en 1,8-cinéole, limonène ou  $\alpha$ -terpinéol. L'huile essentielle de «Bay» commune (*Pimenta racemosa* var. *racemosa*) est dominée par des constituants aromatiques : chavicol, eugénol et méthyl eugénol.

En 1995, Abaul et coll. ont retrouvé en Guadeloupe les trois variétés chimiques décrites par McHale en 1977 c'est à dire la variété «girofle» dominée par l'eugénol, la variété «anisée» dominée par l'estragole et le méthyl eugénol et enfin la variété «lemon» caractérisée par un taux élevé de citral (70%).

**Bello et coll. (1995, 1998)** ont effectué l'analyse chimique de l'huile essentielle extraite de feuilles de *Pimenta racemosa* récoltées à Cuba; ils ont montré que les composés majoritaires étaient le terpinèn-4-ol (20.7%) et le 1,8-cinéole (20.4%), accompagnés par des constituants aromatiques tels le méthylchavicol (10.8%), le chavicol (10.1%) et l'eugénol (10.7%).

**En 1996, Ayedoun et coll.** ont montré que l'huile essentielle du Bénin est comparable à une huile essentielle commerciale classique; elle est dominée par l'eugénol (52.7%), le myrcène (26.6%) et le chavicol (6.3%).

**En 2001, Bello et coll.** ont repris l'étude des huiles essentielles de différentes Myrtacées de Cuba et notamment de *Pimenta racemosa* var. *racemosa*: ils ont trouvé une composition chimique comparable à celle précédemment décrite; elle est dominée par le terpinèn-4-ol (20.7%) le 1,8-cinéole (20.4%) mais avec, également, des taux importants d'eugénol (10.7%) et d' $\alpha$ -terpinéol. (10.0%).

**Enfin, en 2002, Garcia et coll.** ont analysé les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles de deux variétés de *Pimenta racemosa* rencontrées en République Dominicaine: *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* et *Pimenta racemosa* var. *grisea*. Ils ont montré que la variété *terebinthina* était caractérisée par 27% d'acétate de terpinyle, 20% d' $\alpha$ -terpinéol et 12.6% de 4-méthoxy eugénol tandis que la variété *grisea* contenait 75.2% de 4-méthoxy isoeugénol, et de 4-méthoxy eugénol (4.5%).

Selon la Norme Internationale ISO/FDIS 3045 (Normes AFNOR, 2004), l'huile essentielle de bay (*Pimenta racemosa*) contient de 42% à 56% d'eugénol, de 8% à 13% de chavicol et 20% à 30% de myrcène.

#### ➤ **Investigation biologique**

Les applications de l'huile essentielle de bay sont nombreuses.

Elle est utilisée dans la fabrication de crèmes, lotions, détergents, ou dans les shampoings. Elle est également utilisée en parfumerie. Elle présente des propriétés antiseptiques et astringentes, mais on lui attribue également une toxicité modérée par voie orale, en raison de sa teneur élevée en phénol sans toutefois donner lieu à des réactions allergiques (Opdyke, 1973).

L'huile essentielle entre dans la formule brevetée d'une composition cosmétique capillaire (Orenga, 2003).

Les propriétés biologiques les plus revendiquées sont les effets antimicrobiens qui s'expliquent par la teneur élevée en phénols. Les études sont nombreuses et nous ne citerons que les plus récentes:

**Aurore et coll., en 1998**, étudient les activités antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles de trois variétés chimiques de *Pimenta racemosa* sur 5 bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Mycobacterium smegmatis*) et sur 5 champignons (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Abisidia corymbifera*, *Penicillium verrucosum* et *Cladosporium cladosporioides*) Les trois variétés «chimiques» énumérées sont les chémotypes à citral/à méthyl chavicol-méthyl eugénol/ et à chavicol-eugénol.

Les souches fongiques ont été les plus sensibles, mais seule une activité bactériostatique a pu être mise en évidence.

**En 2000, Delespaul et coll.** ont montré que l'huile essentielle de la variété chimique de *Pimenta racemosa* riche en eugénol (60%) présentait une forte activité antifongique aussi bien par contact que par la méthode en «micro-atmosphère» utilisant la phase «vapeur» de l'huile essentielle.

**En 2002, Burt et coll.** ont montré que l'huile essentielle de *Pimenta racemosa* présentait une forte activité antibactérienne sur *l'Escherichia coli* 0157:H7.

**En 2004, Saenz et coll.** ont montré que l'huile essentielle de *Pimenta racemosa* var. *grisea* était active sur les bactéries Gram (+) et Gram (-) ce qui indique des potentialités pour l'utilisation de cette variété comme agent microbiostatique, antiseptique et désinfectant.

On peut également noter quelques études biologiques réalisées dans des domaines différents :

✓ des travaux anciens font mention de potentialités anticancéreuses (**Hartwell, 1970**).

✓ des activités anti-inflammatoires ont été mises en évidence pour l'acide abiétique, un diterpène isolé de *Pimenta racemosa* var. *grisea* (**Fernandez 2001a**) ainsi que pour l'extrait a solvant de *Pimenta racemosa* var *ozua* (**Fernandez 2001b**).

✓ une activité nématocide a été notée pour l'huile essentielle de *Pimenta racemosa*, au cours de l'étude de plusieurs huiles essentielles sur *Bursaphelenchus xylophilus*, un parasite du bois de pin (**Park et coll., 2005**)

### 6-1-3 - Résultats et discussion

Les huiles essentielles étudiées ont été obtenues par hydrodistillation pendant 2 heures des feuilles de *Pimenta racemosa* récoltées dans deux régions du Bénin (Godomey et Kouhounou) en 2003, 2004 et 2005 avec des rendements compris entre 0.9% (m/m) et 2.4% (m/m) (tableau 21). Ces rendements sont similaires à ceux de la littérature qui indique des valeurs comprises entre 0.6% et 5.0% (Bello et coll., 2001; Ayedoun et coll. 1996; Abaul et coll., 1995).

On n'observe pas d'influence significative de la période de récolte sur le rendement en huile essentielle. Les résultats obtenus par analyse chromatographique des différents échantillons sont rassemblés dans le tableau 22.

**Tableau 21 : Extraction des huiles essentielles de feuilles de *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore.**

Echantillons	Date et lieu de la récolte	Méthode d'extraction	Rendement (%)
1	19/04/03 à Godomey	hydrodistillation	1.60
2	28/05/03 à Godomey	hydrodistillation	1.42
3	04/01/05 à Godomey	hydrodistillation	0.90
4	28/02/04 à Kouhounou	hydrodistillation	0.99
5	30/12/03 à Kouhounou	hydrodistillation	1.78
6	15/04/03 à Kouhounou	hydrodistillation	2.40



**Planche 11 : *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore.**

**Tableau 22** : Composition chimique des huiles essentielles d'échantillons de *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore, récoltées au Bénin

Nom des composés	*IR	1(%)	2(%)	3(%)	4(%)	5(%)	6(%)
$\alpha$ -pinène	940	0.4	0.3	0.5	0.6	0.6	0.3
octèn-3-ol	974	2.4	2.1	1.9	1.5	1.4	1.3
$\beta$ -pinène	982	0.1	0.1	-	-	-	-
<b>myrcène</b>	<b>993</b>	<b>25.1</b>	<b>25.2</b>	<b>30.9</b>	<b>29.4</b>	<b>29.3</b>	<b>21.9</b>
$\alpha$ -terpinène	1018	0.1	0.3	0.6	0.6	0.6	0.2
p-cymène	1022	0.7	0.6	0.4	0.8	0.9	0.8
<b>limonène</b>	<b>1034</b>	<b>3.0*</b>	<b>3.1*</b>	<b>3.4*</b>	<b>4.0*</b>	<b>3.8*</b>	<b>3.0*</b>
<b>1,8-cinéole</b>		<b>2.7*</b>	<b>2.5*</b>	<b>3.2*</b>	<b>2.4*</b>	<b>2.5*</b>	<b>2.1*</b>
(E)- $\beta$ -ocimène	1043	0.2	0.1	0.3	-	0.2	-
$\gamma$ -terpinène	1058	0.1	0.1	-		0.2	0.1
terpinolène	1089	0.2	0.2	-	0.3	-	0.1
linalol	1092	0.6	0.1	0.3	1.9	2	2.1
terpinèn-4-ol	1178	0.8	0.7	0.7	0.9	0.8	0.8
$\alpha$ -terpinéol	1188	0.7	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9
<b>chavicol</b>	<b>1250</b>	<b>7.5</b>	<b>7.2</b>	<b>8.0</b>	<b>7.1</b>	<b>7.7</b>	<b>9.3</b>
<b>eugénol</b>	<b>1368</b>	<b>51.1</b>	<b>50.8</b>	<b>46.6</b>	<b>45.5</b>	<b>45.2</b>	<b>52.7</b>
$\beta$ -caryophyllène	1440	0.1	-	-	0.3	0.3	0.2
$\alpha$ -humulène	1489	0.1	-	-	-	0.1	0.1
(E, E)- $\alpha$ -farnesène	1502	0.2	0.1	0.3	-	0.2	0.2
$\delta$ -cadinène	1533	0.1	0.1	-	-	0.1	0.2
torréyol	1638	0.1	0.1	-	0.3	-	0.2
T-cadinol	1665	0.1	-	-	-	-	0.2
Diterpène (M+ = 272)	1941	0.6	0.2	-	-	-	0.7
Diterpène (M+ = 272)	1981	0.2	0.1	-	-	-	0.3
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>29.9</b>	<b>30.0</b>	<b>36.1</b>	<b>35.7</b>	<b>35.6</b>	<b>26.4</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>4.8</b>	<b>4.1</b>	<b>5.1</b>	<b>6.0</b>	<b>6.2</b>	<b>5.9</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>0.5</b>	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.7</b>	<b>0.7</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	<b>-</b>	<b>0.3</b>	<b>-</b>	<b>0.4</b>
<b>Dérivés aliphatiques</b>		<b>2.4</b>	<b>2.1</b>	<b>1.9</b>	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>	<b>1.3</b>
<b>Composés aromatiques</b>		<b>58.6</b>	<b>58.0</b>	<b>54.6</b>	<b>52.6</b>	<b>52.9</b>	<b>62.0</b>
<b>Total</b>		<b>96.4</b>	<b>94.5</b>	<b>98.0</b>	<b>96.4</b>	<b>96.8</b>	<b>97.9</b>

1 = Récoltées à Godomey le 19/04/03; 2 = Récoltées à Godomey le 28/05/03.

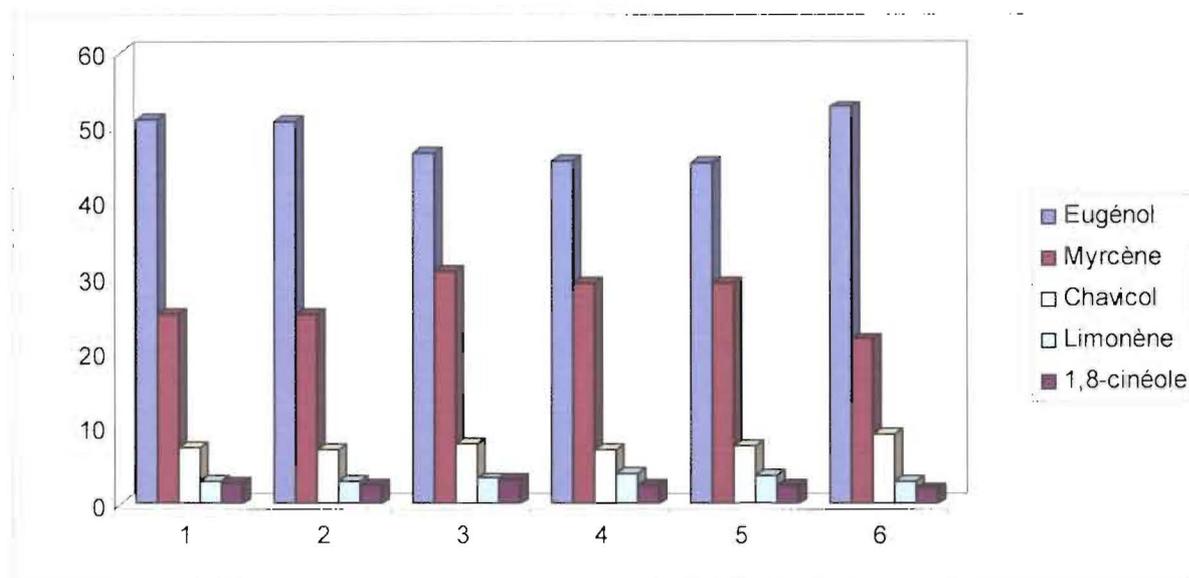
3 = Récoltées à Godomey le 04/01/05; 4 = Récoltées à Kouhounou le 28/02/04.

5 = Récoltées à Kouhounou le 30/12/03; 6 = Récoltées à Kouhounou le 15/04/03.

\*% relatifs calculés sur CARBOWAX 20M.

\*IR sur colonne DB1.

Les spectres des composés non identifiés (NI) en annexe



**Figure 19** : Répartition des composés majoritaires dans les différents échantillons d'huile essentielle de *Pimenta racemosa* (feuilles)

On trouve donc une composition chimique «classique» dominée par 2 constituants aromatiques phénoliques issus de la voie de l'acide shikimique (eugénol et chavicol) accompagnés d'un monoterpène acyclique hydrocarboné, le myrcène.

Les échantillons analysés répondent tout à fait aux normes recommandées par l'AFNOR.

Pour la variété chimique de type «girofle» à «eugénol-chavicol» (Abaul et coll., 1995), on peut prévoir une activité antiradicalaire intéressante; nous présentons ces résultats dans la troisième partie du mémoire.

## 7 –FAMILLE DES POACEAE

### 7- 1- *Cymbopogon giganteus* Chiov.

Synonyme :	<i>Andropogon giganteus</i>
Nom usuel :	Citronnelle de brousse
Noms vernaculaires :	Waama : Yakimooribou
Yom :	meunououse
Bambara :	Trékala, Kékala, Tékala
Fon :	Gbézin.

#### 7- 1- 1 - Botanique et utilisation

*Cymbopogon giganteus* est une grande herbe vivace et odoriférante dont les nombreuses tiges émergent d'une racine en forme de rhizome. La plante atteint 2 à 3 mètres de haut, avec des tiges flexibles comportant des entre-nœuds importants. Elle possède des feuilles planes, dont les bords sont rudes au toucher, ont 30 à 40 cm de longueur et 2 à 2.5 cm de largeur, ses inflorescences sont en forme de barbe terminale de 30 à 40 cm et retombent au fur et à mesure de leur maturité (Letouzey, 1972; Mabberley, 1990; Roberty, 1960).

D'odeur agréable, *Cymbopogon giganteus* est utilisée dans la médecine traditionnelle africaine, le plus souvent seule, quelques fois en association avec d'autres plantes. Les indications thérapeutiques concernent de nombreuses affections.

Au Togo, l'infusé des tiges feuillées est conseillé per os pour les maladies mentales et les affections broncho-pulmonaires (Adjanooun et coll., 1986).

Au Cameroun, les racines séchées et pulvérisées sont employées en inhalation nasale dans le traitement des maux de tête et du paludisme. Les tradipraticiens camerounais attribuent à la plante des propriétés antipyrétiques (Bello, 1984).

Les peulhs 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).

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 coll., 1990).

Au Sénégal, *Cymbopogon giganteus* est employé pour ses propriétés fébrifuges, antiseptiques pulmonaires, antiictériques et antimalariales. En Casamance les feuilles sèches servent 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 et tonifiant (Kerharo et Adam, 1974)

Au Mali, l'infusion de la plante entière ou des fleurs est prescrite pour le traitement de la bilharziose, de la fièvre jaune et de la jaunisse. Les décoctions des feuilles et des inflorescences constituent un bon remède pur le traitement des dermatoses (Adjanooun et coll., 1979).

Au Mali, les décoctions des feuilles sont utilisées pour traiter le rhume, la conjonctivite et la migraine (Adjanooun et coll., 1979).

Une infusion des inflorescences de *Cymbopogon giganteus* et des feuilles de *Vepris heterophylla* sont également utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle (Keita, 1986)

Au Niger, la partie aérienne est utilisée en décoction contre les douleurs rhumatismales et les toux émétisantes chez l'enfant. Les décoctions des inflorescences sont également utilisées sous forme de boissons et de bains dans le traitement des hépatites (Adjanooun et coll., 1985)

## 7- 1- 2- Travaux antérieurs

### ➤ Etude chimique

L'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* a été beaucoup moins étudiée que celles des essences commerciales des autres espèces du même genre telles que *C. citratus*, *C. nardus* ou *C. winterianus*.

Néanmoins, plusieurs études ont déjà été menées sur l'espèce *Cymbopogon giganteus*. Seules les plus récentes, concernant surtout les huiles essentielles des feuilles, seront rappelées ici.

En 1991, Popielas et coll., ont préparé l'huile essentielle à partir des inflorescences récoltées à Bamako (Mali) avec un rendement de 1%. Cette essence est majoritairement constituée de *trans* et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols (20.4-17.2%), du 1,2-époxyde de limonène (13.7%, stéréochimie non définie), du p-mentha-2,8-dièn-1-ol (10.7%, stéréochimie non définie), du *trans*-isopipériténol (10.1%) et de la carvone (7.1%).

La même année, Ouamba a vérifié la similitude des huiles essentielles des feuilles récoltées en Côte d'Ivoire et au Cameroun. Les composés majoritaires de l'huile essentielle sont le *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (de 25 à 32% respectivement), son isomère *cis* (de 17

à 19%), le *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (14 à 19%), son isomère *cis* (de 6 à 9%), le *trans*-isopipériténol (de 6 à 7%), son isomère *cis* (de 7 à 8%) et la carvone (de 4 à 5%).

En 1997, Ayedoun et coll. ont isolé les essences de feuilles récoltées dans 3 régions du Bénin avec un rendement de 0.8%. Ils ont trouvé des compositions chimiques similaires qui se caractérisent toutes par la présence du limonène (18.4-23.6%), du *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (13.9-22.5%), du *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (16.2-18.5%), du *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (14.4-18.4%), puis du *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (7.6-8.6%); sont aussi présents en faible pourcentage, l' $\alpha$ -terpinéol (2.1-4.4%), la carvone (2.3-3.2%), le *trans*-isopipériténol (1.5-4.2%) et enfin le *trans*-carvéol (0.6-3.1%).

En 2000 Menut et coll., ont étudié les activités antioxydantes et la composition chimique de l'essence obtenue à partir des feuilles récoltées au Burkina Faso. Les mêmes types de constituants ont été retrouvés: l'essence contient majoritairement 17.3% de limonène, 17% de *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol, 16.5% de *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol, 13.8% de *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol et 9.3% de *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol; le *cis*-isopipériténol (4.5%) et la carvone (4,1%) sont aussi présents à des teneurs non négligeables.

Sidibe et coll., en 2001, étudient huit échantillons d'huile essentielle obtenue à partir de feuilles de *C. giganteus* récoltées sur deux sites (Sotuba et Sindo) du Mali; le même type de composition est retrouvé dans les échantillons: les *trans* et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols (24.0-35.2%) et (16.0-24.0%), et les *trans* et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ols, (13.3-16.2%) et (8.2-10.2%). On note aussi la présence du limonène dans des proportions variables (0.5-13.2%), de la p-méthylacétophénone (3.2-6.0%) et de la carvone (0.1-2.9%).

Ces travaux font suite aux travaux préliminaires, présentés par Chalchat et coll., 1998, qui décrivent les mêmes profils chromatographiques.

En 2003, Sahouo et coll. ont trouvé les mêmes composés majoritaires dans l'huile essentielle extraite de feuilles fraîches de *Cymbopogon giganteus* récoltées au Sud de la Côte d'Ivoire: les *trans* et *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ols, (26.2% et 11.9%), le limonène (14.2%) et les *trans* et *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols (13.3% et 11.3%).

En 2004, Kanko et coll. ont effectué l'analyse chimique de l'essence obtenue à partir des feuilles de cette espèce récoltées en Côte d'Ivoire et ont trouvé comme composés majoritaires le *trans*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol (20.7%), le *trans*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (19.6%), le *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (19.0%), le *cis*-p-mentha-2,8-dièn-1-ol, (9.2%) et le limonène (5.1%).

En 2006, Boti et coll. ont étudié l'huile essentielle de *C. giganteus* de Côte d'Ivoire par une combinaison de deux méthodes analytiques: GC/MS et RMN  $^{13}\text{C}$ ; parmi les 46

composés identifiés, on trouve les *trans* et *cis*-p-mentha-2,8-diène-1-ols, (18.4% et 8.7%), les *trans* et *cis*-p-mentha-1(7),8-diène-2-ols (15.7 et 16.0%) accompagnés du limonène (12.5%).

### ➤ Investigation biologique

Malgré une utilisation en médecine traditionnelle dans plusieurs régions d'Afrique, peu d'investigations biologiques ont été réalisées sur *C. giganteus* et son huile essentielle.

**Kimbi et Fagbenro, en 1996**, ont mis en évidence l'efficacité de l'extrait aqueux de *Cymbopogon giganteus* contre une souche de *Plasmodium yoelii nigeriensis* résistant à la chloroquine.

**En 2000, Menut et coll.** ont étudié l'activité antioxydante (test utilisant l'autooxydation accélérée du linoléate de méthyle) et l'activité antiradicalaire (test au DPPH) de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Cymbopogon giganteus* récoltées au Burkina Faso; l'activité antiradicalaire est quasiment nulle tandis qu'une faible activité antioxydante (facteur de 100 avec le BHT) a pu être observée.

**En 2003, Sahouo et coll.** ont réalisé l'étude *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *C. giganteus* de Côte d'Ivoire sur la lipoxigénase L-1 de soja et sur la prostaglandine H synthase (PGHS) qui fait partie de la classe des cyclooxygénases; ils ont mis en évidence une action intéressante sur la lipoxigénase L-1 (IC<sub>50</sub> = 130µg/mL) mais aucune action inhibitrice sur la cyclooxygénase.

Les seules études sur le *Cymbopogon giganteus* du Bénin relatives à l'analyse chimique de son huile essentielle remontant à 1997, nous avons donc choisi de reprendre l'examen de cette plante de manière approfondie et de la compléter par une investigation biologique dont les résultats seront présentés dans le troisième chapitre.

### 7- 1- 3- Résultats et discussion

L'hydrodistillation des feuilles sèches de *Cymbopogon giganteus* récoltées dans deux régions différentes (Setto et Savalou) en 2004 a donné des huiles essentielles avec des rendements compris entre 0.4 et 0.6% (m/m) (tableau 23). On retrouve des rendements similaires à ceux obtenus pour l'espèce ivoirienne (**Boti, 2004; Kanko, 2004**); mais ils sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus par **Ouamba en 1991** (1.5-1.8%).

Les résultats des analyses chimiques des trois échantillons sont consignés dans le tableau 24.

**Tableau 23** : Obtention d'huiles essentielles de feuilles de *Cymbopogon giganteus* Chiov.  
du Bénin

Echantillons	Date et lieu de la récolte	Méthode d'extraction	Rendement (%)
1	02/01/04 à Savalou	hydrodistillation	0.52
2	13/01/04 à Setto	hydrodistillation	0.42
3	10/08/04 à Setto	hydrodistillation	0.60



**Planche 12** : *Cymbopogon giganteus* Chiov.

**Tableau 24** : Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles de *Cymbopogon giganteus* Chiov.

Nom des composés	*IR	1(%)	2(%)	3(%)
myrcène	1002	-	0.1	0.1
p-cymène	1021	0.5	0.4	0.4
<b>limonène</b>	<b>1029</b>	<b>7.7</b>	<b>1.2</b>	<b>13.7</b>
p-cyménène	1081	0.3	0.3	0.1
nonanal	1092	0.3	0.3	0.1
1,3,8-p-menthatriène	1105	-	0.1	0.1
<b>trans-p-mentha-2,8-diène-1-ol</b>	<b>1118</b>	<b>14.3</b>	<b>14.0</b>	<b>16.4</b>
<b>cis-p-mentha-2,8-diène-1-ol</b>	<b>1132</b>	<b>10.1</b>	<b>10.3</b>	<b>9.5</b>
trans-époxy limonène	1138	0.1	0.1	0.1
tétrahydroacétophénone	1141	0.8	0.2	0.4
4-isopropénylcyclohex-2-énone	1155	1.4	1.1	1.2
p-méthylacétophénone	1170	0.3	0.4	0.3
<b>3,9-époxy mentha-1,8(10)-diène</b>	<b>1189</b>	<b>21.2</b>	<b>24.3</b>	<b>6.4</b>
<b>trans-p-mentha-1(7),8-diène-2-ol</b>		<b>1.1</b>	<b>1.3</b>	<b>0.3</b>
cis-dihydrocarvone	1193	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>6.4</b>
<b>trans-isopipériténol</b>	<b>1199</b>	<b>7.1</b>	<b>7.6</b>	<b>7.1</b>
trans-dihydrocarvone	1201	0.1	0.2	4.6
dihydropérillaldéhyde*	1202	0.1	0.2	-
p-menth-1-ène-9-al	1203	-	0.1	-
N.I. (M=150)	1205	1.6	0.8	1.0
cis-isopipériténol	1215	4.5	5.1	5.9
trans-carvéol	1217	2.5	3.0	0.1
p-mentha-1(7),8-diène-2-one	1226	-	0.1	0.1
<b>cis-p-mentha-1(7),8-diène-2-ol</b>	<b>1229</b>	<b>19.9</b>	<b>22.0</b>	<b>19.4</b>
cis-carvéol	1237	4.2	4.5	2.9
N.I. (M=152)	1242	-	0.1	0.1
carvone	1244	0.6	1.0	0.5
hexanoate d'isoamyle	1267	0.6	0.2	0.2
isopipériténone	1270	-	0.1	0.2
périllaldéhyde	1272	0.4	0.4	1.8
octanoate d'isoamyle	1468	0.2	0.2	0.4
<b>Composés aliphatiques</b>		<b>1.1</b>	<b>0.7</b>	<b>0.7</b>
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>8.5</b>	<b>2.1</b>	<b>14.4</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>85.1</b>	<b>93.5</b>	<b>80.6</b>
<b>Composés aromatiques et dérivés</b>		<b>1.1</b>	<b>0.6</b>	<b>0.7</b>
<b>Total</b>		<b>95.8</b>	<b>96.9</b>	<b>96.4</b>

1 = Récoltées à Savalou le 02/01/04; 2 = Récoltées à Setto le 13/01/04

3 = Récoltées à Setto 10/08/04

\*IR sur une colonne DB1

\*isomérisation non déterminée

La composition chimique de nos échantillons est comparable à ceux déjà décrits pour des échantillons d'autres provenances; ils sont caractérisés par une majorité de dérivés oxygénés à squelette p-menthane, principalement les p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols et les p-mentha-2,8-dièn-1-ols qui représentent les deux tiers de l'essence.

Afin de compléter l'identification des composants mineurs, l'huile essentielle a été fractionnée par chromatographie sur Florisil; l'opération a donné 6 fractions qui ont été analysées et étudiées pour apprécier leur activité anti-inflammatoire.

L'identité des dérivés  $\alpha$ -oxygénés du limonène a été vérifiée en oxydant celui-ci par l'hydroperoxyde de tertiobutyle (t-buOOH) en présence de chrome hexacarbonyle [Cr(CO)<sub>6</sub>], selon **Guillon et coll. (2000)**; la réaction fournit plusieurs produits, dont une majorité des deux cétones attendues, la carvone (**12**) et l'isopipéritone (**13**), présentes dans l'huile essentielle.

La réduction de ces deux cétones  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturées, par AlLiH<sub>4</sub> dans l'éther anhydre a conduit respectivement aux carvéols (**7**, **8**) et aux isopipériténols (**9**, **10**); ceci nous a permis de confirmer leur présence dans l'huile essentielle.

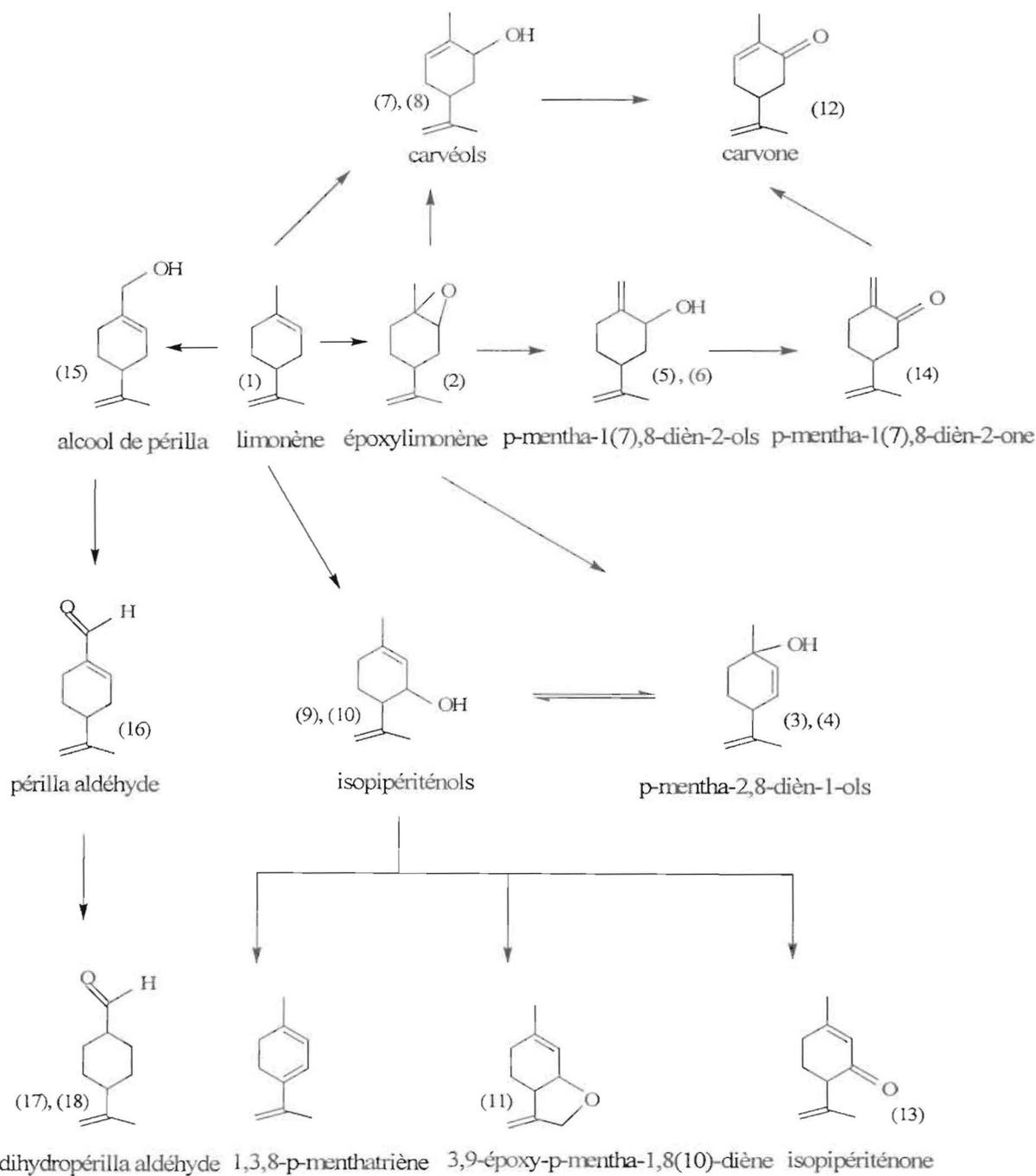
Par ailleurs, on a procédé à l'oxydation ménagée de la fraction riche en alcools, par le dioxyde de manganèse (MnO<sub>2</sub>) activé dans le dichlorométhane (**Ernest et coll., 1987**). La réaction n'est pas totale et on observe l'oxydation partielle des alcools secondaires: les isopipériténols en isopipériténone (**13**), les carvéols en carvone (**12**) et le p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol en p-mentha-1(7),8-dièn-2-one (**14**). Ce dernier produit instable, est en partie isomérisé en carvone, beaucoup plus stable. Ce constituant avait été proposé par **D'Souza et coll., en 2004** comme intermédiaire de biosynthèse de cymbodiacetal, identifié dans *Cymbopogon martinii* et qui proviendrait de la dimérisation de p-mentha-1(7),8-dièn-2-one (**14**). A notre connaissance, la présence de p-mentha-1(7),8-dièn-2-one (**14**) en quantité minoritaire dans l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* est notée pour la première fois. Les alcools tertiaires (**3**) et (**4**) ne sont pas oxydés, comme étant attendu.

Enfin, il est intéressant de noter une certaine stéréo-sélectivité de cette réaction d'oxydation dans les conditions opératoires utilisées, puis que l'on observe l'oxydation préférentielle des isomères *cis* dans le mélange.

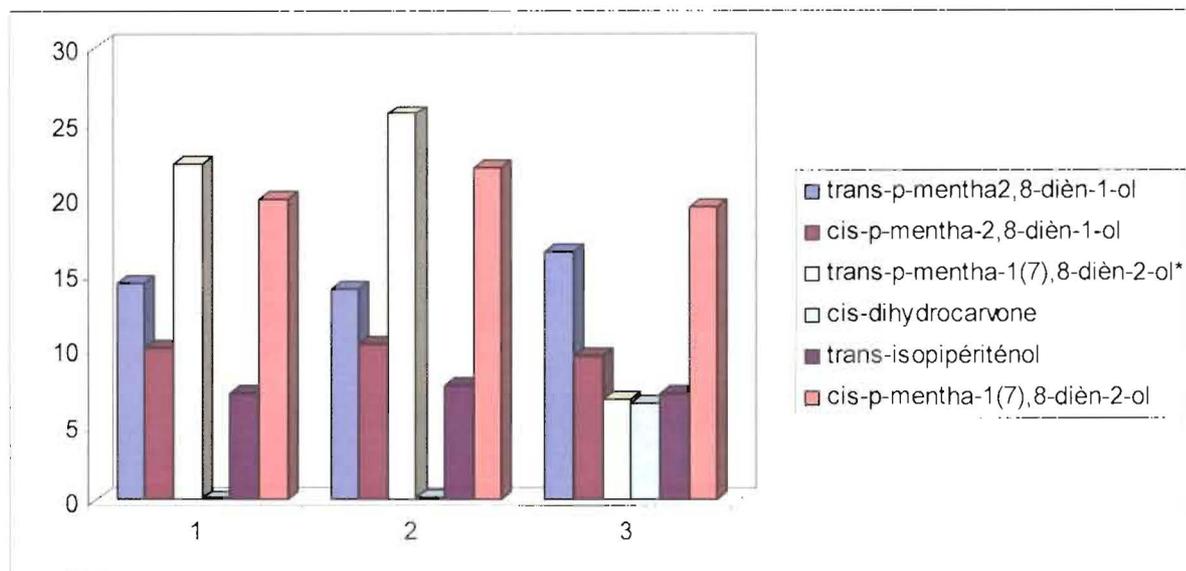
Le processus biosynthétique observé dans la plante peut être schématisé selon la **Figure 21**.

Les quatre p-menthadiénols (**3**), (**4**), (**5**) et (**6**), composants caractéristiques de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus*, dérivent vraisemblablement d'un époxy limonène (**2**) initialement formé. Les carvéols (**7**) et (**8**) pourraient dériver du même intermédiaire. Des

oxydations allyliques directes du limonène (1) peuvent expliquer la formation des isopipériténols (9, 10) des carvéols (7, 8) et de l'alcool de périlla (15). L'époxymenthadiène (11) est probablement formé à partir des isopipériténols; on peut noter que ceux-ci ne conduisent pas à la formation de menthafurane, comme cela intervient dans *Mentha piperita*



**Figure 20** : Processus biosynthétique proposé pour les constituants de *Cymbopogon giganteus*

**Comparaison entre les échantillons et la littérature**

**Figure 21:** Répartition des composés majoritaires dans les échantillons d'huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* Chiov. (feuilles)

Les échantillons 1 et 2, récoltés en janvier 2004 dans 2 localités différentes ont des compositions similaires. L'échantillon 3, récolté en août 2004, se distingue principalement par une faible teneur en *trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol*, compensés par le limonène et les deux dihydrocarvones.

Les teneurs des principaux constituants ont été rassemblés dans le tableau 25 avec les valeurs correspondantes relevées dans la littérature.

**Tableau 25 : Composés majoritaires des huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* Chiov. de différentes origines d'Afrique de l'Ouest**

Pays	Bénin			Burkina Faso	Cameroun 1991			Côte d'Ivoire			Mali	
	Alitonou		Ayedoun	Menut,	Ouamba		Sahouo	Kanko	Boti	Sidibé		
Composés majoritaires	(1)	(2)	(3)	1997	2000	1991	1991	2003	2004	2006	1991	2001
limonène	7.7	1.2	13.7	18.4-23.6	17.3	2.3		14.2	5.1	12.5	3.3	0.5-13.2
<i>trans-p</i> -mentha-2,8-diène-1-ol	14.3	14.0	16.4	7.6-8.6	9.3	9.0	14.2	26.2	20.7	18.4	13.7	8.2-10.2
<i>cis-p</i> -mentha-2,8-diène-1-ol	10.1	10.3	9.5	13.9-22.5	13.8	14.3	18.9	11.9	9.2	8.7	10.7	13.3-16.2
<i>trans-p</i> -mentha-1(7),8-diène-2-ol	22.3	25.6	6.7	16.2-18.5	17.0	32.4	24.9	13.3	19.6	15.7	20.4	24.0-35.2
<i>trans</i> -isopipériténol	7.1	7.6	7.1	1.5-4.2	4.5	5.7	6.5	4.2		3.1	10.1	
<i>cis</i> -isopipériténol	4.5	5.1	5.9		5.8	7.4	7.2	3.2		2.2	7.9	0.2-2.0
<i>cis-p</i> -mentha-1(7),8-diène-2-ol	19.9	22.0	19.4	14.4-18.4	16.5	16.8	18.8	11.3	19.0	16.0	17.2	16.0-24.0
Carvone	0.6	1.0	0.4	2.3-3.2	4.1	3.9	4.8	2.7	2.1	2.7	7.1	0.1-2.9

1 = échantillon du 02/01/04 Savalou; 2 = échantillon du 13/01/04; 3 = échantillon de 10/08/04

L'analyse de ce tableau montre que les essences de *Cymbopogon giganteus* sont caractérisées par une composition chimique homogène dans toute l'Afrique de l'Ouest (Ayedoun et coll., 1997; Menut et coll., 2000; Sidibé et coll., 2001, Sahouo et coll. 2003, Kanko et coll., 2004; Boti et coll., 2006), C'est particulièrement vrai au niveau des composés majoritaires, constitués par les quatre p-menthadiénols. Par contre, il existe d'autres composés qui peuvent devenir ponctuellement importants comme le limonène et les *trans* et *cis*-isopipériténols. La carvone est présente dans toutes les huiles essentielles mais à des pourcentages variables. On peut faire la même observation pour ses dérivés dihydro, illustrée par les résultats de notre échantillon 3.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2006 (Alitonou et coll., 2006) dans laquelle sont également présentées les propriétés antiradicalaires et anti-inflammatoires qui seront présentées dans la troisième partie de la thèse.

## 7- 2- *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle.

Synonyme :	<i>Cymbopogon afronardus</i> Stapf <i>Andropogon nardus</i> Linn
Nom usuel :	Citronnelle

### 7- 2- 1 - Botanique et utilisation

*Cymbopogon nardus* (désigné par l'appellation «citronnelle») ne doit pas être confondu avec *Cymbopogon citratus* (ou «lemongrass»).

C'est une plante qui se présente en touffes plus denses et plus hautes que le *Cymbopogon citratus*, à panicules ordinairement très composées et pourvues de spathes. Les épillets géminés sont plus ou moins différents suivant leur forme et leur sexe, l'un sessile, l'autre pédonculé, insérés sur le rachis articulé, fragile, de grappes géminées au sommet du chaume et de leur rameaux. Les paires de grappes sont pourvues d'une petite spathe et réunies en panicule pourvue de spathes plus grandes.

La hampe florale a de nombreuses ramifications terminées par des épis agglomérés verdâtres. La grume inférieure est plate chez le *Cymbopogon nardus* au lieu d'être concave comme chez *Cymbopogon citratus*.

Les deux espèces, probablement originaires d'Inde, sont maintenant cultivées dans différents pays, la plus répandue en Afrique étant l'espèce *Cymbopogon citratus* (Hutchinson J., Dalziel J. M., 1972).

### 7- 2- 2 - Travaux antérieurs

#### ➤ Etude chimique

L'huile essentielle de lemongrass contient généralement plus de 70% de citral.

On distingue deux variétés chimiques pour la citronnelle.

- L'huile essentielle de «Sri Lanka» ou «Ceylan» obtenue par distillation des parties aériennes fraîches ou partiellement desséchées de *Cymbopogon nardus* (L) W. Watson var. *lenabatu* Stapf cultivé principalement au Sri Lanka.

- L'huile essentielle «type Java», issue de *Cymbopogon nardus* (L.) Will. Watson var. maha-pengiri winter (syn. *Cymbopogon winterianus* Jowitt), cultivée en Asie du Sud-Est, en Chine, en Inde et en Amérique du Sud.

L'huile essentielle type «Ceylan» est utilisée pour la parfumerie fonctionnelle et le parfumage des savons; celle de type «Java», qui correspond à une production d'huile essentielle importante (plusieurs milliers de tonnes), est plus appréciée et trouve les mêmes usages que celle originaire du Sri Lanka, mais elle est également utilisée pour l'hémi-synthèse de molécules importantes dans l'industrie cosmétique, notamment le (-)-menthol.

Suivant les sources bibliographiques, leurs caractéristiques chimiques varient:

**Formacek et Kubeczka, en 1982**, indiquent que l'huile essentielle «type Sri Lanka» contient 25-40% de géraniol et 5-15% de citronellal, tandis que la variété «Java» est beaucoup plus riche en citronellal (25 à 55%) accompagné de géraniol (25-45%).

En fait, les Normes AFNOR correspondant à ces deux types d'huile ont été récemment mises à jour et donnent les caractéristiques chimiques suivantes:

- Huile essentielle de citronelle «type Java»:

ISO 3848: 2001 = citronellal (31-40%), citronellol (8.5-14%), géraniol (20-25%), élémol (1.3-4%).

- Huile essentielle de citronelle «type Sri Lanka»

ISO 3849: 2003: = camphre (7-10%), limonène (7-11.5%), citronellal (3-6%), bornéol (4-7%), citronellol (3-8.5%), géraniol (15-23%) et méthylisoeugénol (7-11%).

Nous présenterons les résultats des travaux scientifiques réalisés sur *Cymbopogon nardus* postérieurement à ceux de **Ayedoun, en 1995**, qui avait étudié l'huile essentielle obtenue à partir de l'espèce béninoise. Cette huile essentielle avait été obtenue avec un rendement de 1.6%, à partir d'un échantillon récolté en octobre 1994 dans le jardin expérimental du laboratoire de Biochimie au Campus d'Abomey Calavi. L'analyse indiquait des teneurs en citronellal (47.8%), géraniol (25.9%) et citronellol (10.3%), comparables à celle de l'huile essentielle de type «Java» décrite dans la Norme Française ISO 3848: 2001.

**En 1995, Moody et coll.**, trouvent que le constituant majoritaire de l'huile essentielle de l'espèce du Zimbabwe est le géraniol (29.5%) accompagné du formiate de géranyle (8.8%).

**La même année, Addae Mensah et coll.**, rapportent les résultats de leurs analyses d'huiles essentielles obtenues à partir d'échantillons récoltés dans 5 régions du Ghana. Ils donnent comme composés majoritaires: le citronellal (19.4-46.9%), le géraniol (19.8%-41.4%) et le citronellol (10.5-13.1%).

En 1998, Chowdhury et coll. indiquent que l'essence des feuilles de *Cymbopogon nardus* var. *confertiflorus* de Bangladesh contient majoritairement du géraniol (75.1%), accompagné de son acétate (7.6%).

En 2001, Lal et coll. réalisent une étude de la variabilité génétique de l'espèce *Cymbopogon winterianus* et de *Cymbopogon nardus* var. *nardus*; ils mettent en évidence la possibilité d'augmenter la qualité de leur huile essentielle conditionnée par un taux élevé de citronellal et une faible teneur en élémol.

En 2003, Mahalwal et Ali étudient l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles séchées de l'espèce cultivée dans les collines de Nilgiri à Oty, en Inde, théoriquement de type «Ceylan»; ils trouvent 29.7% de citronellal, 24% de géraniol, 9.2% de  $\gamma$ -terpinéol et 4.8% de nérolidol.

Il n'est pas fait mention de citronellool dans leur échantillon. Ils décrivent donc une huile essentielle totalement «atypique».

Enfin, on peut citer une étude physico chimique réalisée en 2004 sur la viscosité de plusieurs huiles essentielles, dont celle de *Cymbopogon nardus*, rencontrée en Côte d'Ivoire (Kanko et coll.).

#### ➤ Investigation biologique

Un certain nombre de propriétés biologiques ont été mises en évidence pour l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus*.

En 2001 Hifnawy et coll., mettent en évidence une forte activité de cette huile essentielle sur *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*; Chandrashekar et Joshi en 2004, ont examiné l'action des huiles essentielles de plusieurs espèces de *Cymbopogon* sur quatre microorganismes, les plus sensibles étant *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*.

Les propriétés antifongiques de cette huile essentielle sont souvent démontrées:

En 2000, Delespaul et coll., étudient les activités antifongiques de 37 huiles essentielles; parmi lesquelles celles de *Cymbopogon nardus* et de *Cymbopogon martinii* ont été efficaces.

La même équipe approfondit l'étude de l'action de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur l'*Aspergillus niger* (De Billerbeck et coll., 2001) tandis qu'en 2003, Nakahara et coll. testent l'activité antifongique de l'huile essentielle de citronelle sur plusieurs espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et d'*Eurotium* en micro atmosphère.

En revanche, aucune activité insecticide n'a pu être mise en évidence avec l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* L. Rendle récoltée au Togo (Ketoh et coll., 2000); mais d'autres extraits volatils, notamment ceux de *Cymbopogon schoenanthus* se sont montrés très efficaces.

Enfin, l'effet insectifuge de la citronnelle est bien connu et cette huile essentielle est souvent utilisée dans des préparations pharmaceutiques pour se prévenir des piqûres des moustiques. Les études scientifiques les plus récentes sur ce thème datent de 2005 (Paranagama et coll., Trongtokit et coll.) et confirment l'efficacité de cette huile essentielle. On notera cependant que dans la plupart de ces études, les compositions chimiques rapportées ne correspondent pas toujours au «type» de citronnelle annoncé, ce qui compliquera l'analyse comparative des résultats présentés

### 7- 2- 3 - Résultats et discussion

L'huile essentielle extraite des feuilles de *Cymbopogon nardus* sèches récoltées le 02/01/2005 à Abomey-Calavi a été obtenue avec un rendement de 1.3%. Ce résultat est similaire à celui trouvé par Ayedoun en 1995.

Les résultats de l'analyse chimique de cet échantillon sont consignés dans le tableau 26.

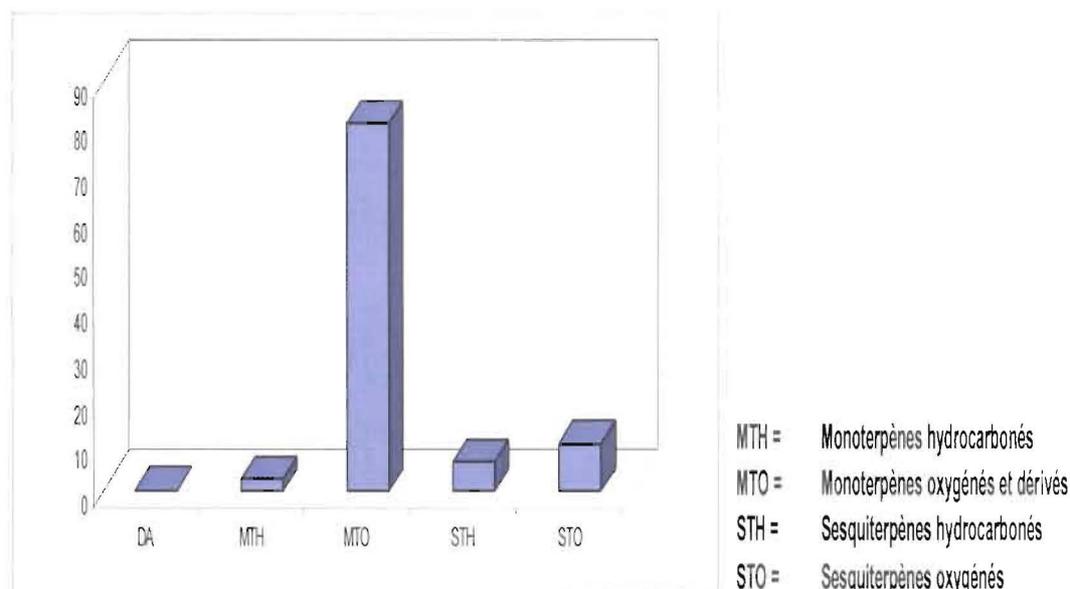


**Planche 13 : *Cymbopogon nardus* (Linn) Rendle**

**Tableau 26** : Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Cymbopogon nardus* (Linn) Rendle

Nom des composés	*IR	%
6-méthylhept-5-en-2-one	965	0.1
myrcène	981	0.1
limonène	1026	2.5
acétate d'hexényle	1036	0.1
linalol	1087	0.8
<b>citronellal</b>	<b>1146</b>	<b>25.1</b>
isopulégone	1157	0.4
<b>citronellol</b>	<b>1220</b>	<b>10.6</b>
néral	1225	0.4
<b>géraniol</b>	<b>1254</b>	<b>29.4</b>
géraniol	1267	0.1
acétate de citronellyle	1336	0.7
eugénol	1345	1.0
acétate de geranyle	1362	0.8
$\beta$ -élémente	1396	2.3
germacrène D	1492	1.4
$\alpha$ -muurolène	1507	0.5
$\gamma$ -cadinène	1530	0.4
$\delta$ -cadinène	1536	1.6
<b>élémol</b>	<b>1561</b>	<b>6.0</b>
germacrène D-4-ol	1590	0.4
$\gamma$ -eudesmol	1644	0.4
$\alpha$ -muurolol (torreyol)	1652	0.7
$\alpha$ -cadinol	1666	1.3
$\alpha$ -eudesmol	1671	0.4
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>2.6</b>
<b>Monoterpènes oxygénés et dérivés</b>		<b>80.5</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>6.2</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>10.2</b>
<b>Total</b>		<b>97.5</b>

\*IR sur une colonne DB1



**Figure 22** : Répartition des terpénoïdes dans l'huile essentielle des feuilles de *Cymbopogon nardus* (Linn) Rendle

L'huile essentielle est constituée essentiellement de monoterpènes oxygénés, dominés par le géraniol (29.4%), le citronellal (25.1%) et le citronellol (10.5%). Il s'agit donc d'une composition chimique de type «Java», avec néanmoins un taux de géraniol relativement élevé et un taux de citronellal trop faible si on se réfère aux profils normatifs donnés pour les essences de citronelle.

Aucune étude de l'activité antiradicalaire et/ou anti-inflammatoire n'étant mentionnée dans la littérature, nous nous sommes proposés de tester notre échantillon dans ces domaines.

## 8 – FAMILLE DES RUTACEAE

### 8- 1- *Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook. ex Benth.

Synonymes :           *Amyris anisata* Willd.  
                              *Clausena pobeguini* Pobéguin  
                              *Clausena inequalis*.

Noms vernaculaires :

Fon :           Gbosou zonwen  
Adja :         Kpatrayè  
Yoruba :      Igbo oruko  
Mina :         Ayiya

#### 8- 1- 1 - Botanique et utilisation

*Clausena anisata* est une espèce guinéo congolaise, qui se rencontre dans toute l'Afrique intertropicale, dans les formations secondaires de la Guinée à la République Centrafricaine.

C'est une plante suffrutescente, atteignant 2m de hauteur. Les feuilles sont odorantes, alternes, composées, folioles alternes, ovées ou ovées lancéolées, cunées à arrondies à la base, acuminées ou arrondies au sommet, de 10cm de longueur et de 5cm de largeur, glabrescentes. Les panicules de fleurs blanches ou verdâtres sont aussi longues que les feuilles, avec des pétales glabres. Ses fruits sont ellipsoïdes, petits, noir brillant à maturité.

*Clausena anisata* est largement utilisée comme plante médicinale pour soigner une variété de maux et pour ses propriétés insecticides (Irvine, 1961).

Le décocté aqueux de la tige feuillée est prescrit en bain de vapeur et /ou en bain total dans le traitement de la rougeole et des abcès. La pulpe des feuilles est utilisée en applications locales dans les lombalgies (Adjanooun et coll., 1986).

Le macéré d'écorce, de racines ou de feuilles est utilisé per os dans le traitement de l'angine, de l'ictère et des douleurs intestinales (Adjanooun et coll., 1989).

## 8- 1- 2 -Travaux antérieurs.

### ➤ Etude chimique

L'huile essentielle de *Clausena anisata* a fait l'objet de nombreuses investigations chimiques en raison de ses multiples vertus.

Les premières études remontent à 1947 (Meyer) qui rapportent l'obtention d'une huile essentielle avec un rendement supérieur à 4% à partir des feuilles de l'espèce originaire de Java; elle est caractérisée par une teneur élevée en anéthole (74,3%-89.6%) qui cristallise spontanément à basse température.

Depuis, d'autres études ont été menées sur cette espèce, rencontrée dans différentes régions tropicales.

Reisch et coll. étudient en 1985 les extraits hexaniques obtenus à partir des écorces, des feuilles et des racines de l'espèce Nigériane; ils identifient le cis-caryophyllène, l'humulène, le  $\beta$ -élémane, le (E)- $\beta$ -farnésène, l'acide hexadécanoïque et des cadinènes ( $\gamma$  et  $\delta$ ) dans toutes les parties de la plante. Le méthyl chavicol, l' $\alpha$ -pinène, le  $\gamma$ -terpinène le p-cymène et le sabinène ne se retrouvent que dans les écorces; les feuilles contiennent du myrcène, du limonène et divers sesquiterpènes.

Ils identifient donc, curieusement, une variété chimique très différente, dont les feuilles contiennent des constituants volatils d'origine terpénique, mais ils trouvent néanmoins dans l'écorce un autre isomère de l'anéthole, le méthyl chavicol.

Ce dérivé phénylpropanoïque est trouvé en quantité importante (92.7%) par Ekundayo et coll., en 1986, dans l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* récoltées à Ifè-Ifè (Nigéria), accompagné de (E)-p-méthoxycinnamaldéhyde (2.3%) et du p-anisaldéhyde (2%).

Le méthyl chavicol est également le composé majoritaire de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* étudiée par une autre équipe Nigériane (Okunade et Olaifa, 1987).

Plus tard, Addae-Mensah et coll, en 1996 et Moudachirou et coll., en 1997, au cours d'une étude comparative de plusieurs échantillons de feuilles récoltées au Ghana, au Togo et au Bénin, retrouvent effectivement l'existence de 3 chémotypes pour cette espèce: l'un à méthyl chavicol (avec des teneurs comprises entre 85 et 99%), l'autre à (E)-anéthole (avec des taux supérieurs à 95%), le troisième étant caractérisé par une composition chimique de l'huile essentielle beaucoup plus complexe avec plus de 50 constituants terpéniques, (avec des

concentrations variant de 0.2% à 20% maximum); parmi ceux-ci on peut citer: le limonène, le  $\beta$ -phellandène, le  $\beta$ -caryophyllène, l' $\alpha$ -humulène et le germacrène D.

Les rendements en huile essentielle sont nettement supérieurs pour les deux premiers chémotypes ( $\geq 1\%$ ) que pour le troisième ( $\leq 0.05\%$ ) dont les caractéristiques chimiques rappellent celles décrites par **Reisch et coll. (1985)**.

Ces résultats sont présentés par ailleurs par la même équipe (**Garneau et coll., en 1995**) qui identifient un quatrième chémotype caractérisé par un taux élevé dans leur huile essentielle d'un dérivé mixte (aromatique/terpénique): la foeniculine

**En 1997, Ayedoun et coll.** comparent les compositions chimiques des huiles essentielles extraites des feuilles et des fruits du *Clausena anisata* récoltés au Bénin (Abomey Calavi) et montrent qu'elles contiennent respectivement 88% et 40.8% de méthyl chavicol, 3.1% et 16.3% de (E)-anéthole, 4.2% et 13.4% de limonène et 0.3% et 22.2% de myrcène. Ils retrouvent donc des caractéristiques chimiques pour les fruits comparables à celles décrites par **Reisch et coll. en 1985**; ils détectent une quantité relativement importante de (E)-anethole qui n'avait pas été trouvée dans l'extrait hexanique du péricarpe.

Une partie de ces résultats est reprise en détail en **2000 (Garneau et coll.)** avec l'étude des huiles essentielles des feuilles de *Clausena anisata* récoltées au Ghana, et la mise en évidence du chémotype à (E)-anethole ainsi que la confirmation de l'existence du «quatrième chémotype» dominé par la présence de foeniculine.

Par ailleurs, l'espèce rencontrée au Cameroun semble complètement différente puisque **Ngassoum et coll., en 1999**, ont montré que les composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles sont dominées par des structures terpéniques acycliques: la (Z)-tagéténone (26.8%), la (E)-tagéténone (19.2%), le (E)-nérolidol (11.5%), accompagnés du germacrène D (9.2%).

Enfin, on peut citer la composition chimique «particulière» signalée antérieurement pour l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* collectées au Zimbabwe qui est dominée par le sabinène (33.0%) et le germacrène-D (17.0%) (**Gundidza et coll., 1994**).

Une étude bibliographique sur les huiles essentielles obtenues à partir d'autres espèces de *Clausena* d'origines diverses donne une vision comparative globale intéressante de leurs caractéristiques chimiques.

L'huile essentielle des feuilles de *Clausena dunniana* récoltées en Chine, obtenue avec un rendement de 0.7%, contient plus de 90% de méthyl chavicol (**Zhu et coll., 1987**).

L'extrait volatil des feuilles de *Clausena heptaphylla* contient 97.2% d'anéthole (Lockwood, 1984); ce résultat est confirmé 12 ans plus tard par l'étude des huiles essentielles obtenues à partir des feuilles et des fruits de l'espèce du Nord Est de l'Inde (98% d'anethole dans l'huile essentielle des feuilles et 61.7% dans celle des fruits) (Nath et coll, 1996). Les mêmes auteurs avaient identifié un autre chémotype pour l'espèce *C. heptaphylla* (également présent au Nord Est de l'Inde) caractérisé par une majorité de méthyl chavicol (75.6%), dans l'huile essentielle des feuilles, accompagné de l'anéthole (21.7%) (Nath et coll, 1991).

L'huile essentielle des feuilles de *Clausena excavata*, d'origine Vietnamiennne, est dominée par des structures terpéniques dont le  $\beta$ -caryophyllène (25.3%), le germacrène B (11.8%) et le  $\beta$ -phellandène (9.2%) (Leclercq et coll., 1994).

Enfin, *Clausena lansium* présente des caractéristiques chimiques très différentes : l'HE obtenue à partir des feuilles de l'espèce chinoise contient une majorité de sesquiterpènes: le  $\beta$ -santalol (35.2%) et le bisabolol (13.7%) (Zhao et coll., 2004).

La même espèce originaire de Cuba fournit une huile essentielle des feuilles, dominée par l'oxyde de caryophyllène (16.8%) et le (Z)- $\alpha$ -santalol (11.7%) (Pino et coll., 2006).

On retrouve donc majoritairement, parmi les constituants volatils du genre *Clausena*, des constituants de structure phénylpropane (anéthole ou son isomère le méthyl chavicol), qui sont liés biogénétiquement aux divers dérivés coumariniques non volatils identifiés chez différentes espèces de *Clausena* et responsables d'un certain nombre d'activités biologiques développées ci-après.

### ➤ Investigation biologique

Les investigations chimiques et biologiques sur les constituants non volatils du genre *Clausena* sont nombreuses.

En 1988, Khan et Naqvi indiquent la présence de trois classes de composés au sein du genre *Clausena*: des alcaloïdes (heptaphylline, clausenapine, heptazoline...etc), des coumarines (xanthoxyletine, clausenine, clausmarine...etc) et des dérivés mixtes (2-méthylanthraquinone, furanoquinone...etc).

Les dérivés coumariniques ont été particulièrement étudiés: Govindachari, en 1967, chez *C. dentata*, Bose, en 1973, chez *C. excavata*, Prakash, en 1989, chez *C. indica*, Ngadjui, en 1989(a,b), chez *C. anisata* ou He Hong, en 2004, chez *C. excavata*. Les activités biologiques sont souvent attribuées à ces structures coumariniques: on peut citer l'activité antivirale contre l'Herpes simplex types 1 et 2 de l'isomeranzine isolée des feuilles de *C.*

*heptaphylla* (Luu et coll., 2004), mais également l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de la même espèce au Bangladesh (Sohrab et coll., 2001) et l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *C. anisata* récoltées en Ethiopie (Aberra et coll., 2005). On peut noter également la mise en évidence d'une activité antitumorale pour l'extrait de *C. excavata* (Ito et coll., 2000), d'une activité antiplasmodiale pour *C. harmandiana* (Yenjai et coll., 2000) et d'un effet hypoglycémique pour un dérivé coumarinique isolé des feuilles de *C. lansium* (Shen et coll., 1989); mais également pour un extrait méthanolique des racines de *C. anisata* (Ojewole et coll., 2002).

Les investigations biologiques sur les huiles essentielles sont moins nombreuses: on peut noter cependant la mise en évidence d'une activité antimicrobienne pour l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* du Zimbabwe (Gundidza et coll, 1994) à teneur élevée en structures terpéniques.

Notre objectif était donc d'évaluer l'activité antiradicalaire ou anti-inflammatoire potentielle d'huiles essentielles de l'espèce *Clausena anisata* du Bénin et d'établir une éventuelle corrélation structures chimiques/activité suivant le (ou les) chémotypes(s) étudiés.

### 8- 1- 3 - Résultats et discussion

Les essences obtenues à partir des feuilles de *Clausena anisata* récoltées dans différentes régions du Bénin (Abomey-Calavi, Akassato, Setto et Houin) en 2003, 2004 et 2005 ont donné des rendements compris entre 0.13% et 0.3% avec un rendement exceptionnellement élevé (0.97%) pour un échantillon récolté en décembre à Akassato (tableau 27).

Les résultats de leur analyse chimique sont consignés dans les tableaux 28 et 29.

**Tableau 27 : Extraction des huiles essentielles des feuilles de *Clausena anisata* (Willd). J. D. Hook. ex. Benth.**

Echantillons	Date et lieu de la récolte	Méthode d'extraction	Rendement (%)
1	07/10/02 à Akassato	hydrodistillation	0.14
2	20/12/03 à Akassato	hydrodistillation	0.97
3	27/11/03 à Abomey-Calavi	hydrodistillation	0.2
4	13/01/04 à Setto	hydrodistillation	0.3
5	27/12/03 à Houin	hydrodistillation	0.13
6	18/04/04 à Houin	hydrodistillation	0.14
7	26/09/04 à Houin	hydrodistillation	0.13
8	31/08/05 à Houin	hydrodistillation	0.15



**Planche 14 : *Clausena anisata* (Willd). J. D. Hook. ex. Benth.**

**Tableau 28 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Willd). J. D. Hook. ex. Benth. de différentes régions du Bénin**

Nom des composés	*IR	1	2	3	4
$\alpha$ -pinène	939	2.6	1.5	1.1	1.4
sabinène	975	2.4	0.7	2.0	-
$\beta$ -pinène	982	0.2	0.1	0.2	-
myrcène	987	0.3	0.3	0.4	0.2
$\beta$ -phellandrène	1003	0.1	-	-	-
$\alpha$ -terpinène	1017	-	0.1	-	-
limonène	1028	-	1.0	0.7	0.2
1,8-cinéole	1031	2.3	0.1	0.1	0.1
(Z)- $\beta$ -ocimène	1041	-	1.1	0.3	0.2
(E)- $\beta$ -ocimène	1043	0.4	0.1	0.1	0.1
$\gamma$ -terpinène	1058	0.2	0.2	0.2	-
linalol	1091	0.3	0.4	0.4	0.2
terpinèn-4-ol	1175	-	0.1	0.9	-
<b>méthyl chavicol</b>	<b>1193</b>	<b>66.2</b>	<b>78.7</b>	<b>61.1</b>	<b>93.6</b>
<b>(E)-anéthol</b>	<b>1279</b>	<b>17.6</b>	<b>7.7</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>
4-vinyl-2-méthoxyphénol	1302	-	0.3	0.5	0.1
$\delta$ -élémente	1346	-	-	0.3	0.1
$\alpha$ -copaène	1377	-	0.1	0.1	0.2
$\beta$ -bourbonène	1388	-	0.3	0.3	0.1
$\beta$ -élémente	1403	1.3	-	4.4	0.1
<b><math>\beta</math>-caryophyllène</b>	<b>1441</b>	<b>2.1</b>	<b>1.6</b>	<b>5.9</b>	<b>0.3</b>
<b><math>\alpha</math>-humulène</b>	<b>1475</b>	<b>0.6</b>	<b>1.5</b>	<b>6.4</b>	<b>0.3</b>
<b>germacrène D</b>	<b>1499</b>	<b>1.0</b>	<b>0.2</b>	<b>9.3</b>	<b>0.1</b>
$\beta$ -bisabolène	1507	0.1	-	-	-
germacrène A	1516	0.1	0.6	1.4	0.1
$\gamma$ -cadinène	1526	-	0.1	-	0.1
$\delta$ -cadinène	1536	0.2	0.1	0.8	0.1
germacrène B	1561	0.1	-	-	-
oxyde de caryophyllène	1583	0.1	-	-	-
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>6.2</b>	<b>5.1</b>	<b>5.0</b>	<b>2.1</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>2.6</b>	<b>0.6</b>	<b>1.4</b>	<b>0.3</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>5.5</b>	<b>4.5</b>	<b>28.9</b>	<b>1.5</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>0.1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Composés aromatiques</b>		<b>83.8</b>	<b>86.7</b>	<b>61.9</b>	<b>93.9</b>
<b>Total</b>		<b>98.2</b>	<b>96.9</b>	<b>97.2</b>	<b>97.8</b>

1= Récoltées à Akassato le 07/10/02 (Pourcentages relatifs)

2= Récoltées à Akassato le 27/11/03 (Pourcentages relatifs)

3= Récoltées à Abomey-Calavi le 20/12/03 (Pourcentages relatifs)

4= Récoltées à Setto le 13/01/04 (Pourcentages relatifs)

\*IR sur une colonne DB1

**Tableau 29** : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Willd), J. D. Hook. ex. Benth. récoltées à différentes périodes à Houin.

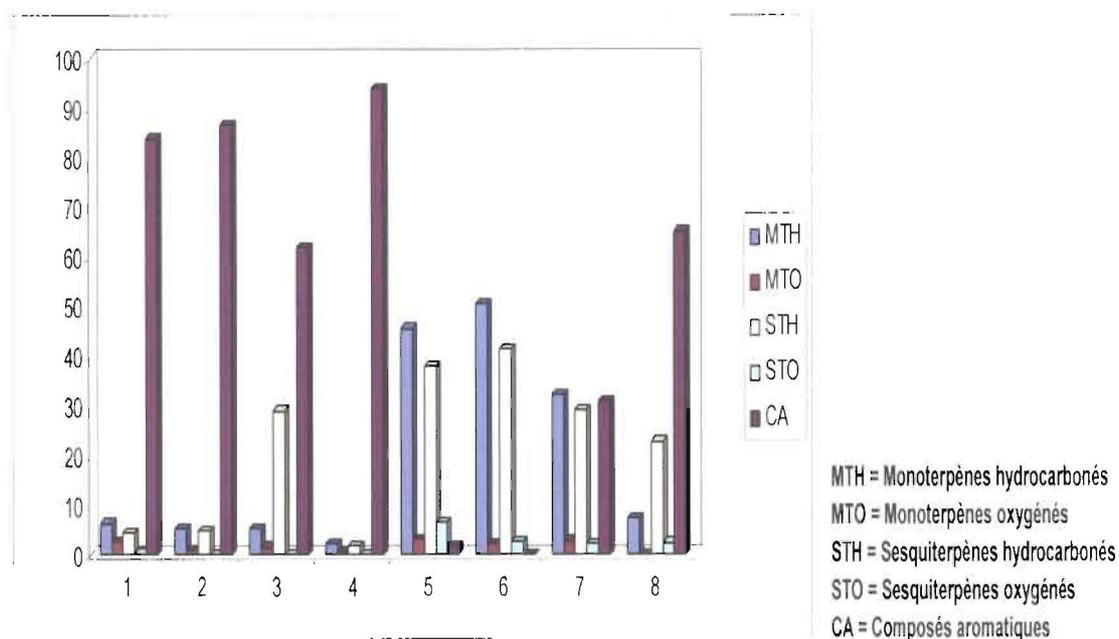
Nom des composés	*IR	5(%)	6(%)	7(%)	8(%)
$\alpha$ -pinène	939	17.1	20.1	10.7	3.2
camphène	954	0.1	0.4	-	-
sabinène	975	6.4	6	7.4	1.1
$\beta$ -pinène	982	1.1	2.1	0.9	-
myrcène	987	1.7	3.5	1.1	0.3
$\alpha$ -terpinène	1016	-	-	0.4	-
p-cymène	1025	-	-	0.2	-
limonène	1028	0.1	0.1	-	-
1,8-cinéole	1031	0.1	0.1	-	-
(Z)- $\beta$ -ocimène	1037	10.3	11.1	6.1	1.5
(E)- $\beta$ -ocimène	1043	8.0	6.3	4.7	1.2
$\gamma$ -terpinène	1058	0.6	0.8	0.7	-
linalol	1091	1.4	1.2	0.9	-
terpinèn-4-ol	1174	1.3	0.8	1.8	-
méthyl chavicol	1193	1.0	-	30.5	64.1
4-vinyl-2-méthoxyphénol	1303	0.5	-	0.4	0.9
$\alpha$ -cubébène	1351	0.1	0.1	0.2	-
$\alpha$ -copaène	1377	0.1	0.1	-	-
$\beta$ -bourbonène	1388	0.1	0.3	-	1.9
$\beta$ -élémente	1403	3.3	2.5	1.8	-
$\beta$ -caryophyllène	1441	12.2	12.8	9.7	8.6
$\beta$ -copaène	1445	0.1	0.1	0.2	-
$\alpha$ -humulène	1475	14.8	15.2	11.8	8.3
germacrène D	1499	5.5	8.5	4.3	3.1
bicyclogermacrène	1510	0.7	1.1	0.6	0.4
$\gamma$ -cadinène	1514	0.6	0.5	0.4	-
$\delta$ -cadinène	1536	0.2	0.1	0.1	0.4
spathuléol	1580	0.6	0.3	0.1	-
oxyde de caryophyllène	1583	2.7	1	0.2	1.0
oxyde humulène II	1622	1.9	0.7	1.5	0.7
NI	1634	1.4	0.4	0.3	0.4
caryophylladiénol	1647	1.3	0.6	0.3	0.5
NI	1703	1.8	0.8	1.1	0.5
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>45.4</b>	<b>50.4</b>	<b>32.2</b>	<b>7.3</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>2.8</b>	<b>2.1</b>	<b>2.7</b>	<b>-</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>37.7</b>	<b>41.3</b>	<b>29.1</b>	<b>22.7</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>6.5</b>	<b>2.6</b>	<b>2.1</b>	<b>2.2</b>
<b>Composés aromatiques</b>		<b>1.5</b>	<b>-</b>	<b>30.9</b>	<b>65.0</b>
<b>Total</b>		<b>93.9</b>	<b>96.4</b>	<b>97.0</b>	<b>97.2</b>

5= Récoltées à Houin le 27/12/03; 6 = Récoltées à Houin le 18/04/04

7 = Récoltées à Houin le 26/09/04; 8 = Récoltées à Houin le 31/08/05

\*IR sur une colonne DB1

Les spectres des composés non identifiés (NI) figurent en annexe



**Figure 23** : Répartition des constituants dans les échantillons d'huile essentielle de feuilles de *Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook ex. Benth.

On retrouve globalement dans le tableau 28 des échantillons caractéristiques d'un chémotype à «méthyl chavicol» (61.1%-93.6%) accompagné de taux variables d'anéthol.

Les résultats du tableau 29 témoignent d'une plus grande variabilité: les échantillons 5 et 6 sont dominés majoritairement par des structures monoterpéniques (45.4% et 50.4%) avec des taux élevés de pinènes et ocimènes, et des structures sesquiterpéniques (37.7% et 41.3%) avec le  $\beta$ -caryophyllène, l' $\alpha$ -humulène et le germacrène D; on retrouve, dans les échantillons 7 et 8, un taux relativement élevé de méthyl chavicol (30-60%) accompagné néanmoins des mêmes structures terpéniques à des taux relatifs inférieurs. Compte tenu de l'espacement des dates de collecte, il est difficile de conclure à une variabilité saisonnière au seul examen de ces résultats. Il s'agit probablement des différents «chénotypes» rencontrés dans la même zone géographique.

Globalement, on n'observe pas de relation nette entre le rendement en huile essentielle et le chémotype, comme cela avait été précédemment observé par **Addae Mensah et coll., en 1996.**

On retrouve, avec le chémotype à méthyl chavicol de *Clausena anisata*, une composition chimique de l'huile essentielle proche de celle de *Ravensara aromatica*, une Lauracée endémique de Madagascar (**Andranoelisoa et coll., 2006, in press**).

L'existence de 4 chémotypes a été mise en évidence pour cette espèce, sur la base des compositions chimiques des huiles essentielles des feuilles, dominées respectivement par le méthyl chavicol, le méthyl eugénol, l' $\alpha$ -terpinène/limonène et le sabinène/linalol/terpinène-4-ol.

Le méthyl eugénol n'a pas été identifié chez *Clausena anisata*; par contre on retrouve une «variabilité chimique» intéressante avec des chémotypes à composés issus de l'acide shikimique (méthyl chavicol, anéthol, foeniculine) et un chémotype à structures terpéniques (pinènes, ocimènes,  $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène, germacrène D).

Une étude en cours menée par le laboratoire de Chimie Biomoléculaire à l'Université de Montpellier II avec le CIRAD de Madagascar, semble indiquer que, quel que soit le chémotype de *Ravensara* considéré, l'huile essentielle de l'écorce conserve une composition chimique stable, dominée par le méthyl chavicol.

Ce phénomène de «variabilité chimique» importante suivant les parties de la plante n'est pas unique. On le retrouve chez une autre Lauracée, *Cinnamomum zeylanicum* dont les feuilles fournissent une huile essentielle à eugénol, tandis que l'écorce, mieux connue sous le nom de «cannelle», est source de cinnamaldéhyde à odeur épicée caractéristique qui explique son usage alimentaire.

Il serait intéressant de mener, sur des individus représentatifs des différents chémotypes définis pour *Clausena anisata* sur la base des constituants volatils de leurs feuilles, une étude systématique de variabilité saisonnière et de variabilité en fonction de la partie de la plante (feuilles, écorces et éventuellement fruits) afin de mieux connaître les potentialités de *Clausena anisata* pour la production d'huile essentielle à plus grande échelle.

Nous présenterons, dans le chapitre suivant, les résultats de nos investigations biologiques effectuées sur l'ensemble des échantillons.

L'échantillon 1 de ce travail a fait l'objet d'une publication en 2004 (Avlessi et coll., 2004) dans laquelle sont présentées les propriétés antiradicalaires et antioxydantes.

## 9 – FAMILLE DES VERBENACEAE

### 9- 1 - *Lippia multiflora* Moldenke

Synonyme : *Lippia adoensis* Hochst.  
*Lippia grandifolia* Martus et Schau

Nom vernaculaire :

Fon: Aglala, Aklala  
Yoruba: Efintin, Kanhoun  
Mina: Avundati

Nom usuel : Thé Gambie

#### 9- 1- 1 - Botanique et utilisation

C'est une plante aromatique, ligneuse, dressée, atteignant 2.5m de haut, répandue dans les savanes soudano-zambéziennes (**Adjanooun et coll., 1986**).

Vivace par les souches, elle est anguleuse et pubescente, ramifiée aux inflorescences.

Les feuilles verticillées par 4 ou par 3, rarement par 2, sont oblongues lancéolées ou elliptiques, à base longuement cunée, au sommet acuminé, à bords finement dentés et à pubescence blanchâtre dessous, portant 7 à 8 paires de nervures latérales.

Les épis terminaux ombelliformes, globuleux ou cylindriques, sont longs de 5 à 20 mm, larges de 4 à 8 mm, disposés à l'extrémité d'un pédoncule plus ou moins long.

Les fleurs sont petites et blanches ou jaunâtres. Les bractées sont obtuses (**Kérharo et Adam, 1974; Adjanooun et coll. 1986**).

Le décocté aqueux de la tige feuillée est utilisé par voie orale pour traiter l'ictère (**Adjanooun et coll., 1986**).

La plante entière est utilisée en boisson théiforme, comme antigrippal, béchique et stimulant.

*Lippia multiflora* est recommandé par les guérisseurs Peuls Firdou comme médicament à la fois revigorant et calmant dans les affections sourdes et tenaces de l'abdomen; ils prescrivent, alors, un macéré de poudre de racines (**Kérharo et Adam, 1974**).

Les feuilles sont consommées en sauce avec le suc des feuilles de *Sanseveria liberica*, de la viande de tortue et d'escargot, du poivre et de l'huile de palme dans les crises d'épilepsie. Le décocté aqueux des tiges feuillées est utilisé per os pour soigner le rhume et les céphalées. Le macéré aqueux des tiges feuillées, est conseillé par voie orale en association avec *Ocimum gratissimum* pour soigner les vomissements (**Raponda Walker et Sillans, 1961**).

### 9- 1- 2 - Travaux antérieurs

#### ➤ Etude chimique

Plusieurs études chimiques ont été déjà réalisées sur l'huile essentielle de *Lippia multiflora*. Seules les plus récentes, concernant surtout les constituants volatils des feuilles, sont données ci-après.

**En 1990, Lamaty et coll.** ont étudié six échantillons d'huiles essentielles obtenues à partir de plantes récoltées dans différentes régions du Congo. Ils ont distingué deux groupes, caractérisés par des compositions chimiques différentes :

- le premier groupe (type A), est caractérisé par des teneurs élevées en composés aromatiques (p-cymène, thymol, carvacrol et leurs acétates).

- le deuxième groupe (type B), est riche en cétones terpéniques: 2-méthyl-6-méthylène-7-octène-4-one (ipsénone), avec les (Z) et (E) tagétones et le  $\beta$ -caryophyllène.

**Mwangi et coll., en 1992**, effectuent une étude chimique et biologique des huiles essentielles des espèces de *Lippia* du Kenya.; d'après leurs analyses, le linalol, le thymol, le  $\beta$ -cubébène et le p-cymène sont les composés majoritaires de cette huile essentielle.

**Velasco-Negueruela et coll., en 1993**, étudient les constituants volatils de 40 espèces du genre *Lippia* d'Argentine parmi lesquelles figure *lippia multiflora*.

**Abegaz et coll., dans la même année** ont fait l'étude chimique des huiles essentielles de *Lippia adoensis* type « sauvage » et type « cultivé » d'origine éthiopienne. Le constituant majoritaire obtenu dans les deux cas est le linalol avec des pourcentages variant entre 68.0% et 83%.

**Menut et coll., en 1995**, analysent l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de *Lippia multiflora* récoltées au Bénin ; l'huile est caractérisée par des taux élevés de myrténol (27,1%), de linalol (11,9%) et de 1,8-cinéole (11,6%).

**En 1995, Garneau et coll.** ont classé les différents chémotypes recensés pour cette espèce en fonction de leur provenance.

- type à carvone/linalol (Ethiopie),

- type à camphre (Ghana),
- type à thymol/p-cymène ; ou (E)-tagétone/ipsénone (Congo),
- type à géraniol/nérol (Togo).

**Menut et coll., en 1995**, identifient un nouveau constituant dans l'huile essentielle de *Lippia multiflora* récoltée en Centrafrique, le 6,7-époxymyrcène (70,3%).

**Koumaglo et coll., en 1996**, étudient les essences de l'espèce rencontrée au Togo et identifient trois chémotypes caractérisés respectivement par des taux élevés en citral (23-89%), en thymol et p-cymène (15-40% et 15-20% respectivement) et en 1,8-cinéole (63%); ils sont accompagnés par du sabinène 13.3%.

**Kanko et coll., en 1999**, en Côte d'Ivoire, trouvent un chémotype jamais décrit auparavant dans un échantillon récolté à Bouaké, l'huile essentielle est caractérisée par un taux élevé de (Z)-nérolidol.

Ils proposent une classification complète incluant tous les chémotypes précédemment décrits. Ils distinguent trois groupes :

❖ Le groupe I est celui des monoterpènes acycliques avec plusieurs chémotypes :

- à linalol (Nigéria, Kénia, Bénin, Togo),
- à géraniol/nérol (Togo),
- à (E)- tagétone/(Z)-tagétone/ipsénone (Congo),
- à 6,7-époxymyrcène (Centrafrique).

❖ Le groupe II se caractérise par la prédominance des monoterpènes aromatiques avec le chémotype à thymol/acétate de thymyle/p-cymène (Congo, Bénin, Togo, Gabon).

❖ Le groupe III enfin est celui à monoterpènes cycliques ou bicycliques, représentés par le 1,8-cinéole qui peut être seul, ou associé à d'autres composés comme l' $\alpha$ -terpinéol et/ou le sabinène, le myrténol, le thymol, le (Z)- $\beta$ -farnésène.

➤ Quatre thèses réalisées en collaboration avec l'Université Montpellier 2 ont abordé l'étude de *Lippia multiflora*:

**Bissangou (1993)**, réalise une étude qui tient compte des variations saisonnières et des périodes de récolte; elle analyse les huiles essentielles des différents organes. Ses essences sont de type ipsénone et tagétone.

**Ayedoun en 1995**, a analysé les huiles essentielles des feuilles et des fleurs récoltées dans trois régions différentes du Bénin. Les résultats lui ont permis de distinguer quatre chémotypes (type à linalol + 1,8-cinéole; type à myrténol + 1,8-cinéole; type à 1,8-cinéole +  $\alpha$ -terpinéol; type à thymol + acétate de thymyle + p-cymène) au sein de cette espèce.

**Eyele-Mve-Mba (1997)**, trouve que l'essence du Gabon contient du p-cymène (17,6%), du thymol (39,4%), de l'acétate de thymyle (15,1%) et du carvacrol (7,2%).

**Ndoye Foe-Belinga en 2001**, a analysé dans sa thèse les huiles essentielles extraites des feuilles et des fleurs de *Lippia multiflora* récoltées à Bonis (Cameroun); elle a trouvé respectivement et principalement: le 1,8-cinéole (31,1% ; 32,7%), le linalol (28,3% ; 30,6%), le sabinène (8,1% ; 7,6%) et le myrcène (7,2% ; 7,0%).

D'autres études chimiques réalisées en appui à, des investigations biologiques sont présentées dans le paragraphe ci-après.

#### ➤ Investigation biologique

Dans une étude chimique, bactériologique et toxicologique menée en **1994** par **Pélissier et coll.**, la (Z)-tagétone (11.3%) et (E)-tagétone (30.2%), constituants majoritaires de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Lippia multiflora*, furent reconnus actifs contre les microorganismes de la flore buccale.

**En 1995, Valentin et coll.** montrent une activité antimalariale in vitro de l'huile essentielle de *Lippia multiflora* récolté en Côte d'Ivoire avec un chémotype à linalol et à (Z)- $\beta$ -farnésène.

**En 2002, Nebie et coll.** ont étudié la composition chimique d'une huile essentielle extraite des fruits de *Lippia multiflora* du Burkina Faso; ils ont trouvé comme composés majoritaires: le thymol (29.9%), le p-cymène (26.2%) et l'acétate de thymyle (11.8%); des propriétés insecticides ont pu être mises en évidence pour cette huile essentielle.

**Bassole et coll., en 2003**, ont analysé l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de *Lippia multiflora* récoltées au Burkina Faso; elle est riche en: thymol/p-cymène/acétate de thymyle et s'est avérée active sur les bactéries Gram-neg.

**Abena et coll. en 2003**, ont étudié les activités analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires de l'huile essentielle de *Lippia multiflora*; ils ont montré que cette essence présente une activité analgésique significative.

**En 2003, Kunle et coll.**, ont mis en évidence une activité antimicrobienne pour l'essence de l'espèce nigériane; elle a été attribuée à la présence de carvacrol

En 2005, Agnani et coll., ont reconnu deux chémotypes pour l'espèce représentée au Gabon : le premier chémotype contient de l'ipsdiénone (54.6%), les (Z) et (E)-ociménones (20.3%), le (E)- $\beta$ -farnésène (7.4%) et le  $\beta$ -caryophyllène (4.6%) tandis que le deuxième contient du thymol (41.9%), de l'acétate de thymyle (21.2%), du p-cymène (9.8%) et du carvacrol (7.2%).

Le deuxième chémotype présente une activité anti-oxydante intéressante.

### 9 -1-3 - Résultats et discussion

L'hydrodistillation des feuilles de *Lippia multiflora* récoltées à Atchérigbé en septembre 2003, a donné une huile essentielle avec un rendement de 1,4%.

Les résultats de l'analyse chimique sont indiqués dans le tableau 30.



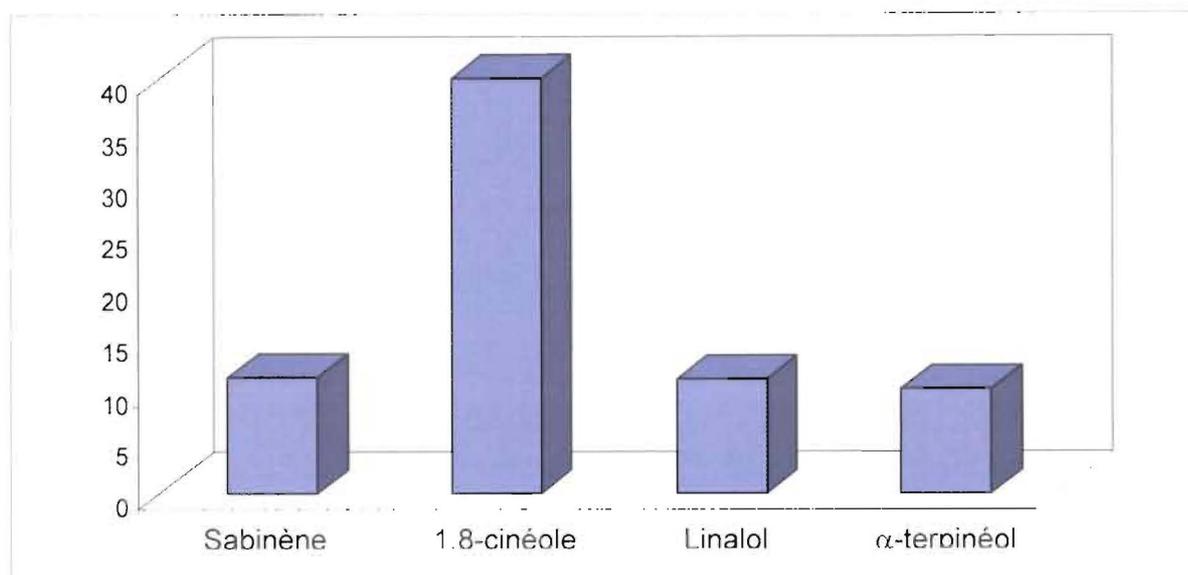
Planche 15 : *Lippia multiflora* Moldenke

**Tableau 30 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Lippia multiflora***

Moldenke récoltées à Atchérigbé (Zou)

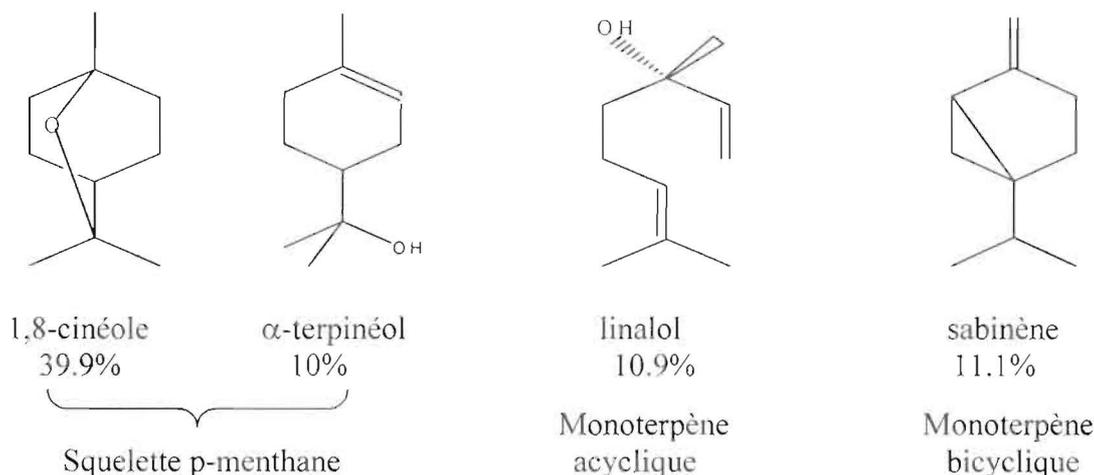
Nom des composés	*IR	%
$\alpha$ -thujène	930	1.5
$\alpha$ -pinène	940	5.1
camphène	954	0.1
<b>sabinène</b>	<b>975</b>	<b>11.1</b>
$\beta$ -pinène	982	2.5
myrcène	987	3.3
$\alpha$ -phellandrène	1006	0.2
$\alpha$ -terpinène	1017	1.5
<b>1,8-cinéole</b>	<b>1035</b>	<b>39.9</b>
(E)- $\beta$ -ocimène	1043	0.5
$\gamma$ -terpinène	1059	0.3
hydrate de sabinène (cis)	1070	2.7
terpinolène	1090	0.9
<b>linalol</b>	<b>1093</b>	<b>10.9</b>
$\alpha$ -campholénal	1127	0.1
pinocarvone	1165	0.7
$\delta$ -terpinéol	1166	0.2
terpinèn-4-ol	1177	0.4
<b><math>\alpha</math>-terpinéol</b>	<b>1189</b>	<b>10.0</b>
myrténol	1196	0.1
verbénone	1205	0.1
<i>trans</i> -carvéol	1217	0.1
citronellol	1226	0.1
géraniol	1267	0.1
eugénol	1359	0.1
$\alpha$ -copaène	1377	0.2
$\beta$ -cubébène	1388	0.8
$\beta$ -caryophyllène	1419	1.1
(Z)- $\beta$ -farnésène	1441	0.1
$\alpha$ -humulène	1455	0.1
allo-aromadendrène	1460	0.1
germacrène D	1485	1.0
(E,E)- $\alpha$ -farnésène	1506	0.1
cubébol	1515	0.1
$\delta$ -cadinène	1523	0.1
(E)-nérolidol	1563	0.5
germacrène D-4-ol	1576	0.2
oxyde de caryophyllène	1583	0.2
<b>Monoterpène hydrocarbonés</b>		<b>27.1</b>
<b>Monoterpène oxygénés</b>		<b>65.5</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>4.0</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>0.8</b>
<b>Composé aromatique</b>		<b>0.1</b>
<b>Total</b>		<b>97.5</b>

\*IR sur une colonne DB1



**Figure 24** : Répartition des composés majoritaires dans l'huile essentielle de *Lippia multiflora* Moldenke (feuilles)

L'huile essentielle obtenue à partir de l'espèce récoltée à Atchérigbé est dominée par les constituants qui représentent plus de 70% du mélange: deux composés à squelette p-menthane, le 1,8-cinéole (39.9%) et l'α-terpinéol (10%), un monoterpène hydrocarboné bicyclique, le sabinène (11.1%) et un dérivé acyclique, le linalol (10.9%); on peut donc rattacher cette variété chimique au groupe III défini par **Kanko et coll.** malgré la présence d'une quantité significative de linalol.



Ce résultat illustre bien la variabilité chimique au sein de l'espèce et l'importance de l'identification formelle du chémotype pour une utilisation thérapeutique de la plante dont l'efficacité sera dépendante de ses caractéristiques chimiques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2005 (**Avlessi et coll., 2005**) dans laquelle sont également présentées les propriétés antiradicalaires qui seront développées dans la troisième partie de la thèse.

## 10 - Conclusion sur les analyses chimiques

L'analyse chimique des différents échantillons d'huiles essentielles récoltés dans différentes localités du Bénin, nous a donné des résultats intéressants.

L'extraction de ces différentes huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation avec des rendements variant de 0.01% à 2.4%, la valeur minimum correspondant aux feuilles de *Pentadesma butyracea* (Guttiferae) et le rendement maximum étant obtenu avec les feuilles de *Pimenta racemosa* (Myrtaceae).

Parmi les espèces étudiées, les huiles essentielles de *Pentadesma butyracea* (Guttiferae) sont décrites pour la première fois sur le plan chimique. Elles sont dominées par des sesquiterpènes hydrocarbonés en particulier le  $\beta$ -caryophyllène. On retrouve sur l'ensemble des échantillons examinés, les différentes structures rencontrées dans les huiles essentielles: terpènes, dérivés aromatiques et constituants aliphatiques.

L'analyse chimique des échantillons met en évidence des compositions chimiques relativement classiques dominées:

➤ Par des structures terpéniques: les monoterpènes (*Monodora myristica*, *Xylopi aethiopica*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum canum*, *Ocimum gratissimum fleurs*, *Cymbopogon giganteus*, *Cymbopogon nardus*, *Lippia multiflora*, *Clausena anisata*); les sesquiterpènes (*Annona muricata*, *Annona squamosa*, *Commiphora africana*, *Pentadesma butyracea*)

➤ Par de structures phénoliques (*Aeolanthus pubescens*, *Ocimum gratisimum*, *Pimenta racemosa*, *Clausena anisata* Houin)

Deux chémotypes (thymol et carvacrol), ont été mis en évidence pour les échantillons d'huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens*.

➤ Parmi les espèces dominées par les monoterpènes, nous avons étudié *Chenopodium ambrosioides* et *Cymbopogon giganteus*.

Dans les échantillons d'huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides*, la majorité des constituants volatils ont une structure p-menthanique. L'ascaridole, constituant majoritaire, est formé par addition d'une molécule d'oxygène singulet sur l' $\alpha$ -terpinène. Compte tenu de la fragilité relative de l'ascaridole, il a été montré que sa décomposition thermique reste limitée aux températures d'injections. Dans les huiles essentielles, l'isoascaridole devient minoritaire et on constate, simultanément, l'apparition d'autres produits: oxyde de pipéritone, oxyde de carvenone et glycol ascaridole.

L'extrait au pentane du même échantillon montre 4 composés volatils principaux: l' $\alpha$ -terpinène, le p-cymène, l'ascaridole et l'isoascaridole (diépoxy-p-menthane).

La composition chimique de nos échantillons de *Cymbopogon giganteus* sont comparables à ceux déjà décrits pour des échantillons d'autres provenances, caractérisés par une majorité de dérivés oxygénés p-menthane, principalement les p-mentha-1(7),8-dièn-2-ols et les p-mentha-2,8-dièn-1-ols qui représentent les 2/3 de l'huile essentielle.

Les composants minoritaires, de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* ont été identifiés après son fractionnement par chromatographie sur Florisil, l'opération a donné 6 fractions qui ont été analysées.

L'identification des dérivés  $\alpha$ -oxygénés du limonène a été vérifiée en oxydant celui-ci par l'hydroperoxyde de tertio-butyle (t-buOOH) en présence de chrome hexacarbonyle [Cr(CO)<sub>6</sub>]; la réaction a fourni plusieurs produits, dont un majoritaire des deux cétones attendues, la carvone et l'isopipéritone, présentes dans l'huile essentielle.

L'oxydation ménagée de la fraction riche en alcools, par le dioxyde de manganèse (MnO<sub>2</sub>) activé dans le dichlorométhane n'est pas totale et on observe l'oxydation partielle des alcools secondaires : isopipériténol en isopipériténone.

**Troisième Partie:**

**EVALUATION BIOLOGIQUE DES  
HUILES ESSENTIELLES**

## 1- Propriétés antiradicalaires des huiles essentielles

### 1-1- Généralités sur les antiradicalaires

(Brand-Williams et coll., 1995; Cotelle et coll., 1996; Cuvelier, 1997; Cuvelier et Richard, 1997; Cuvelier et Martel P., 2002; Mellors et coll., 1996; Helme et coll., 1992)

#### 1-1-1- Définitions

Les radicaux libres sont des espèces chimiques neutres ou chargées qui possèdent un électron non apparié, également appelé «électron célibataire». Ils sont produits par voie chimique, photochimique ou biologique. Leur durée de vie est très courte et on peut les stabiliser par fusion ou transfert.

Ils interviennent dans le phénomène d'oxydation des acides gras, au cours des réactions chimiques en chaîne de type radicalaire conduisant à leur dégradation et au phénomène dit «de rancissement». L'utilisation d'un antioxydant ou d'un antiradicalaire, permettra de minimiser ces phénomènes et de prolonger la conservation des aliments, mais ils interviennent également en cosmétique ou dans le domaine de la phytothérapie, où les espèces radicalaires sont associées à la notion de «vieillesse».

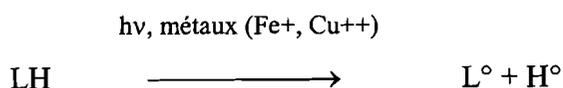
L'utilisation des antiradicalaires que l'on désigne parfois à tort par le terme antioxydant touche donc différents domaines tels que l'agroalimentaire, la thérapeutique ou la cosmétique.

#### 1-1-2- Mécanismes de l'oxydation des acides gras

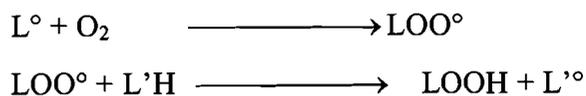
(Brand-Williams et coll., 1995; Cotelle et coll., 1996; Cuvelier, 1997; Cuvelier et Richard, 1997; Cuvelier et Martel P., 2002; Mellors et coll., 1996; Helme et coll., 1992)

L'oxydation chimique d'un corps gras met en jeu 3 étapes :

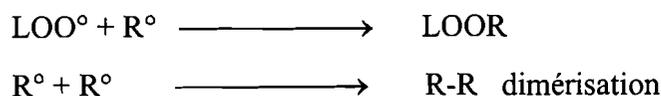
**L'induction** ou l'initiation : c'est l'arrachement d'un atome d'hydrogène à la chaîne grasse pour former un radical libre, cela exige de l'énergie.



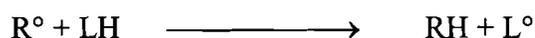
**La propagation** en chaîne du radical libre formé va initier à son tour l'oxydation d'une nouvelle molécule.



**La terminaison** : c'est le piégeage ou la fusion des électrons célibataires et la formation de molécules stables.



La relance peut être assimilée à une initiation



Bien souvent, les réactions n'ont pas lieu absolument dans l'ordre indiqué. En plus des réactions en chaîne et de terminaison sus évoquées, il y a généralement des situations intermédiaires:

- Migration de doubles liaisons avec changement de configuration, on aboutit à la formation d'isomères dits non naturels.
- La chaîne carbonée peut également se rompre, créer un nouveau radical et entraîner la formation d'espèces oxygénées telles que les aldéhydes à courtes chaînes susceptibles d'apporter des odeurs et saveurs indésirables.

En fait dans la nature, les radicaux libres les plus importants sont ceux qui proviennent de l'action de l'oxygène dissous dans l'eau et concrètement, on observe :

- la disparition des substrats de l'oxydation (oxygène, acides gras insaturés) ;
- l'apparition des produits primaires d'oxydation (les peroxydes) ;
- l'apparition des produits secondaires d'oxydation par scission et recombinaison à partir des peroxydes (composés volatils, aldéhydes, époxydes, polymères...).

Ces réactions sont souvent prises comme modèles pour tester l'efficacité d'un antioxydant ou d'un antiradicalaire.

### 1-1-3- Nature et rôle des inhibiteurs des phénomènes d'oxydation dans les acides gras

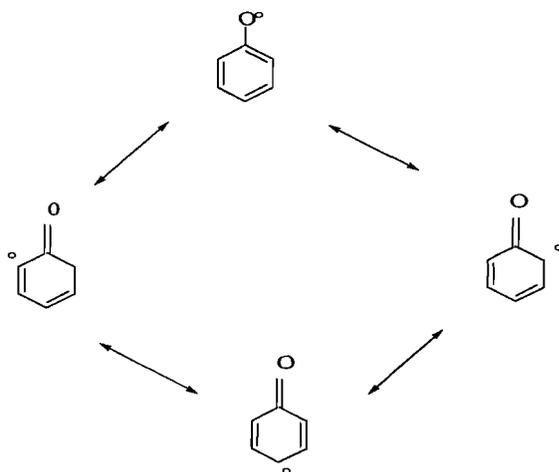
On emploie souvent le terme général d'antioxydant pour désigner les entités susceptibles de ralentir le phénomène d'oxydation des acides gras.

En revanche, il faut distinguer deux types d'action et donc deux types d'antioxydants: les primaires pouvant arrêter la chaîne d'autooxydation et les préventifs ou secondaires qui agissent sur différents facteurs impliqués dans le phénomène d'oxydation.

#### 1-1-3-1- Les antiradicalaires ou antioxydants primaires

Ils sont capables d'interrompre la chaîne autocatalytique en bloquant les radicaux libres lipidiques par transfert d'un radical hydrogène.

Ils sont généralement de nature phénolique, leur efficacité s'explique par la délocalisation de l'électron célibataire de l'oxygène avec le noyau aromatique, stabilisant ainsi le radical formé.



Dans ce groupe, on trouve des monophénols d'origine naturelle (thymol, carvacrol, eugénol, tocophérol), synthétique (butyl hydroxy toluène, BHT ou butyl hydroxy anisole BHA), mais également des polyphénols avec 2 ou 3 groupes OH, souvent plus puissants. On peut citer la TBHQ (monotertiobutyl hydroquinone) qui est un produit de synthèse, ou des produits d'origine naturelle tels que le pyrocatéchol et l'hydroxytyrosol, mais surtout la famille des acides phénoliques (acides caféique, gallique, rosmarinique...).

### 1-1-3-2- Les antioxydants secondaires ou préventifs

Les antioxydants préventifs sont ceux capables soit de retarder l'oxydation des lipides par des procédés autres que l'interruption de la chaîne d'autooxydation, soit d'inhiber la production de radicaux libres servant à l'initiation de ces réactions. Ils agissent principalement sur deux facteurs: l'oxygène et les ions métalliques.

#### ➤ Les réducteurs d'oxygène

L'acide ascorbique : il peut également régénérer les antioxydants primaires tels que les tocophérols.

Le  $\beta$ -carotène : il est capable de désactiver l'oxygène singulet formé par photosensibilisation.

#### ➤ Les chélateurs de métaux

Ils forment des complexes avec les ions métalliques et permettent de réduire l'effet prooxydant des métaux dans l'initiation et la propagation de l'oxydation. On peut citer l'EDTA, l'acide citrique, l'acide phosphorique et les polyphosphates, l'acide tartrique, l'acide phytique.

### 1-1-3-3- Les antioxydants naturels et leur importance

Les antioxydants naturels sont très répandus dans le monde végétal et peuvent être regroupés en 5 grandes familles :

Nous avons déjà cité les **composés phénoliques** qui agissent comme des antiradicalaires c'est-à-dire des antioxydants primaires, mais on peut également citer certains **dérivés dicétoniques** comme ceux rencontrés dans les curcuma et caractérisés par la présence conjointe des fonctions cétone et phénol.

La partie dicétonique semble jouer un rôle primordial dans l'activité de ce type de structure, à la fois de piège radicalaire et de chélateur des ions métalliques. On trouve d'ailleurs, dans cette classe de composés des structures dicétoniques présentant des activités antioxydantes sans présence de fonctions phénols: c'est le cas de la triacontane-16,18-dione, identifiée dans les feuilles d'*Eucalyptus*.

➤ **L'acide ascorbique** (vitamine C), agissant principalement comme réducteur de l'oxygène et surtout présent dans les fruits et légumes. Il est très largement utilisé comme conservateur et la plus grande partie provient de la synthèse industrielle.

➤ **Les caroténoïdes** dont l'activité antioxydante peut s'expliquer par leur capacité à désactiver l'oxygène singulet, sont également présents dans les fruits et légumes (tomate, carotte...). Leur utilisation en alimentation et en cosmétologie reste néanmoins limitée à cause de leur couleur orangée due à la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées.

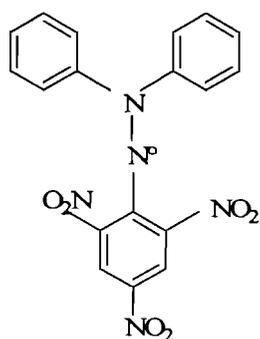
➤ **Certains composés azotés (alcaloïdes)** présentent relativement peu d'intérêt pour leur action antioxydante, compte tenu de leur grande toxicité.

Les composés volatils rencontrés dans les huiles essentielles susceptibles de présenter une activité antiradicalaire intéressante sont essentiellement des phénols.

## 1-2- Résultats et discussion

Nous avons testés les potentialités antiradicalaires de nos échantillons d'huile essentielle en étudiant leur réactivité vis-à-vis du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) qui est un capteur de radicaux libres dont le piégeage, par l'antiradicalaire, se traduit par une disparition de la coloration pourpre.

Un échantillon très réactif pourra entraîner une décoloration quasi instantanée de la solution de DPPH.



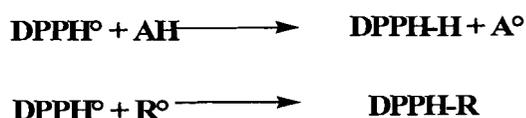
DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine

### 1-2-1- Principe de la mesure

Le procédé d'évaluation des propriétés antiradicalaires par le test au DPPH a été mis au point au laboratoire d'après la méthode décrite par **Brand-Williams et coll., en 1995**.

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage de radicaux libres d'une solution de DPPH. Ce piégeage est visualisé par la disparition de la couleur pourpre de DPPH. La réaction de décoloration peut être suivie en spectrophotométrie.

L'étude de la décoloration d'une solution de DPPH en présence d'inhibiteur est réalisée par mesure spectrophotométrique à 517 nm (spectrophotomètre UV-mc2, Safas Monaco).



Les cuves sont laissées dans un bain thermostaté à 30°C et les absorbances (A) des solutions sont mesurées toutes les 10 minutes pendant une heure.

Dans chaque série de mesures, le comportement des solutions en présence d'antiradicalaire est comparé à celui d'une solution de référence (solution de DPPH) sans inhibiteur.

Un premier test a consisté à utiliser les huiles essentielles pures (concentration 5g/L) pour voir celles qui sont actives. On peut alors recommencer le test avec une gamme de concentrations; le graphe représentant le pourcentage de piégeage en fonction de la concentration permet de déterminer le SC<sub>50</sub>. (Concentration en inhibition conduisant à 50% d'inhibition).

Le calcul du pourcentage d'inhibition est réalisé par rapport au témoin selon la formule:

$$\%SC = \frac{A(\text{témoin}) - A(\text{inhibiteur})}{A(\text{témoin}) - A(100)} \times 100$$

A (témoin) = Absorbance du témoin à 60 min (solution de DPPH sans inhibiteur)

A (inhibiteur) = Absorbance de l'essai à 60 min (en présence d'inhibiteur)

A (100) = Absorbance en fin de réaction (voisine de 0) pour un piégeage total (entre 0.015 et 0.08 suivant la coloration de la solution).

La valeur de  $SC_{50}$  dépend de la concentration en DPPH utilisée pour le test. On peut éliminer ce paramètre en ramenant cette valeur à une mole de DPPH, avec le calcul de la concentration efficace ( $CE_{50}$ ).

➤ **Concentration efficace (CE)**

La  $CE_{50}$  (concentration efficace) est calculée à partir du  $SC_{50}$  à partir de l'équation suivante :

$$CE_{50} = \frac{SC_{50}}{C_{DPPH}}$$

dans laquelle

- $SC_{50}$  est exprimé en g/L
- $C_{DPPH}$  est exprimé en g/L
- $CE_{50}$  est exprimé en g d'antiradicalaire / mole de DPPH

La concentration en DPPH, exprimée en moles /L, est obtenue à partir de l'équation suivante, déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée en triplicate sur 6 concentrations en DPPH,

$$Abs_{517} = 9\,832 \times C_{DPPH}$$

$Abs_{517}$ : Absorbance à 517nm de la solution de DPPH: Concentration réelle de DPPH en moles/L.

On notera, à titre informatif, que **Brand-Williams et coll., 1995** avaient proposé l'équation suivante pour des mesures effectuées à 515nm dans du méthanol:

$$Abs_{515} = 12\,509 \times C_{DPPH}$$

**1-2-2- Mise au point des conditions expérimentales: étude de composés antiradicalaires commerciaux**

Des mesures ont été réalisées sur des antiradicalaires commerciaux courants: BHT, BHA, thymol, carvacrol, eugénol, acide gallique. Deux composés de synthèse, le BHT et le BHA et quatre composés naturels: thymol, carvacrol, eugénol et acide gallique.

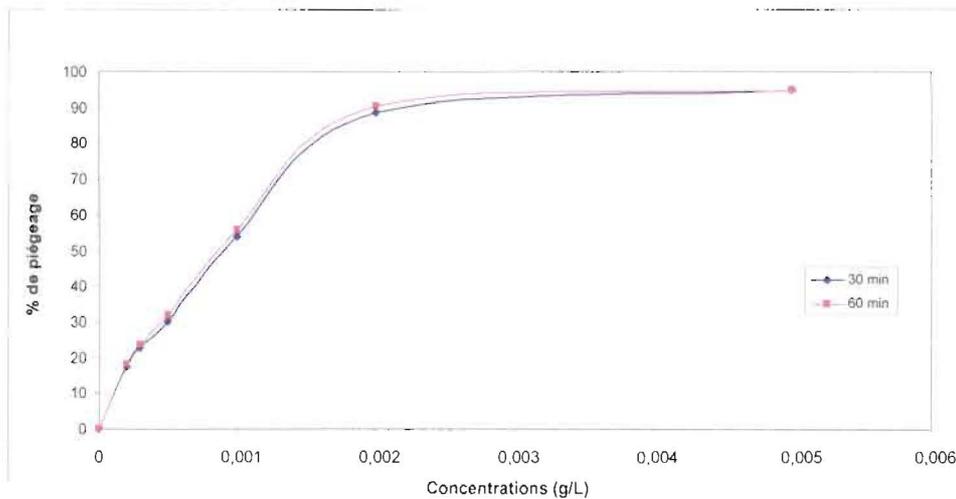
On observe un comportement «cinétique» différent suivant l'antioxydant puisque «l'état stationnaire» c'est-à-dire la «stabilisation de l'absorbance» à sa valeur minimale, pour

une concentration en inhibiteur donnée, est atteint en 30 min pour l'acide gallique, en 60 min pour le BHT, le BHA et l'eugénol puis en 2 heures pour le thymol et le carvacrol.

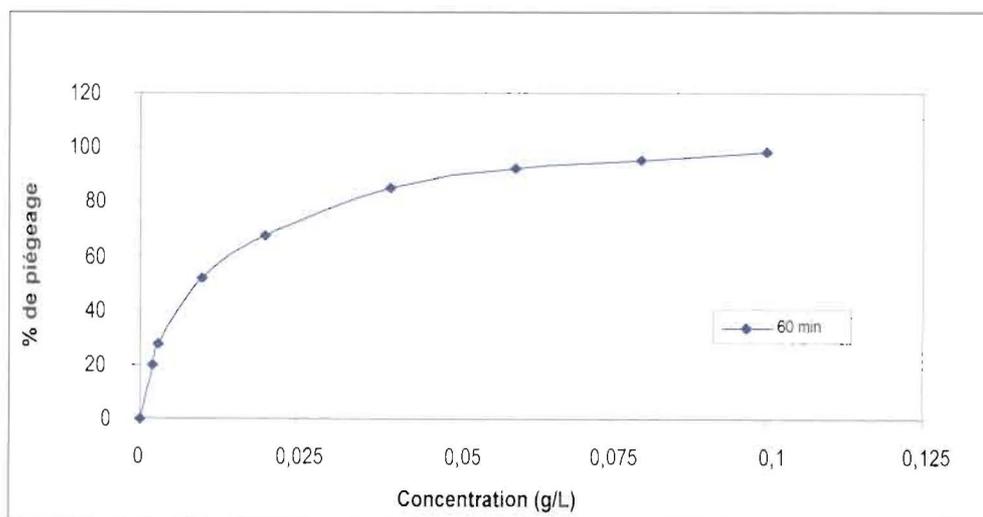
Le temps au bout duquel la mesure est effectuée pour calculer le pourcentage d'inhibition est donc très important et la différence observée sera d'autant plus importante que la réactivité de l'inhibiteur est faible.

Les graphes représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations donnent une bonne idée de la réactivité de l'inhibiteur (figures 25-28).

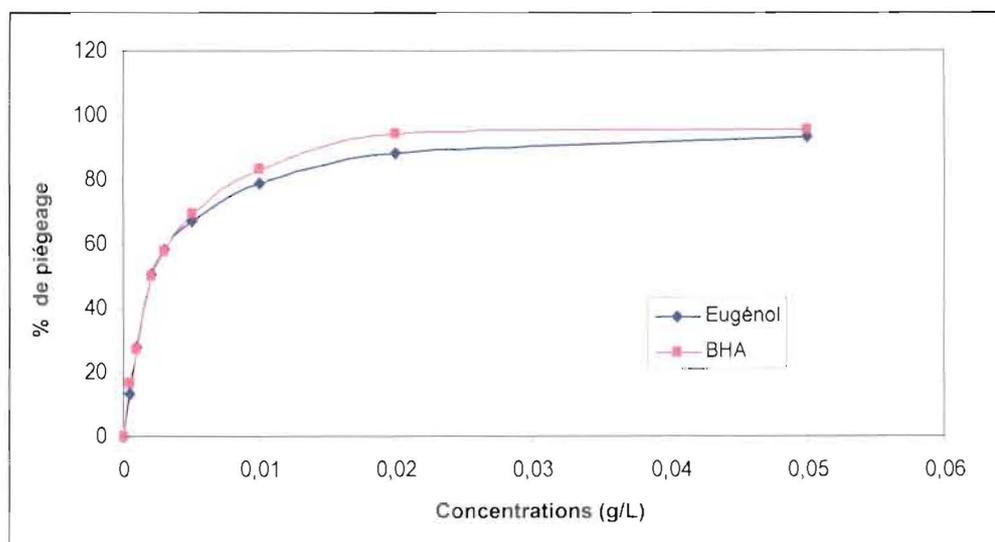
L'écart observé entre 30 min et 60 min est faible pour l'acide gallique (figure 25) et beaucoup plus important pour le BHT (figure 26) ou le thymol (figure 28).



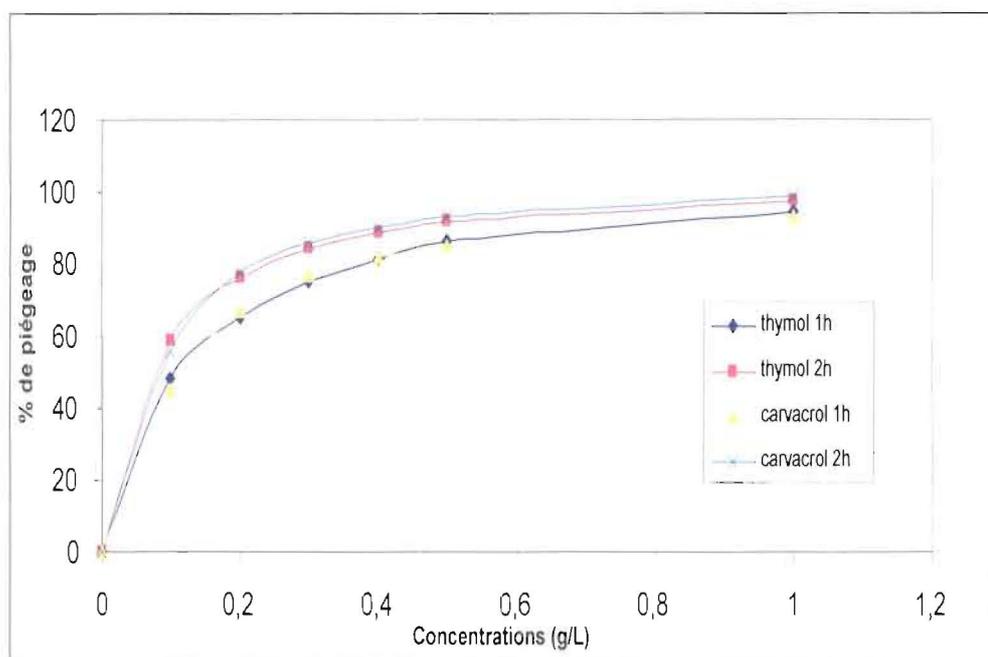
**Figure 25** : Réactivité de l'acide gallique vis à vis du DPPH



**Figure 26** : Réactivité de BHT vis à vis du DPPH



**Figure 27** : Réactivité de l'eugénol et du BHA vis à vis du DPPH



**Figure 28** : Réactivité du thymol et du carvacrol vis à vis du DPPH

Un examen attentif des conditions expérimentales adoptées par les auteurs pour la mesure des propriétés antiradicalaires de leurs échantillons est donc indispensable avant toute analyse comparative (Puertas–Mejia et coll., 2002).

Nous avons choisi d'effectuer toutes nos mesures à 60 min pour une meilleure comparaison de nos échantillons.

L'acide gallique est le plus efficace (figure 25), on trouve une réactivité comparable pour l'eugénol et le BHA (figure 27), tandis que le BHT (figure 26) est légèrement moins efficace. En revanche, l'échelle des concentrations encadrant le  $SC_{50}$  est beaucoup plus élevée (par un facteur de 100) pour les phénols naturels, thymol-carvacrol (figure 28).

La réactivité du BHT s'explique par la stabilisation de l'entité radicalaire obtenue après perte d'un radical hydrogène, par effet inductif +I des substituants du noyau aromatique. Dans le cas du BHA, cette stabilisation est amplifiée par le groupe méthoxy en para du phénol qui interviendra par un effet mésomère donneur, plus important que l'effet inductif. Cet effet mésomère se retrouve dans la structure de l'eugénol, avec le méthoxy en position ortho.

Dans le cas du thymol et du carvacrol, n'entrent en jeu que des effets inductifs +I de faible intensité, ce qui explique leur moindre réactivité.

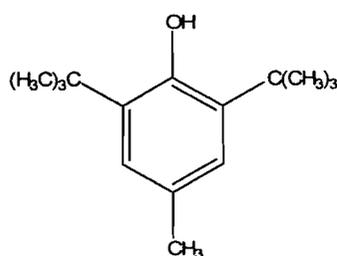
Le cas de l'acide gallique est un peu différent, sa très grande réactivité s'explique par la présence de trois groupes phénols vicinaux.

Les paramètres décrivant l'activité antiradicalaire des référents précédemment présentés sont rassemblés dans le tableau 31.

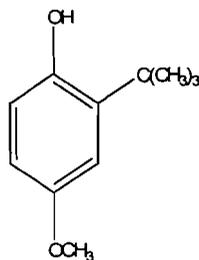
**Tableau 31 : Paramètres antiradicalaires d'inhibiteurs de référence**

Nom des antiradicalaires commerciaux	( $SC_{50}$ ) en mg/L	( $SC_{50}$ ) en g/mole de DPPH	Masse Molaire en g/mol	$CE_{50}$ en mole/mole de DPPH
acide gallique	1.1	11	170.12	0.07
BHA	2.0	21	180.25	0.11
BHT	8.8	99	220.36	0.45
eugénol	1.6	18	164	0.11
thymol	113	$1.2 \times 10^3$	150	7.8
carvacrol	125	$1.3 \times 10^3$	150	8.3

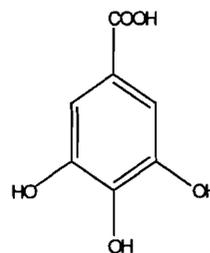
### 1-2-3- Structure de quelques antioxydants phénoliques de références



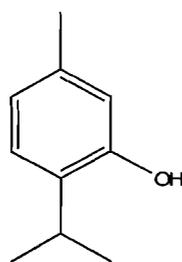
**BHT**



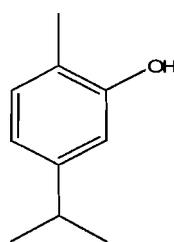
**BHA**



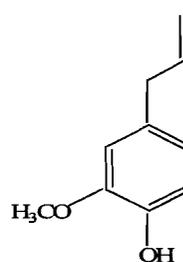
**Acide Gallique**



**Thymol**



**Carvacrol**



**Eugénol**

Les conditions opératoires mises au point avec les inhibiteurs de référence ont donc été transposées aux différents échantillons d'huiles essentielles et les résultats sont donnés dans le paragraphe suivant.

### 1-2-4-Etude des activités antiradicalaires des huiles essentielles

#### 1-2-4-1- Screening des huiles essentielles pures

Les différents échantillons d'huiles essentielles ont tous été testés à une concentration de 5g/L (10 $\mu$ L d'huile essentielle dans 2 mL de solution de DPPH 100 $\mu$ M).

Le pourcentage d'inhibition a été calculé dans tous les cas à partir de la valeur de l'absorbance à 60 min.

Un premier classement a été effectué d'après cette première évaluation: les échantillons conduisant à un pourcentage de piégeage inférieur à 50% ont été considérés comme «faiblement actifs», les autres seront classés comme «moyennement actifs» et «actifs» en fonction des résultats obtenus sur les solutions diluées.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 32.

**Tableau 32 : Screening des échantillons d'huiles essentielles à 5g/L**

Echantillons d'huiles essentielles	% d'Inhibition après 60min
<i>Pimenta racemosa</i> Kouhounou 3 (feuilles)	100
<i>Pimenta racemosa</i> Godomey 2 (feuilles)	100
<i>Pimenta racemosa</i> Kouhounou1 (feuilles)	100
<i>Pimenta racemosa</i> Kouhounou2 (feuilles)	100
<i>Pimenta racemosa</i> Godomey 3 (feuilles)	100
<i>Pimenta racemosa</i> Godomey1 (feuilles)	100
<i>Aeolanthus pubescens</i> Awaya (feuilles)	92.8
<i>Aeolanthus pubescens</i> Togon 2 (feuilles)	95.4
<i>Aeolanthus pubescens</i> Togon1 (feuilles)	89.8
<i>Aeolanthus pubescens</i> Tré (feuilles)	87.8
<i>Ocimum gratissimum</i> cotonou (feuilles)	92.0
<i>Ocimum gratissimum</i> fleur	3.8
<i>Ocimum canum</i> Adja honmè (feuilles)	19.3
<i>Clausena anisata</i> Abomey-calavi (feuilles)	78.0
<i>Clausena anisata</i> Akassato (feuilles)	77.8
<i>Clausena anisata</i> Houin1 (feuilles)	76.4
<i>Clausena anisata</i> Houin 3 (feuilles)	76.8
<i>Clausena anisata</i> Setto (feuilles)	75.1
<i>Cymbopogon nardus</i> d'Abomey-Calavi (feuilles)	77.4
<i>Cymbopogon giganteus</i> Savalou (feuilles)	52.7
<i>Cymbopogon giganteus</i> Setto1 (feuilles)	43.8
<i>Cymbopogon giganteus</i> Setto 2 (feuilles)	40
<i>Chenopodium ambrosoides</i> échan.5 (feuilles)	49.4
<i>Chenopodium ambrosoides</i> cotonou 1 (feuilles)	43.7
<i>Annona squamosa</i> 1 Sikecodji (feuilles)	66.1
<i>Annona muricata</i> 1 Sikecodji (feuilles)	10.1
<i>Monodora myristica</i> (feuilles)	19.3
<i>Xylopi aethiopica</i> (feuilles)	12.1
<i>Lippia multiflora</i> Atchérigbé (feuilles)	25.4
<i>Commiphora africana</i> Savalou (feuilles)	9.7
<i>Pentadesma butyracea</i> (feuilles)	6.2
<i>Pentadesma butyracea</i> (écorces)	8.1

### 1-2-4-2- Huiles essentielles «faiblement actives»

Dans ce groupe, ont été classées les huiles essentielles conduisant à un pourcentage d'inhibition inférieur à 50% pour une concentration à 5g/L.

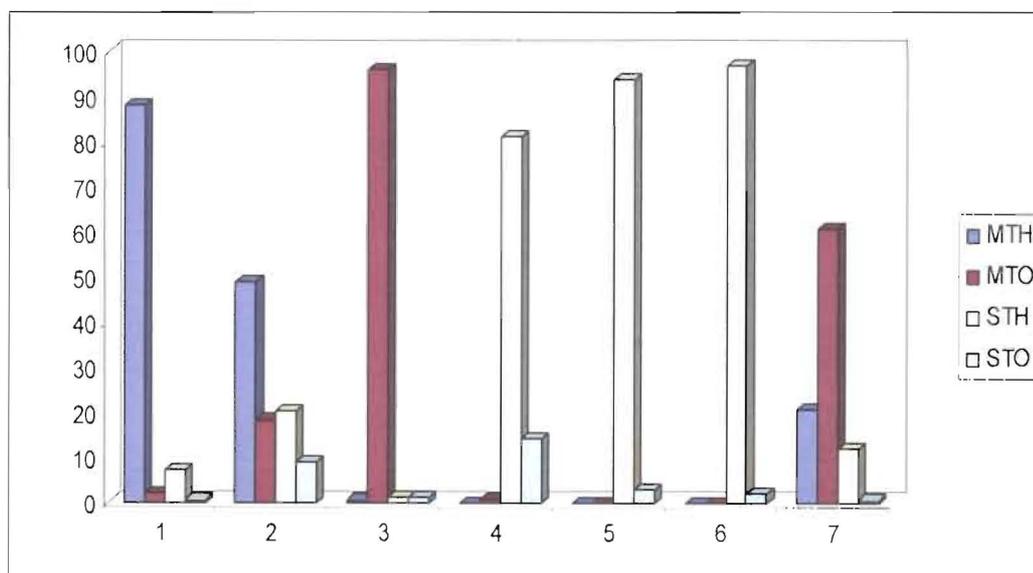
Des solutions plus concentrées (de 5-20g/L) ont donc été évaluées pour tenter de déterminer le SC<sub>50</sub>.

Dans certains cas, les SC<sub>50</sub> n'ont pu être déterminés.

Pour 6 échantillons: *Ocimum gratissimum* (fleur), *Ocimum canum*, *Pentadesma butyracea* (feuilles et écorces), *Xylopi aethiopica*, *Monodora myristica* et *Annona muricata* l'augmentation de la concentration en huile essentielle n'affecte pas de façon significative le pourcentage de piégeage du DPPH. On peut donc les considérer comme «inactifs».

Il s'agit dans tous les cas de compositions riches en mono et/ou sesquiterpènes hydrocarbonés, ce qui explique facilement cette faible activité (sauf l'échantillon d'*O. gratissimum* fleur qui est riche en monoterpènes oxygénés).

Cette caractéristique chimique commune est clairement illustrée par la figure 29



- 1= *Monodora myristica*
- 2=*Xylopi aethiopica*
- 3=*Ocimum gratissimum* fleur
- 4=*Annona muricata*
- 5=*Pentadesma butyracea* feuilles
- 6=*Pentadesma butyracea* écorces
- 7=*Ocimum canum*

**MTH = Monoterpènes hydrocarbonés**  
**MTO = Monoterpènes oxygénés**  
**STH = Sesquiterpènes hydrocarbonés**  
**STO = Sesquiterpènes oxygénés**

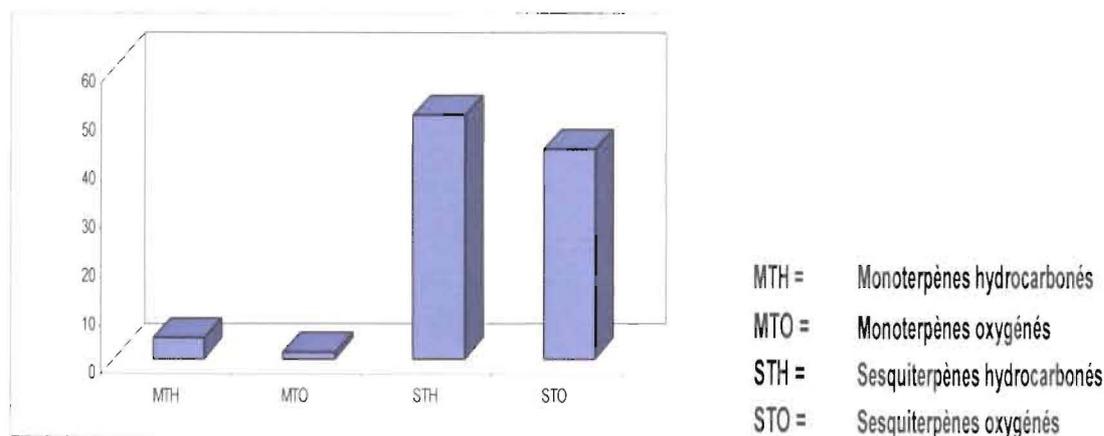
**Figure 29** : Répartition des terpénoïdes dans les échantillons classés « inactifs ».

Dans deux autres cas (*Lippia multiflora* et *Commiphora africana*) seuls les SC<sub>25</sub> et SC<sub>20</sub> ont pu être déterminés. On peut donc considérer ces échantillons comme «très faiblement actifs».

#### ➤ Huile essentielle de *Commiphora africana*

Les mesures effectuées avec l'huile essentielle de *Commiphora africana* ont permis d'évaluer un SC<sub>25</sub> à 23g/L; le pouvoir antiradicalaire est donc très faible puisque cette valeur est plus de 5000 fois supérieure au SC<sub>50</sub> du BHT (8.8mg/L).

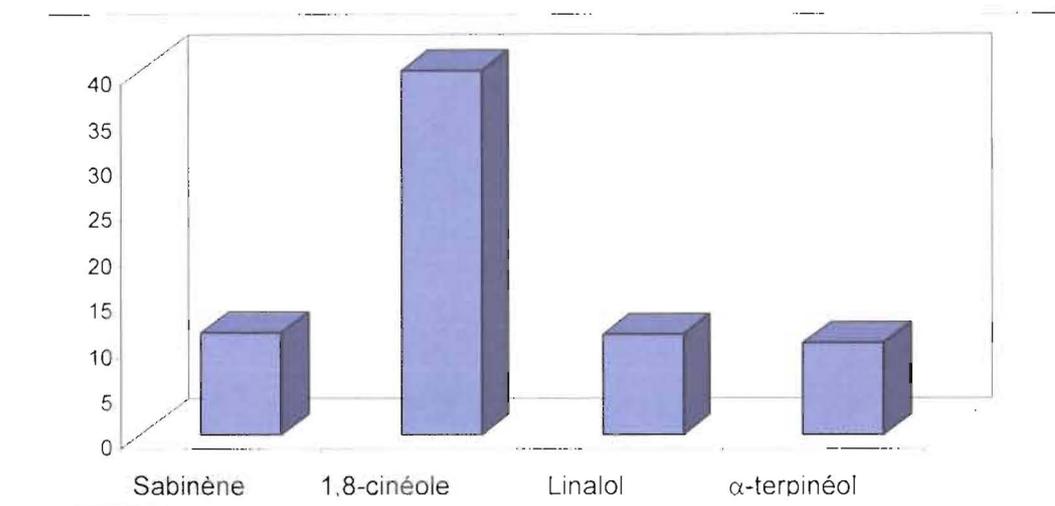
Ce résultat n'est pas surprenant compte tenu de la composition chimique exclusivement terpénique de l'huile essentielle, dominée par des sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés à squelette bisabolane (figure 9)



**Figure 9** : Répartition des terpénoïdes dans l'huile essentielle des feuilles de *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl.

#### ➤ Huile essentielle de *Lippia multiflora*

De la même manière, l'huile essentielle de *Lippia multiflora* a un SC<sub>20</sub> évaluée à 7g/L, témoignant également d'un très faible potentiel antiradicalaire.



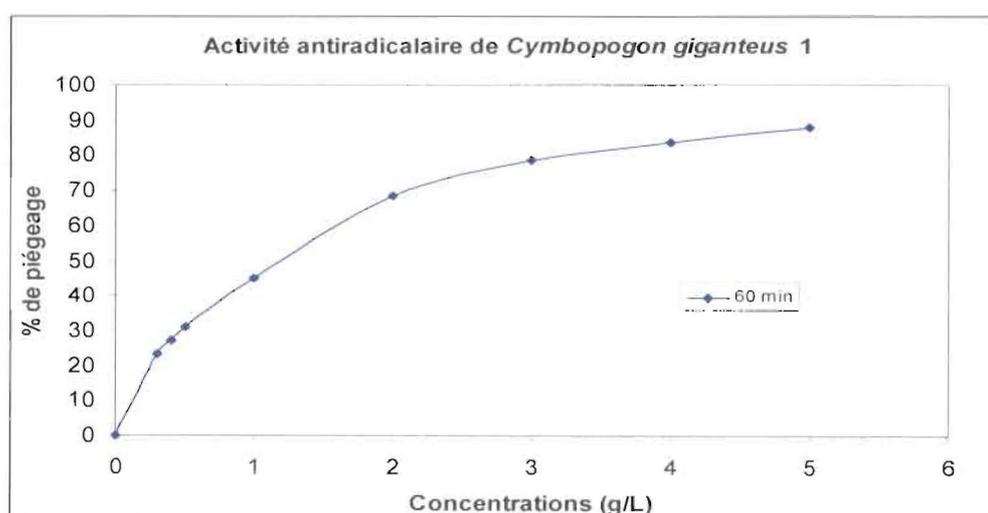
**Figure 24** : Répartition des composés majoritaires dans l'huile essentielle de *Lippia multiflora* Moldenke (feuilles)

Ce résultat est compatible avec la composition chimique exclusivement terpénique de l'huile essentielle, dominée par des constituants représentant plus de 70% du mélange: deux composés à squelette p-menthane le (1,8-cinéole, et l'α-terpinéol) un monoterpène hydrocarboné bicyclique le sabinène et un dérivé acyclique le linalol.

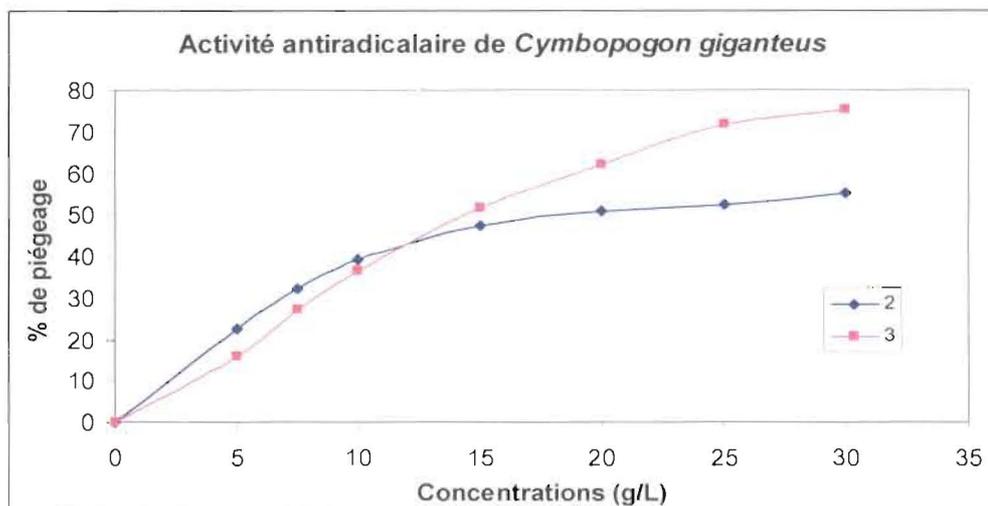
Pour les échantillons de *Cymbopogon giganteus* et de *Chenopodium ambosioides*, une augmentation de la concentration en huile essentielle a permis de déterminer leur SC<sub>50</sub>.

➤ **Echantillons d'huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus*.**

Les trois échantillons d'huiles essentielles des feuilles de *Cymbopogon giganteus* ont été testés à des concentrations variant entre 5 et 30g/L (figures 30 et 31).



**Figure 30** : Réactivité de l'échantillon 1 de *Cymbopogon giganteus* vis à vis du DPPH

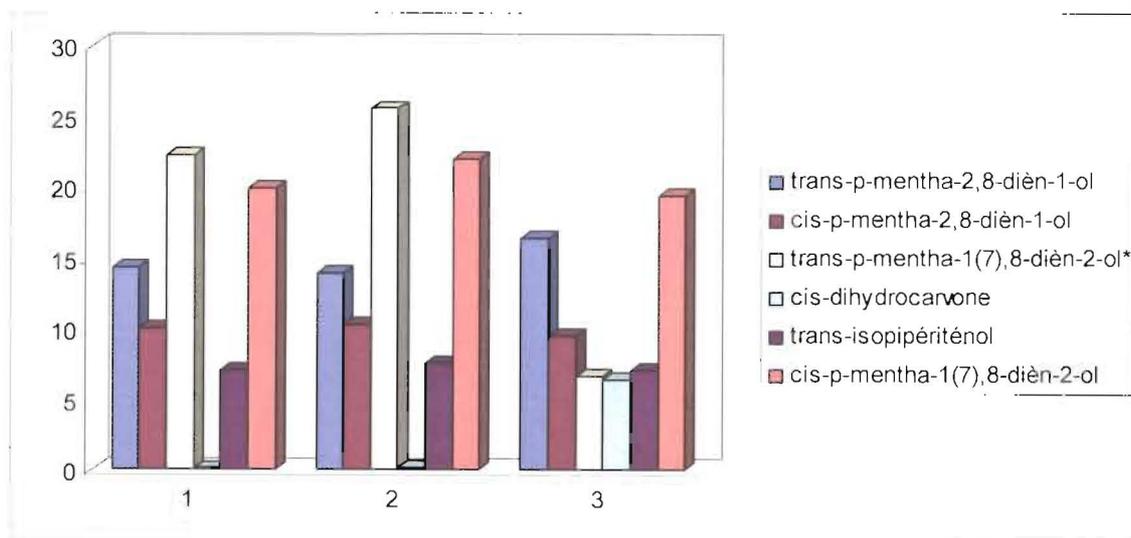


**Figure 31** : Réactivité des échantillons 2 et 3 de *Cymbopogon giganteus* vis à vis du DPPH

On observe une activité faible avec des  $SC_{50}$  compris entre 1.2g/L, et 19g/L.

Les deux échantillons de Setto ont des réactivités comparables avec des  $SC_{50}$  de 15g/L et 19g/L respectivement.

Les différences de réactivité observées ne peuvent pas directement être expliquées au vu des compositions chimiques, qui sont très similaires, dominées par des monoterpènes oxygénés à squelette p-menthane.



**Figure 21** : Répartition des composés majoritaires dans les échantillons d'huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* Chiov. (feuilles)

1 = Récoltées à Savalou le 02/01/04;

2 = Récoltées à Setto le 13/01/04 (Setto1)

3 = Récoltées à Setto 10/08/04 (Setto2)

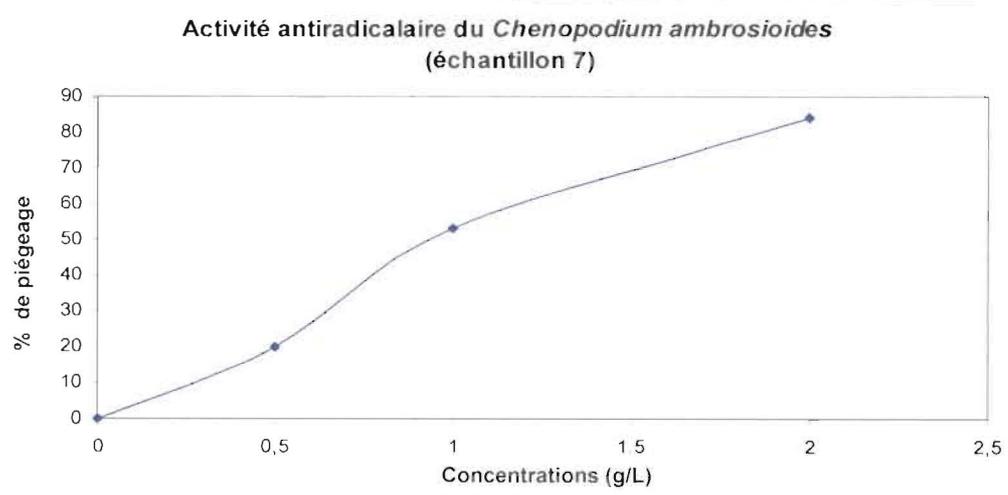
Seul l'échantillon de Setto 2 se distingue par un taux élevé de *cis*-dihydrocarvone et une faible teneur en *trans*-p-mentha-1(7),8-diène-2-ol, mais néanmoins sa réactivité est très proche de celle de Setto 1.

En résumé, l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* présente une très faible activité antiradicalaire, ce qui exclut l'utilisation de cette huile essentielle pour une utilisation dans ce domaine.

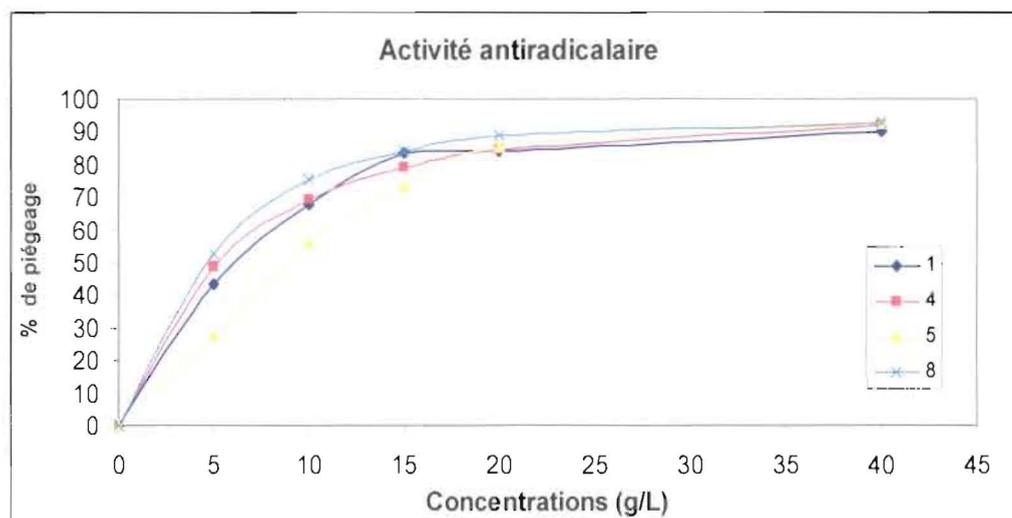
### ➤ *Chenopodium ambrosioides*

Cinq échantillons d'huiles essentielles ont été testés pour leurs propriétés antiradicalaires.

Les résultats ayant servi à la détermination des  $SC_{50}$  des différents échantillons sont rassemblés dans les figures 32, 33 et le tableau 34.



**Figure 32** : Réactivité de l'échantillon 7 de *Chenopodium ambrosioides* vis à vis du DPPH



**Figure 33** : Réactivité des échantillons 1, 4, 5 et 8 de *Chenopodium ambrosioides* vis à vis du DPPH

**Tableau 34** : Potentiel antiradicalaire des échantillons d'huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides*

<i>Chenopodium ambrosioides</i>	SC <sub>50</sub> en g/L	SC <sub>50</sub> en g/mol de DPPH
1	6.0	5.7x10 <sup>4</sup>
4	5.2	5.0x10 <sup>3</sup>
5	8.6	8.0x10 <sup>4</sup>
7	0.9	8.4x10 <sup>3</sup>
8	4.7	4.3x10 <sup>4</sup>

Le pouvoir antiradicalaire est relativement faible pour quatre échantillons puisque le SC<sub>50</sub> est compris entre 4.7 et 8.6g/L (soit une activité antiradicalaire environ 1000 fois plus faible que celle du BHT).

L'échantillon 7 est plus actif (SC<sub>50</sub> = 0.9 g/L) bien que sa composition chimique soit comparable aux autres pour les grands composés ; on notera cependant que cet échantillon est de couleur noire, probablement en raison d'une surchauffe en cours d'hydrodistillation.

Cet échantillon a été redistillé pour tester l'influence de la durée de distillation sur la composition chimique et plus particulièrement sur la teneur en ascaridole. Les résultats de cette expérience ont été discutés dans le chapitre précédent. Les différentes fractions de

distillation ont également été testées pour «contrôler» la réactivité de cet échantillon. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 35.

**Tableau 35** : Concentration chimique et activité antiradicalaire de l'huile essentielle de l'échantillon 7 *Chenopodium ambrosioides* fractionnée par hydrodistillation.

HE		Nom des composés	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5
% Dist	% FID						
39,9	37,7	$\alpha$ -terpinene	49.1	4.0	1.3	0.1	0.2
30,7	30,2	p-cymene	37.2	8.1	4.0	0.4	1.5
0,7	0,6	limonene	0.8				
1,3	0,9	$\gamma$ -terpinene	1.2	2.1	2.5	1.9	0.9
3,7	0,5	p-cymenene	3.9	4.4	3.6	1.7	2.6
4,2	1,0	p-cymen-8-ol	1.7	20.9	15.6	13.3	11.4
1,6	1,3	$\alpha$ -terpineol	1.2	7.2	3.7	2.1	1.9
0,2	0,1	isoascaridole I		0.6	0.8	1.0	0.9
0,3	8,2	ascaridole		0.9	1.2	1.8	1.8
0,4	0,8	carvenone oxide II	0.2	2.5	1.6	0.9	
0,3	0,6	ascaridole diol I	0.1	1.4	1.0	0.9	0.6
0,2	1,0	ascaridole diol II		0.5	0.8	1.0	0.6
0,2	0,2	thymol		1.4	1.7		0.7
0,3	0,2	carvacrol		0.6	1.2	1.3	2.0
3,2	2,9	isoascaridole II		8.8	12.4	15.5	28.7
0,3	0,4	perillaldéhyde		1.0	1.3	1.5	1.4
2,3	1,8	$\beta$ -caryophyllene	0.8	6.3	3.4	2.0	23,00
SC <sub>50</sub> en g/L			7.8	3.3	3.3	3.8	3.8
SC <sub>50</sub> en g/mol			7.9x10 <sup>4</sup>	3.1x10 <sup>4</sup>	3.1x10 <sup>4</sup>	3.6x10 <sup>4</sup>	3.6x10 <sup>4</sup>

Aucune des 5 fractions testées n'est aussi efficace que l'huile essentielle. En revanche, on retrouve pour les différentes fractions des réactivités comparables à celle des autres échantillons d'huiles essentielles.

On notera que la fraction la moins active est la fraction 1, constituée majoritairement de composés hydrocarbonés, ce qui rejoint nos observations précédentes sur les caractéristiques chimiques des huiles essentielle «faiblement actives».

Ce résultat montre donc que l'échantillon 7 de couleur noire, contenait probablement des produits de dégradation, éliminés au cours de la «redistillation», probablement responsables de l'activité antiradicalaire «anormalement élevée» observée pour l'huile essentielle.

Il indique également que les conditions d'obtention d'une huile essentielle sont susceptibles d'avoir une influence sur ses propriétés antiradicalaires qui doivent être vérifiées sur plusieurs échantillons.

Les résultats obtenus pour les activités antiradicalaires de ces échantillons d'huiles essentielles «faiblement actives» sont rassemblés dans le **Tableau 33** ci-dessous.

**Tableau 33 : Pouvoir antiradicalaire des huiles essentielles «faiblement actives»**

Nom des plantes	SC <sub>50</sub> en g/L	SC <sub>50</sub> en g/mol de DPPH
<i>Annona muricata</i>	-	-
<i>Chenopodium. ambrosoides</i> 1	6.0	5.7x10 <sup>4</sup>
<i>Chenopodium. ambrosoides</i> 4	5.2	5.0x10 <sup>3</sup>
<i>Chenopodium ambrosoides</i> échantillon 5	8.6	8.0x10 <sup>4</sup>
<i>Chenopodium. ambrosoides</i> 7	0.9	8.4x10 <sup>3</sup>
<i>Chenopodium ambrosoides</i> échantillon 8 (extrait au pentane)	4.7	4.3x10 <sup>4</sup>
1	1.2	1.1x10 <sup>4</sup>
<i>Cymbopogon giganteus</i> 2	19.0	1.8x10 <sup>5</sup>
3	15.0	1.3x10 <sup>5</sup>
<i>Monodora myristica</i>	15.0	1.3x10 <sup>5</sup>
<i>Ocimum canum</i> Adja honmè	16.3	1.6x10 <sup>5</sup>
<i>Ocimum gratissimum</i> fleur	-	-
<i>Pentadesma butyracea</i> (feuilles)	-	-
<i>Pentadesma butyracea</i> (écorces)	-	-
<i>Xylopi aethiopica</i>	15.0	1.3x10 <sup>5</sup>

#### 1-2-4-3- Huiles essentielles «moyennement actives»

Nous avons classé «moyennement actives» les échantillons d'huiles essentielles donnant un pourcentage de piégeage du DPPH compris entre 50 et 80% pendant le screening (c'est-à-dire à une concentration de 5g/L).

**1-2-4-3-1- Echantillons d'huiles essentielles de *Clausena anisata***

Les composés majoritaires des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des feuilles de *Clausena anisata* récoltées dans différentes régions du Bénin mais également à différentes périodes de récolte pour l'espèce botanique de la région de Houin sont repris dans les tableaux 36 et 37.

**Tableau 36: Principaux constituants et activités antiradicalaires des huiles essentielles de feuilles de *Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook. ex. Benth. d'origines différentes**

Nom des composés	*IR	1	2	3	4
1,8-cinéole	1031	2.3	0.1	0.1	0.1
linalol	1091	0.3	0.4	0.4	0.2
terpinèn-4-ol	1175	-	0.1	0.9	-
<b>méthyl chavicol</b>	<b>1193</b>	<b>66.2</b>	<b>78.7</b>	<b>61.1</b>	<b>93.6</b>
<b>(E)-anéthol</b>	<b>1279</b>	<b>17.6</b>	<b>7.7</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>
4-vinyl-2-methoxyphénol	1302	-	0.3	0.5	0.1
$\beta$ -caryophyllène	1441	2.1	1.6	5.9	0.3
$\alpha$ -humulène	1475	0.6	1.5	6.4	0.3
germacrène D	1499	1.0	0.2	9.3	0.1
SC <sub>50</sub> (g/L)		1.70	0.60	0.37	3.30
SC <sub>50</sub> (g/mole)		1.2x10 <sup>4</sup>	6.7x10 <sup>3</sup>	3.9x10 <sup>3</sup>	3.2x10 <sup>4</sup>

1= Récoltées à Akassato le 07/10/02 (Pourcentages relatifs)

2= Récoltées à Akassato le 27/11/03 (Pourcentages relatifs).

3= Récoltées à Abomey-Calavi le 20/12/03 (Pourcentages relatifs).

4= Récoltées à Setto le 13/01/04 (Pourcentages relatifs)

\*IR sur une colonne DB1

**Tableau 37: Principaux constituants et activités antiradicalaires des huiles essentielles de feuilles de *Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook ex. Benth. récoltées à différentes périodes à Houin.**

Nom des composés	*IR	5(%)	6(%)	7(%)	8(%)
$\alpha$ -pinène	939	17.1	20.1	10.7	3.2
sabinène	975	6.4	6.0	7.4	1.1
(Z)- $\beta$ -ocimène	1037	10.3	11.1	6.1	1.5
(E)- $\beta$ -ocimène	1043	8.0	6.3	4.7	1.2
linalol	1091	1.4	1.2	0.9	-
terpinèn-4-ol	1174	1.3	0.8	1.8	-
méthyl chavicol	1193	1.0	-	30.5	64.1
4-vinyl-2-méthoxyphénol	1303	0.5	-	0.4	0.9
$\beta$ -caryophyllène	1441	12.2	12.8	9.7	8.6
$\alpha$ -humulène	1475	14.8	15.2	11.8	8.3
germacrène D	1499	5.5	8.5	4.3	3.1
SC <sub>50</sub> (g/L)		0.87	-	0.80	0.38
SC <sub>50</sub> (g/mole)		8.4x10 <sup>3</sup>	-	7.8x10 <sup>3</sup>	3.6x10 <sup>3</sup>

5 = Récoltées à Houin le 27/12/03 ; 6 = Récoltées à Houin le 18/04/04

7 = Récoltées à Houin le 26/09/04 ; 8 = Récoltées à Houin le 31/08/05

\*IR sur une colonne DB1

Sept d'entre eux ont été testés vis-à-vis du DPPH et les résultats de ces évaluations sont donnés dans les tableaux précédemment cités.

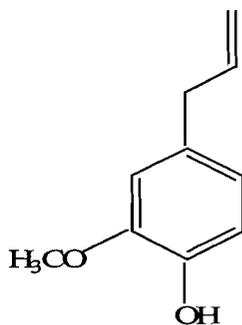
minoritaires sont responsables de l'activité observée. Le 2-méthoxy-4-vinylphénol, porteur d'un groupement phénol, participe probablement à cette activité. On observe en effet que les deux échantillons les moins actifs (1 et 4, tableau 34) possèdent le plus faible taux de ce composé.

De la même manière, pour les échantillons récoltés à Houin, l'échantillon le plus actif (échantillon 8) contient près de 1% de ce composé.

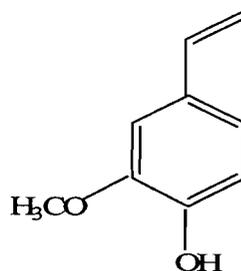
On notera cependant que si ce composé est le seul impliqué dans l'activité de ces échantillons, cela suppose qu'il soit très réactif vis-à-vis du DPPH.

Un  $SC_{50}$  de 0.38g/L pour l'échantillon 8 par exemple, qui contient environ 1% de 2-méthoxy-4-vinylphénol, le 2-méthoxy-4-vinylphénol devrait avoir à un  $SC_{50}$  de 3.8mg/L, soit une activité antiradicalaire bien meilleure que celle du BHT.

Ce résultat n'est pas surprenant quant on sait que l'eugénol, son homologue supérieur, se caractérise par un  $SC_{50}$  de 1.6mg/L.



Eugénol

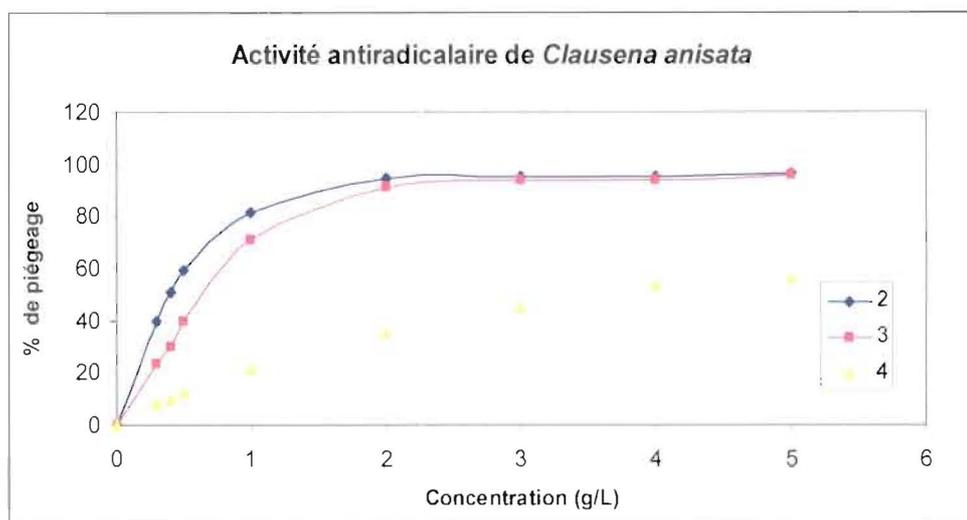


2-méthoxy-4-vinyl phénol

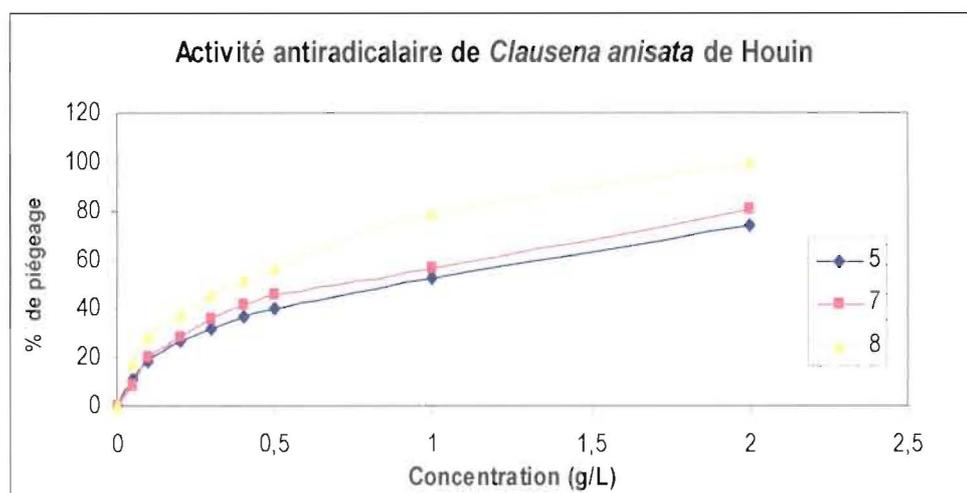
Il serait intéressant de tester les potentialités antiradicalaires de 2-méthoxy-4-vinylphénol vis à vis du DPPH pour conforter notre argumentation.

#### 1-2-4-3-2-Huile essentielle de *Cymbopogon nardus*

Les résultats de notre étude de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sont représentés sur la figure 36.



**Figure 34** : Réactivité des échantillons 2, 3 et 4 de *Clausena anisata* vis à vis du DPPH

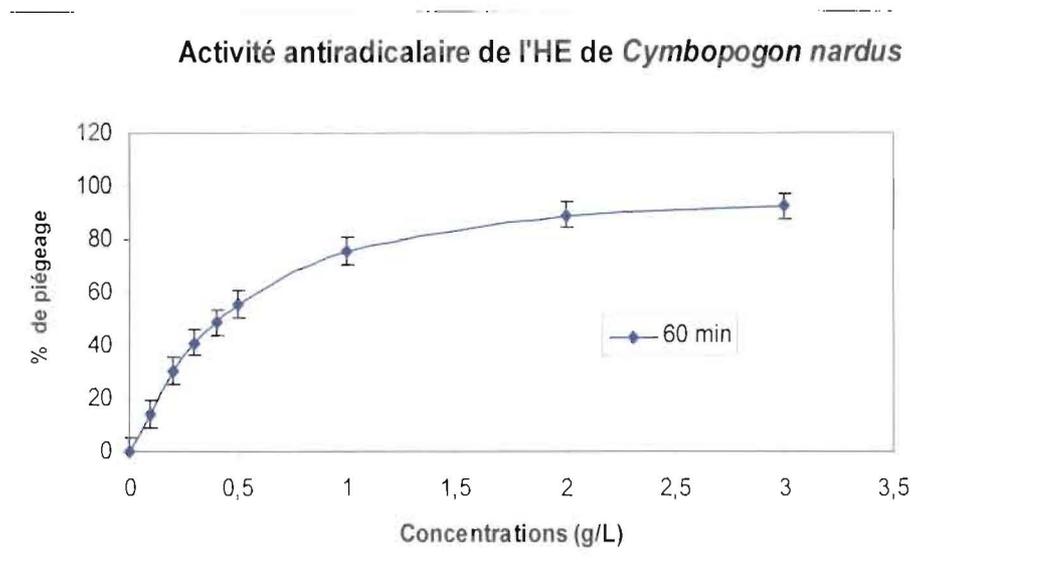


**Figure 35** : Réactivité des échantillons 5, 7 et 8 de *Clausena anisata* récoltés à Houin vis à vis du DPPH

Le  $SC_{50}$  varie entre 0.37g/L pour l'échantillon le plus actif (celui d'Abomey-Calavi) et 3.3g/L pour celui le moins actif (échantillon de Setto) soit un facteur de 10 entre les deux.

Parallèlement à ces mesures, nous avons testé l'activité antiradicalaire du méthyl chavicol qui est majoritaire dans un grand nombre d'échantillons (à l'exception des échantillons 5 et 6).

Les résultats obtenus indiquent une activité quasiment nulle, puisque pour une concentration de 50g/L en méthyl chavicol on obtient un pourcentage de piégeage de l'ordre de 20%, ce qui est très faible; ce résultat n'est pas surprenant compte tenu de sa structure chimique (absence de groupement phénol). On peut donc supposer que d'autres composés



**Figure 36 :** Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus*

La détermination graphique du  $SC_{50}$ , 0.42g/L, est comparable à celle de l'échantillon le plus actif de *Clausena anisata* (échantillon 8).

Les constituants majoritaires de cet échantillon (monoterpènes oxygénés acycliques) ne justifient pas cette activité (tableau 38). En revanche, on trouve un taux de 1% d'eugénol, tout a fait en accord avec l'activité observée, si l'on applique le même raisonnement que celui précédemment suivi pour *Clausena anisata*.

**Tableau 38 :** Constituants majeurs et activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* (Linn) Rendle

Nom des composés	*IR	%
<b>citronellal</b>	<b>1146</b>	<b>25.1</b>
isopulégone	1157	0.4
<b>citronellol</b>	<b>1220</b>	<b>10.6</b>
<b>géraniol</b>	<b>1254</b>	<b>29.4</b>
eugénol	1345	1.0
<b>élémol</b>	<b>1561</b>	<b>6.0</b>
$SC_{50}$ (g/L)		<b>0.42</b>
$SC_{50}$ (g/mole)		<b><math>3.9 \times 10^3</math></b>

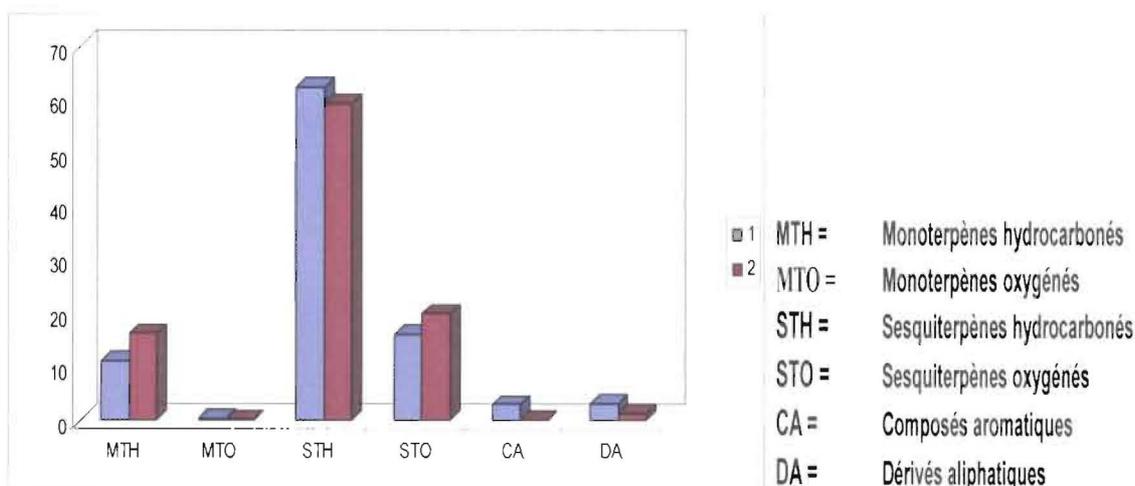
### 1-2-4-3-3-Huile essentielle d'*Annona squamosa*

On obtient lors du screening un pourcentage de 66% pour une concentration de 5g/L pour l'échantillon 1 huile essentielle d'*Annona Squamosa* récolté à Sikecodji.

Le SC<sub>50</sub> voisin de 5g/L, correspond donc à une activité plus de 500 fois plus faible que celle du BHT.

On retrouve pour cette huile essentielle, une composition chimique dominée par les structures terpéniques hydrocarbonées, comme pour les échantillons classés précédemment «faiblement actifs».

L'activité observée, pourrait être due à la présence d'un (ou plusieurs) constituants minoritaires (peut être non identifiés) dans l'huile essentielle.



**Figure 6 :** Répartition des constituants dans les échantillons d'huiles essentielles des feuilles d'*Annona squamosa* L

L'ensemble des résultats obtenus pour les huiles essentielles classées «moyennement actives» sont rassemblés dans le tableau 39.

**Tableau 39 : Pouvoir antiradicalaire des échantillons d'huiles essentielles classées «moyennement actives»**

Nom des plantes		SC <sub>50</sub> (g/L)	SC <sub>50</sub> (g/mole)
<i>Annona squamosa</i> (1)		5	5.0x10 <sup>4</sup>
	1	1.70	1.2x10 <sup>4</sup>
	2	0.60	6.7x10 <sup>3</sup>
	3	0.37	3.9x10 <sup>3</sup>
<i>Clausena anisata</i>	4	3.30	3.6x10 <sup>3</sup>
	5	0.87	8.4x10 <sup>3</sup>
	7	0.80	7.8x10 <sup>3</sup>
	8	0.38	3.6x10 <sup>3</sup>
<i>Cymbopogon nardus</i>		0.42	3.9x10 <sup>3</sup>

#### 1-2-4-4- Huiles essentielles «très actives»

Les échantillons d'huiles essentielles «très actives» sont celles donnant un pourcentage de piégeage supérieur ou égal à 80% pendant le screening (c'est-à-dire pour une concentration de 5g/L). Il s'agit des échantillons d'huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens*, d'*Ocimum gratissimum* (feuilles) et de *Pimenta racemosa*.

Les résultats obtenus après dilution des échantillons sont rassemblés dans le tableau ci-après.

**Tableau 40 : Activité antiradicalaire des huiles essentielles très actives vis-à-vis du DPPH.**

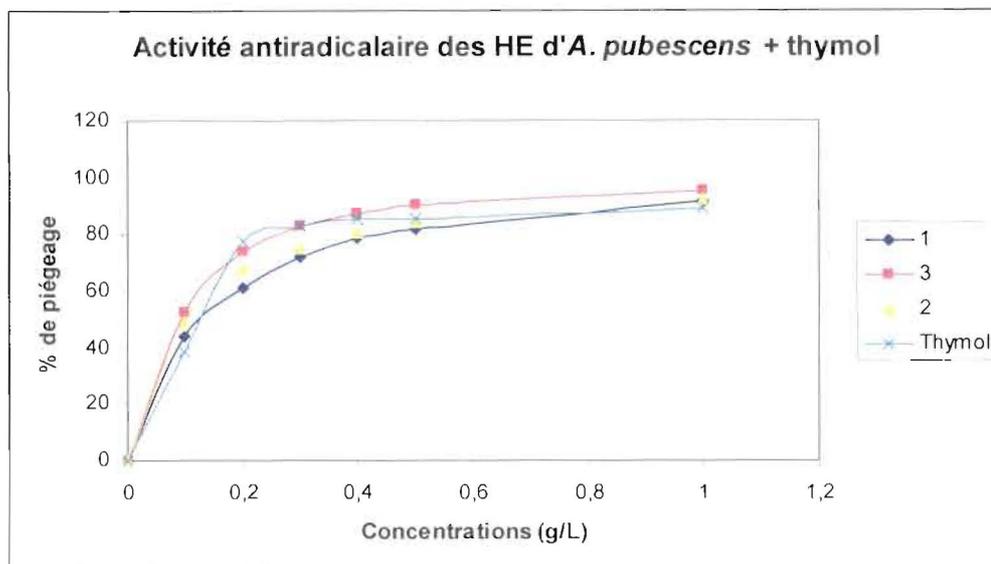
Nom des HE actives	SC <sub>50</sub> (mg/L)	SC <sub>50</sub> (g/mol de DPPH)
<i>Aeolanthus pubescens</i> 1	126	1314
<i>Aeolanthus pubescens</i> 2	106	1199
<i>Aeolanthus pubescens</i> 3	94	1074
<i>Aeolanthus pubescens</i> 4	160	1553
<i>Pimenta racemosa</i> 1	1.27	14.0
<i>Pimenta racemosa</i> 2	1.40	15.0
<i>Pimenta racemosa</i> 3	1.60	16.9
<i>Pimenta racemosa</i> 4	1.85	21.0
<i>Pimenta racemosa</i> 5	1.71	19.5
<i>Pimenta racemosa</i> 6	1.88	18.4
<i>Ocimum gratissimum</i> (feuilles)	132	1132

**1-2-4-4-1- Huile essentielle d'*Aeolanthus pubescens***

Les quatre échantillons d'*Aeolanthus pubescens* récoltés respectivement à Togon, Tré et Awaya ont été testés entre 0.1 et 1g/L. Trois d'entre eux sont riches en thymol (échantillons 1, 2, 3) le quatrième dominé par le carvacrol.

➤ ***Aeolanthus pubescens* : «chénotype à thymol»**

Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 37, avec ceux du thymol qui représente le composé majoritaire de ces échantillons.

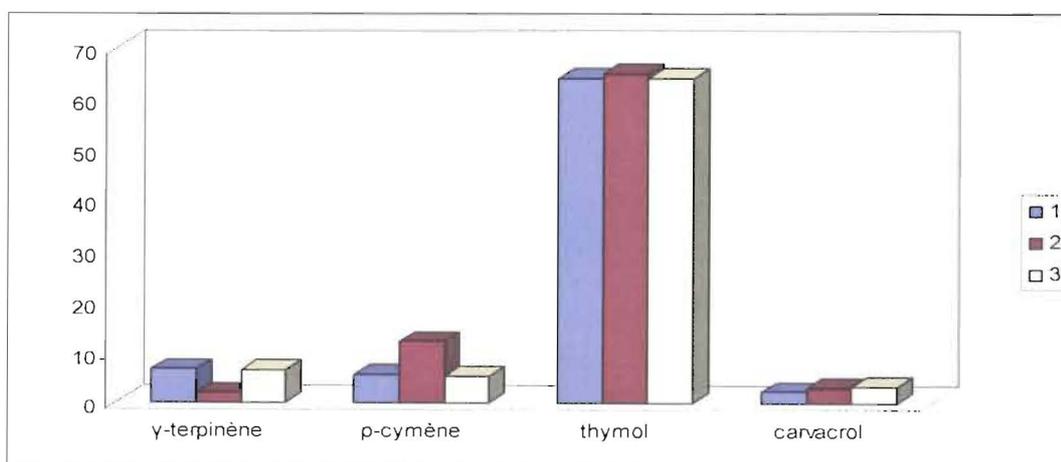


**Figure 37 :** Réactivité des échantillons 1, 2 et 3 des huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens* et du thymol vis à vis du DPPH

On obtient pour les échantillons 2 et 3 un  $SC_{50}$  inférieur à celui du thymol (respectivement 106 et 94 mg/L contre 113mg/L pour le thymol).

L'échantillon 1 est un peu moins actif avec un  $SC_{50}$  de 126mg/L.

L'organigramme de la figure 16, représente les teneurs respectives des principaux constituants dans les échantillons 1-3. On constate que, dans tout les cas, l'activité antiradicalaire observée est meilleure que celle attendue sur la base du pourcentage en thymol, qui est compris entre 63.8 et 64.7%.



**Figure 16:** Répartition des composés majoritaires dans les échantillons d'huile essentielle d'*Aeolanthus pubescens* Benth (feuilles) pour le « chémotype à thymol ».

Ce résultat pourrait s'expliquer par une potentialisation de leur activité par d'autres composés, peut être minoritaires, présents dans l'huile essentielle.

Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en procédant à l'extraction en milieu basique des composés phénoliques de l'échantillon 1 récolté à Togon.

L'huile essentielle mise en solution dans l'éther a été traitée par une solution aqueuse de NaOH 1M.

La phase organique obtenue après 3 premiers «lavages basiques» (fraction neutre F1) contenait encore 10% de composés phénoliques (tableau 41), une partie a été traitée à nouveau à la soude pour conduire à la fraction F'1, dont l'analyse chimique a montré qu'elle ne contenait plus que 1% de phénols. L'ensemble des phases aqueuses basiques a été acidifié par une solution d'acide chlorhydrique et extraite à l'éther. Après évaporation du solvant, l'analyse chimique montre que cette fraction F2 est presque exclusivement constituée de composés phénoliques.

**Tableau 41 : Résultats du fractionnement de l'huile essentielle d'*Aeolanthus pubescens* 1 (Togon; Dassa-Zoumé) par extraction en milieu basique.**

Nom des composés	*IR	I(%)	F1(%)	F'1(%)	F2(%)
$\alpha$ -thujène	930	1.4	1.8	1.6	-
$\alpha$ -pinène	939	0.5	0.7	0.6	-
camphène	954	0.1	0.1	-	-
$\beta$ -pinène	981	0.1	0.2	-	-
<b>myrcène</b>	<b>987</b>	<b>1.5</b>	<b>3.0</b>	<b>3.3</b>	-
$\alpha$ -phellandrène	1006	0.2	-	-	-
$\alpha$ -terpinène	1018	2	0.2	0.3	-
<b>p-cymène</b>	<b>1023</b>	<b>5.5</b>	<b>18.1</b>	<b>20.5</b>	-
limonène	1031	0.6	1.3	1.4	-
(E)- $\beta$ -ocimène	1042	0.1	-	-	-
<b><math>\gamma</math>-terpinène</b>	<b>1060</b>	<b>6.6</b>	<b>11.8</b>	<b>13.6</b>	-
p-cyménène	1084	0.2	0.5	0.6	-
terpinolène	1089	0.1	0.3	0.4	-
bornéol	1152	0.1	0.4	0.5	-
terpinèn-4-ol	1178	1.8	5.0	5.9	-
<b>thymol</b>	<b>1298</b>	<b>63.8</b>	<b>13.6</b>	<b>1.1</b>	<b>96.6</b>
carvacrol	1303	2.1	-	-	2.9
<b>acétate de thymyle</b>	<b>1346</b>	<b>10.2</b>	<b>32.5</b>	<b>37.8</b>	<b>0.1</b>
acétate de terpinyle	1352	0.1	-	-	-
acétate de carvacryle	1360	0.7	1.2	2.2	-
$\beta$ -caryophyllène	1439	0.2	0.6	0.7	-
$\gamma$ -gurjunène	1473	0.1	0.2	0.2	-
(Z)- $\alpha$ -bisabolène	1503	0.7	2.1	2.5	-
$\beta$ -bisabolène	1514	0.7	2.3	2.7	-
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>18.9</b>	<b>38</b>	<b>42.3</b>	<b>-</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>78.8</b>	<b>52.7</b>	<b>47.5</b>	<b>99.6</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>1.7</b>	<b>5.2</b>	<b>6.1</b>	<b>-</b>
<b>Total</b>		<b>99.4</b>	<b>95.9</b>	<b>95.9</b>	<b>99.6</b>

I= Récolté à Togon le 28/06/03

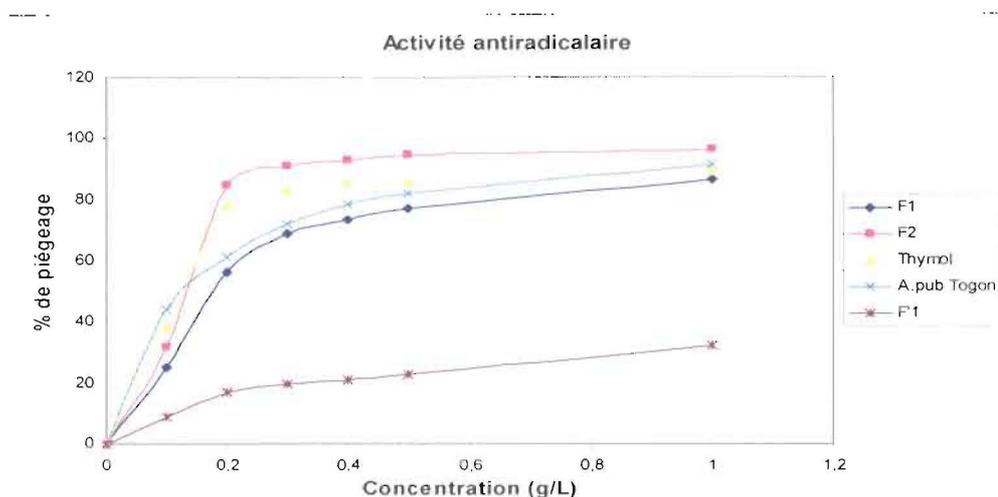
F1 = Fraction neutre

F'1 = Fraction obtenue après extraction de F1

F2 = Fraction comportant les composés phénoliques

\*IR sur colonne DB1.

Les 3 fractions ont été testées ; le résultat de ces expériences est représenté à la figure 38 et comparée au thymol et à l'huile essentielle de départ.



**Figure 38** : Réactivité de l'huile essentielle de l'échantillon 1 d' *Aeolanthus pubescens* et des fractions obtenues par traitement basique vis à vis du DPPH

On constate que la fraction F'1, très appauvrie en constituants phénoliques, n'a plus qu'une très faible activité antiradicalaire.

La fraction F2, puisque exclusivement constituée de phénols, a un comportement très proche de celui du thymol, comme attendu.

En revanche, l'étude de la fraction F1 pauvre en thymol, permet de tracer une courbe assez proche de celle de l'huile essentielle qui contient 5 fois plus de thymol (63.8%).

Ce résultat est tout à fait en accord avec l'hypothèse précédemment émise d'une «potentialisation» de l'effet du thymol par d'autres constituants de l'huile essentielle; en d'autres termes, une purification du «principe actif supposé» (ici les thymol-carvacrol) n'améliore pas de façon spectaculaire les propriétés de l'extrait.

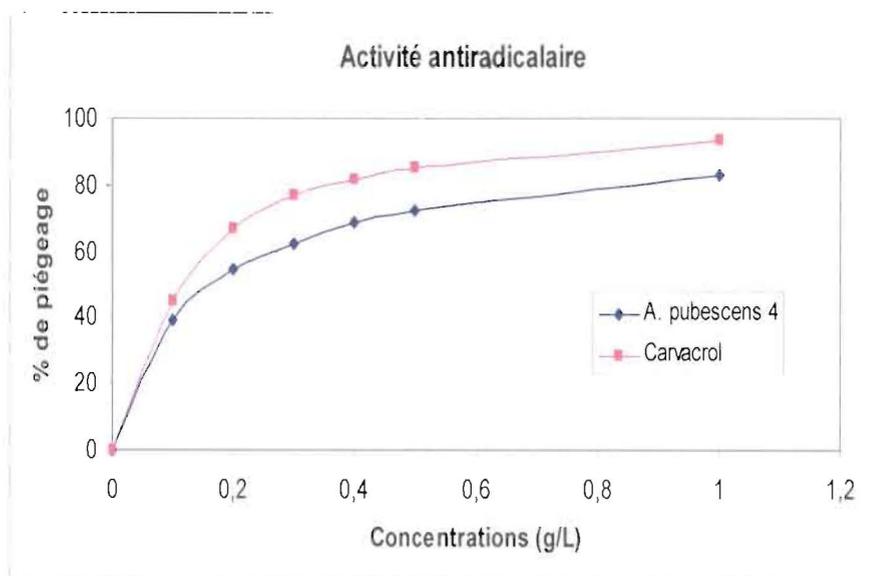
Les  $SC_{50}$  obtenus à partir de ces courbes sont donnés dans le tableau 42

**Tableau 42 : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de l'échantillon 1 d'*Aeolanthus pubescens* et des fractions obtenues par traitement basique**

Composé ou extrait	SC <sub>50</sub> (mg/L)	SC <sub>50</sub> en g/mol de DPPH (10 <sup>3</sup> )
HE	126	1.31
F1	169	1.75
F2	132	1.10
F'1	2040	21.8
Thymol	113	1.18
Carvacrol	125	1.25

➤ *Aeolanthus pubescens*: «chénotype à carvacrol»

L'échantillon 4, récolté à Tré, a été étudié et comparé au carvacrol (figure 39).



**Figure 39** : Réactivité de l'huile essentielle de l'échantillon 4 d' *Aeolanthus pubescens* et du carvacrol vis à vis du DPPH

On trouve une réactivité moins forte pour l'échantillon d'huile essentielle (SC<sub>50</sub> (HE) = 160mg/L) que pour le carvacrol (SC<sub>50</sub> = 125mg/L).

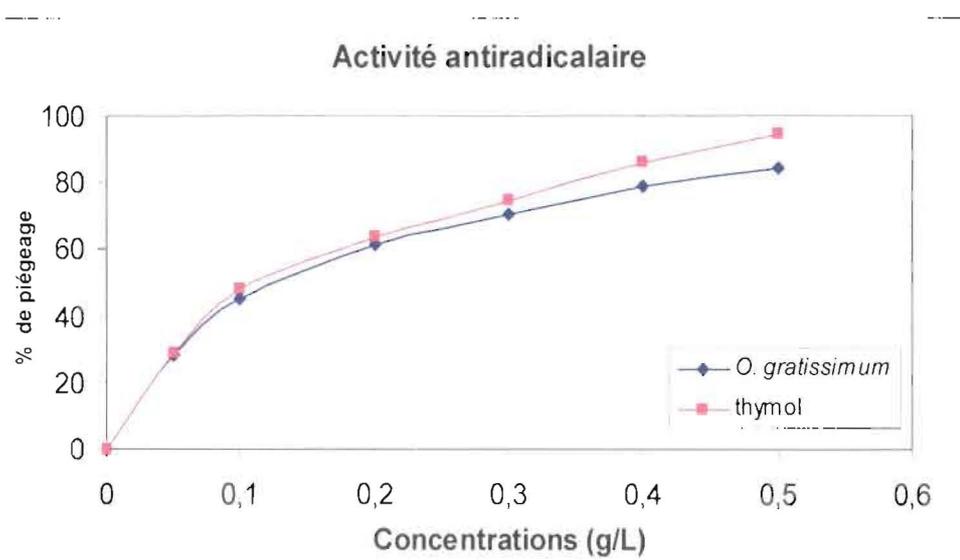
Néanmoins la valeur attendue pour l'échantillon d'huile essentielle, calculée sur la base de sa teneur en carvacrol, serait de 208mg/L.

Là encore, on retrouve le phénomène de synergie avec les constituants «neutres» de l'huile essentielle précédemment décrite.

#### 1-2-4-4-2- Huile essentielle d'*Ocimum gratissimum*

L'échantillon d'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des feuilles d'*O. gratissimum* a été testé et comparé au thymol, composé majoritaire représentant environ 27% du mélange.

On obtient une réactivité «proche» de celle du phénol de référence (figure 40).



**Figure 40** : Réactivité de l'huile essentielle d'*O. gratissimum* et du thymol vis à vis du DPPH

La détermination des  $SC_{50}$  conduit aux résultats suivants :

**Thymol** :  $SC_{50} = 0.11 \text{ g/L}$

**Huile essentielle** :  $SC_{50} \text{ (HE)} = 0.13 \text{ g/L}$

Nous avons procédé au fractionnement de l'huile essentielle par traitement basique d'une solution éthérée d'huile essentielle (F1).

L'extrait obtenu par réacidification de la phase aqueuse basique et extraction à l'éther conduit à la fraction désignée par F2. Les résultats de leur analyse chimique sont rassemblés dans le tableau 43.

**Tableau 43** : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* (feuilles) et des 2 fractions obtenues par traitement basique et extraction de l'huile essentielle

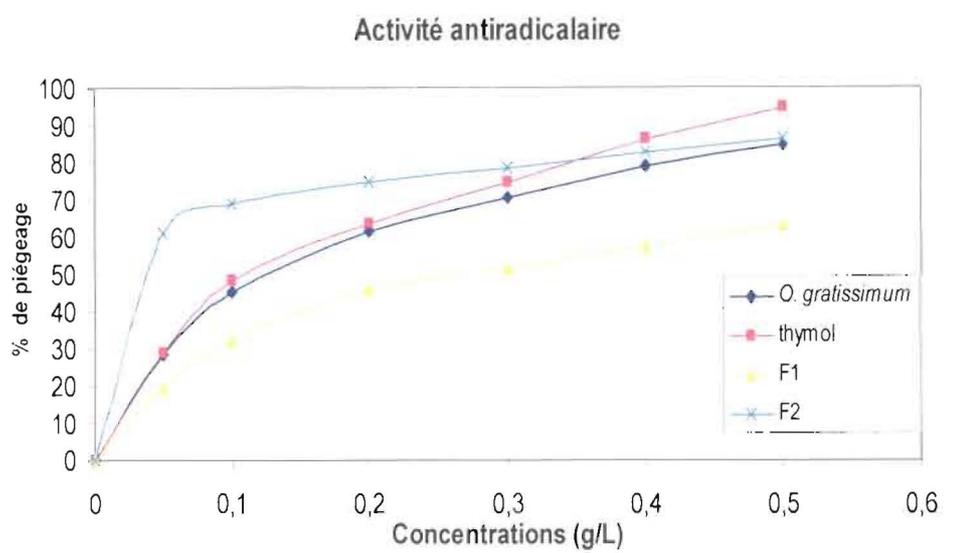
Nom des composés	*IR	HE	F1	F2
$\alpha$ -thujène	931	8.2	8.4	-
$\alpha$ -pinène	941	1.2	2.4	-
camphène	956	0.3	0.3	-
sabinène	973	0.3	0.4	-
$\beta$ -pinène	976	0.7	0.9	-
<b>myrcène</b>	<b>989</b>	<b>6.3</b>	<b>9.7</b>	-
$\alpha$ -phellandrène	1007	0.5	-	-
$\alpha$ -terpinène	1020	4.2	-	-
<b>p-cymène</b>	<b>1023</b>	<b>17.6</b>	<b>29.7</b>	<b>0.7</b>
limonène	1029	2.5	4.2	-
$\delta$ -3-carène	1030	0.1	-	-
1,8-cinéole	1032	2.1	-	-
(E)- $\beta$ -ocimène	1044	0.3	0.5	-
<b><math>\gamma</math>-terpinène</b>	<b>1061</b>	<b>20.0</b>	<b>26.4</b>	<b>1.4</b>
p- $\alpha$ -diméthyl styrène	1086	2.2	2.8	-
terpinolène	1091	0.1	0.5	-
<b>linalol</b>	<b>1096</b>	0.2	-	-
$\beta$ -thujone	1166	0.2	0.3	-
bornéol	1168	0.2	-	-
terpinèn-4-ol	1178	1.2	-	1.0
$\alpha$ -terpinéol	1186	-	-	-
thymol méthyl ether	1227	0.3	-	-
<b>thymol</b>	<b>1287</b>	<b>26.9</b>	-	<b>90.8</b>
<b>carvacrol</b>	1293	<b>0.7</b>	-	<b>5.4</b>
$\alpha$ -copaène	1382	0.1	0.2	-
$\beta$ -caryophyllène	1435	1.2	0.1	-
bergamotène	1438	0.1	-	-
$\alpha$ -humulène	1455	0.2	2.9	-
germacrène D	1488	0.1	-	-
$\beta$ -sélinène	1492	0.4	2.6	-
$\alpha$ -sélinène	1503	0.2	0.2	-
$\delta$ -cadinène	1527	0.1	0.7	-
oxyde de caryophyllène	1599	0.2	2.4	-
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>62.3</b>	<b>83.4</b>	<b>2.1</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>31.9</b>	<b>3.1</b>	<b>97.2</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>2.4</b>	<b>6.7</b>	-
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>0.2</b>	<b>2.4</b>	-
<b>Composés aromatiques</b>		<b>2.2</b>	<b>2.8</b>	-
<b>Total</b>		<b>99.0</b>	<b>98.4</b>	<b>99.3</b>

1 = Feuilles d'*O. gratissimum* récoltées à Cotonou le 18/08/02.

F1 = Fraction «neutre»

F2 = Fraction «acide»

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle, des fractions «neutre» et «acide» ainsi que du phénol de référence (thymol) a été évaluée dans les mêmes conditions expérimentales. Le résultat de ces évaluations est donné sur la figure 41 et dans le tableau 44.



**Figure 41** : Réactivité de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* (feuilles), du thymol et des différentes fractions chimiques vis à vis du DPPH

**Tableau 44:** Activité antiradicalaire de l'huile essentielle (échantillon 1) d'*Ocimum gratissimum* (feuilles) et des différentes fractions chimiques.

Composé ou extrait	SC <sub>50</sub> (g/L)	SE <sub>50</sub> en g/mole de DPPH (10 <sup>3</sup> )
HE	0.13	1.13
F1	0.27	2.52
F2	0.038	0.34
Thymol	0.11	1.18

La fraction «neutre» (F1) conserve une activité résiduelle, ce qui est surprenant dans la mesure où son analyse chimique ne montre aucune trace de constituant phénolique (thymol ou carvacrol).

La fraction F2 qui contient (86.5% de thymol) est 3 fois plus active que l'échantillon authentique de thymol et 3.5 fois plus active que l'huile essentielle (26.9% de thymol).

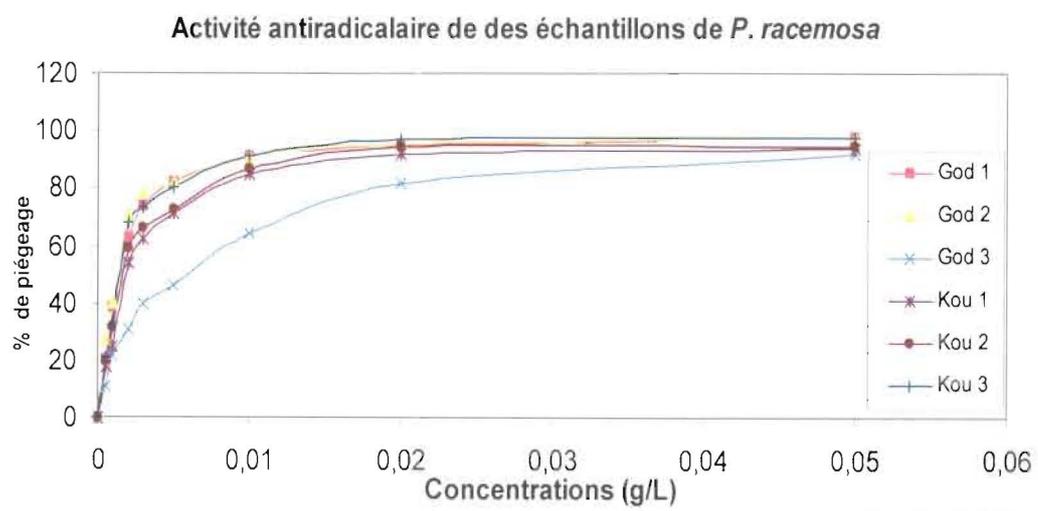
On retrouve, comme pour l'huile essentielle d'*Aeolanthus*, une meilleure activité pour l'huile essentielle et la fraction «neutre» que celle attendue sur la base de leur teneur en constituants phénoliques (on admet pour le calcul que le carvacrol a une activité égale à celle du thymol):

- ✓ Huile essentielle:  $SC_{50}$  (théorique) = 0.40g/L ;  $SC_{50}$  (expérimentale) = 0.13g/L.
- ✓ F2 :  $SC_{50}$  (théorique) = 0.12g/L ;  $SC_{50}$  (expérimentale) = 0.038g/L.

Dans les deux cas, la présence des constituants «neutres» augmente la réactivité d'un facteur de 3 environ, probablement grâce à un phénomène de synergie entre les différents types de molécules.

#### 1-2-4-4-3- Huiles essentielles de *Pimenta racemosa*

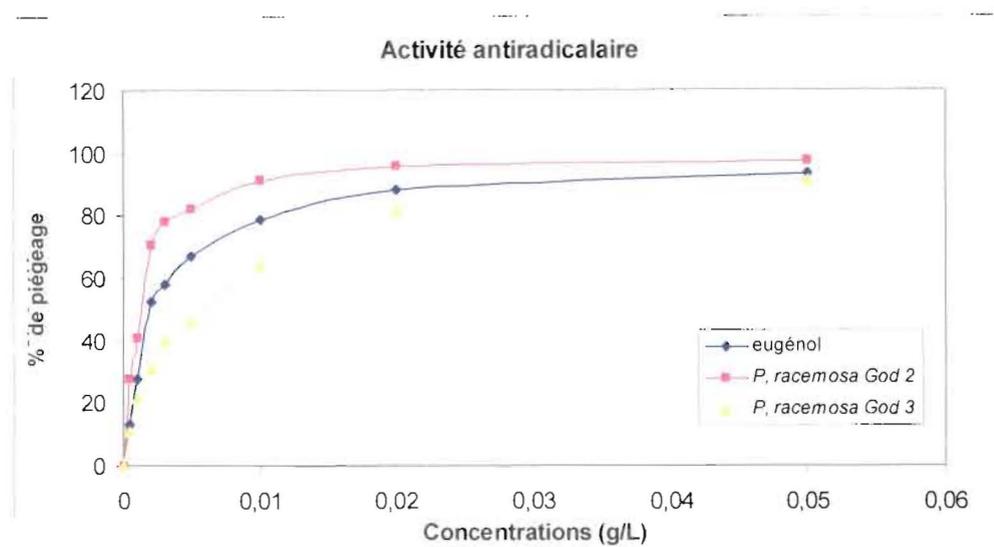
L'activité antiradicalaire des 6 échantillons d'huiles essentielles de feuilles de *Pimenta racemosa* a été testée sur le DPPH, dans une gamme de concentrations allant de 0.5 à 50mg/L. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 42.



**Figure 42** : Réactivité des six échantillons d'huiles essentielles de *Pimenta racemosa* vis à vis du DPPH

On obtient des réactivités comparables pour les différents échantillons, l'échantillon le plus actif étant celui de Godomey 2 (échantillon 2) et le moins actif étant celui de Godomey 3 (échantillon 3).

L'activité de l'eugénol, le constituant majoritaire de ces échantillons est intermédiaire entre celles de ces deux échantillons (figure 43).



**Figure 43 :** Réactivité des échantillons 2 et 3 d'huiles essentielles de *Pimenta racemosa* de Godomey et de l'eugénol vis à vis du DPPH

Les deux seuls composés phénoliques identifiés dans ces échantillons d'huiles essentielles sont le chavicol et l'eugénol.

**Tableau 45:** Pourcentage relatif et réactivité des deux composés phénoliques des échantillons d'huiles essentielles de *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore, récoltées au Bénin vis-à-vis du DPPH.

Nom des composés	*IR	1(%)	2(%)	3(%)	4(%)	5(%)	6(%)
chavicol	1250	7.5	7.2	8.0	7.1	7.7	9.3
eugénol	1368	51.1	50.8	46.6	45.5	45.2	52.7
SC <sub>50</sub> (mg/L)		1.27	1.40	1.60	1.85	1.71	1.88
SC <sub>50</sub> (g/mole)		13.9	14.9	16.9	20.9	19.5	18.4

1 = Récoltées à Godomey le 19/04/03; 2 = Récoltées à Godomey le 28/05/03.

3 = Récoltées à Godomey le 04/01/05; 4 = Récoltées à Kouhounou le 28/02/04.

5 = Récoltées à Kouhounou le 30/12/03; 6 = Récoltées à Kouhounou le 15/04/03.

\*IR sur colonne DB1.

Dans le tableau 45, nous avons reporté le pourcentage relatif de ces deux composés phénoliques et le SC<sub>50</sub> de chaque échantillon testé ; la réactivité de ces échantillons varie entre 1.27 et 1.88 mg/L.

En comparant l'échantillon (1) d'huile essentielle de *Pimenta racemosa* à celle de l'eugénol on trouve qu'il est 1.3 fois plus actif que l'eugénol pur.

Nous avons appliqué un traitement «acido-basique» identique à celui utilisé pour l'étude d'*O. gratissimum* précédemment décrit, afin de «séparer» les constituants phénoliques («acides») des autres constituants («neutres») de l'huile essentielle et les différentes fractions obtenues ont été analysées (tableau 46).

Les résultats montrent que nous avons, comme pour l'huile essentielle d'*O. gratissimum*, une certaine difficulté à extraire la totalité des constituants phénoliques; en effet, une importante proportion ne passe pas dans la phase aqueuse et est extraite par le solvant organique (voir composition chimique F1).

Un deuxième traitement acido-basique de cette fraction F1, a permis d'éliminer la quasi totalité des constituants phénoliques (il ne reste que 4% d'eugénol).

La fraction «acide» F2 est exclusivement constituée de composés phénoliques.

Toutes les fractions ont été testées et les résultats sont donnés dans le tableau 46 et la figure 44 correspondant.

**Tableau 46** : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pimenta racemosa* (feuilles) et des fractions obtenues par traitement basique de l'huile essentielle

Nom des composés	*IR	1(%)	F1(%)	F'1(%)	F2(%)
$\alpha$ -thujène	940	0.4	0.3	0.3	-
octèn-3-ol	974	2.4	6.0	8.1	-
$\beta$ -pinène	982	0.1	-	-	-
myrcène	993	25.1	45.6	53.3	-
$\alpha$ -terpinène	1018	0.1	0.2	0.2	-
p-cymène	1022	0.7	1.4	1.9	-
limonène	1034	3.0*	11.9	14.9	-
1,8-cinéole		2.7*	0.3	0.4	-
(E)- $\beta$ -ocimène	1043	0.2	-	-	-
$\gamma$ -terpinène	1058	0.1	0.1	-	-
terpinolène	1089	0.2	0.3	0.2	-
linalol	1092	0.6	1.8	2.6	-
terpinèn-4-ol	1178	0.8	2.1	3.1	-
$\alpha$ -terpinéol	1188	0.7	2.4	3.1	-
chavicol	1250	7.5	0.1	-	13.8
eugénol	1368	51.1	23.0	4.0	86.2
$\beta$ -caryophyllène	1440	0.1	0.2	0.3	-
$\alpha$ -humulène	1489	0.1	0.1	-	-
(E,E)- $\alpha$ -farnésène	1502	0.2	0.5	-	-
$\delta$ -cadinène	1533	0.1	0.3	-	-
torréyol	1638	0.1	0.2	0.5	-
cadinol T	1665	0.1	0.2	0.3	-
diterpène	1941	0.6	1.2	2.5	-
diterpène	1981	0.2	0.4	0.9	-
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>29.9</b>	<b>59.8</b>	<b>70.8</b>	-
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>4.8</b>	<b>6.6</b>	<b>8.8</b>	-
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		<b>0.5</b>	<b>1.1</b>	<b>0.3</b>	-
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		<b>0.2</b>	<b>0.4</b>	<b>0.8</b>	-
<b>Dérivés aliphatiques</b>		<b>2.4</b>	<b>6.0</b>	<b>8.4</b>	-
<b>Composés aromatiques</b>		<b>58.6</b>	<b>23.1</b>	<b>4.0</b>	<b>100</b>
<b>Total</b>		<b>96.4</b>	<b>97.0</b>	<b>93.4</b>	<b>100.0</b>

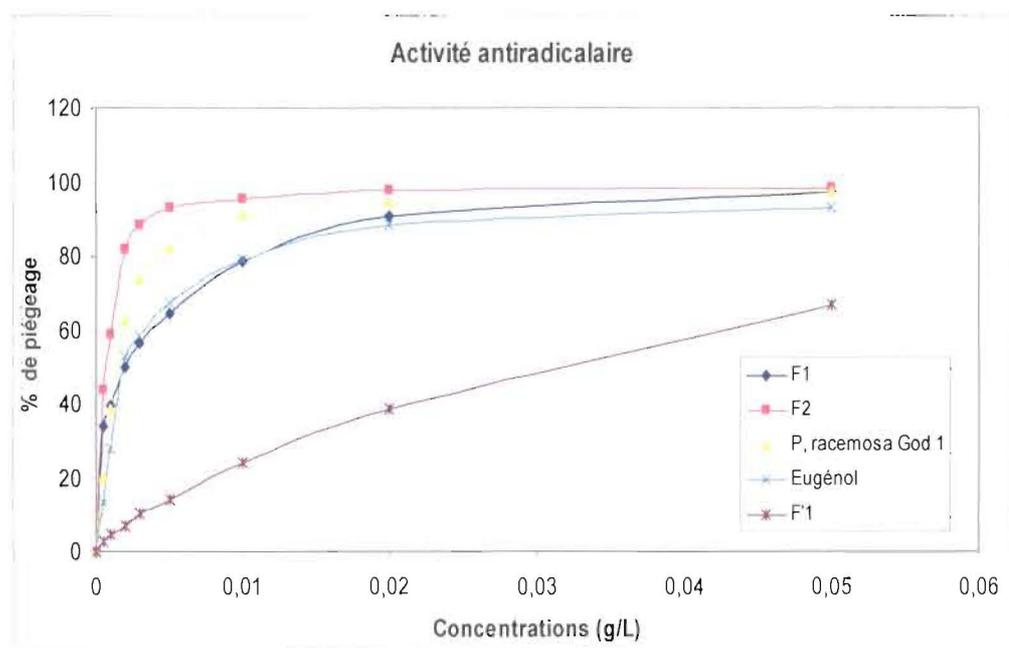
1 = Récoltées à Godomey le 19/04/03.

F1 = Fraction «neutre» issue du traitement basique de l'huile essentielle

F'1 = Fraction «neutre» obtenue après un 2<sup>ème</sup> traitement basique de F1

F2 = Fraction «acide» contenant les composés phénoliques

\*IR sur colonne DB1.



**Figure 44** : Réactivité de l'échantillon 1 de l'huile essentielle de *Pimenta racemosa* de Godomey 1, de l'eugénol et des différentes fractions chimiques vis à vis du DPPH

**Tableau 47**: Activité antiradicalaire de l'huile essentielle (échantillon 1) de *Pimenta racemosa* (feuilles) de Godomey de ses différentes fractions chimiques et de ses 2 constituants phénoliques.

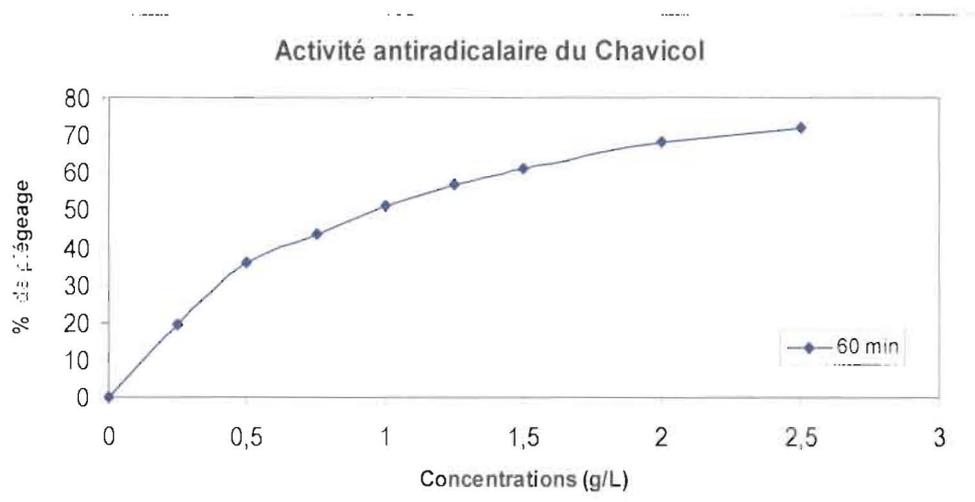
Composé ou extrait	SC <sub>50</sub> (mg/L)	SC <sub>50</sub> en g/mol de DPPH
HE	1.3	14
F1	1.6	14.7
F2	0.63	6.9
F'1	32	342.2
Eugénol	1.6	18.1
Chavicol synthétisé	1000	9523.8
Eugenol (40mg) + Chavicol(10mg)	2.0	19.4

Comme attendu, la fraction F2, constituée uniquement de dérivés phénoliques est la plus active, mais le SC<sub>50</sub> mesuré (0.63mg/L) est 2 fois inférieur à celui attendu sur la base de la teneur en eugénol (1.6mg/L).

Nous avons donc voulu connaître le pouvoir antiradicalaire du chavicol. Ce composé non disponible commercialement a été synthétisé à partir du 4-allylanisole.

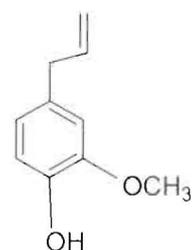
Cette synthèse a été réalisée par déméthylation du 4-allylanisole par  $\text{BBr}_3$  (Méthode: **Agharahimi et Lebel, 1995**) avec un rendement de 95%.

La réactivité du chavicol vis-à-vis du DPPH a été étudiée et son  $\text{SC}_{50}$  évalué à 1g/L (figure 45).

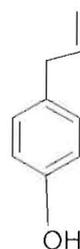


**Figure 45 :** Réactivité du chavicol vis à vis du DPPH

Il y a donc une très grande différence entre le chavicol et l'eugénol (un facteur de 600 environ), qui s'explique par l'absence de l'effet mésomère donneur du méthoxy dans le chavicol.



eugénol

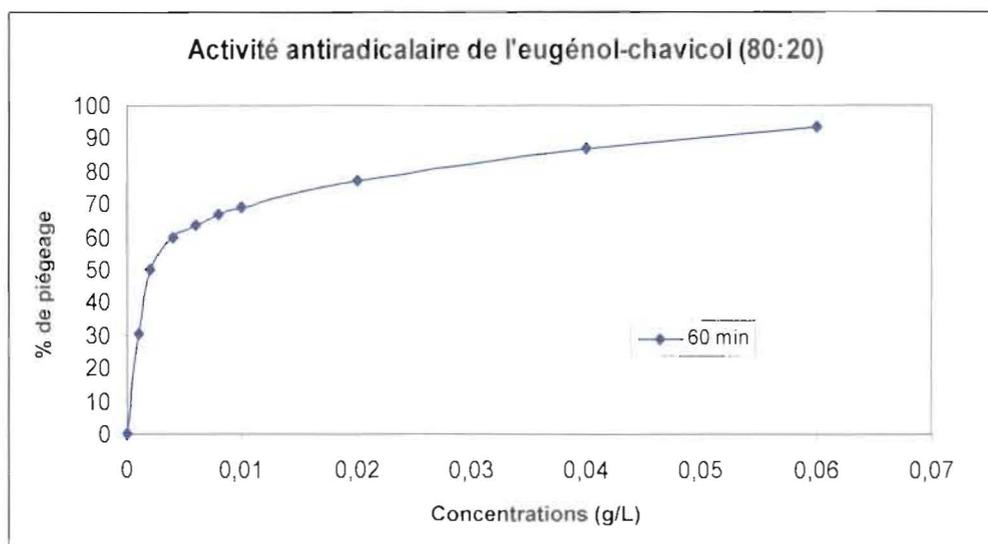


chavicol

On ne peut donc a priori attribuer la bonne activité de la fraction F2 à la présence du chavicol.

Un mélange des échantillons authentiques dans les mêmes proportions (80/20) a été testé pour vérifier ce point (figure 46). Le  $\text{SC}_{50}$  obtenu (2,0mg/L) est tout à fait comparable à

la valeur théorique attendue, compte tenu de la proportion d'eugénol dans le mélange ( $SC_{50}$  (théorique) = 2.0mg/L).



**Figure 46** : Réactivité du mélange eugénol /chavicol dans les proportions (80:20) vis à vis du DPPH

L'ensemble de nos résultats illustre les potentialités de l'huile essentielle de *Pimenta racemosa* pour des applications antiradicalaires, notamment dans le domaine alimentaire.

La réactivité de la fonction F2 ne pourrait donc s'expliquer que par la présence des composés minoritaires (<0.1%, non repérés par chromatographie en phase gazeuse) extraits en même temps que les composés phénoliques.

Il serait indispensable de valider ce résultat en renouvelant l'ensemble de l'expérience (extractions et évaluation des fractions).

On retrouve également, pour l'huile essentielle et la fraction F1, une activité antiradicalaire meilleure que celle attendue sur la base de la teneur en eugénol.

$SC_{50}$  (théorique) de l'huile essentielle: 3.2mg/L au lieu de 1.3 mg/L mesurés

$SC_{50}$  (théorique) de F1: 6.4mg/L au lieu de 1.6mg/L mesurés

Pour la fraction F'1, la valeur de  $SC_{50}$  (32mg/L) mesurée est du même ordre de grandeur que la valeur théorique, ( $SC_{50}$  (théorique) de F'1 est égale à 40mg/L).

## **2 - Propriétés anti-inflammatoires des huiles essentielles**

### **2-1- Généralités**

#### **2-1-1-Inflammation**

##### **2-1-1-1-Définition**

L'inflammation est l'ensemble des modifications produites chez les êtres pluricellulaires par toute atteinte à leur intégrité tissulaire et comportant une suite coordonnée d'évènements d'abord vasculosanguins, puis cellulaires et enfin tissulaires. Ces différentes étapes ne sont pas évidentes et, par référence aux données de l'expérimentation, les pathologies assimilent chronologie et morphologie et distinguent plusieurs types d'inflammation (Kerbaum et coll., 1998).

##### **2-1-1-2-Causes de l'inflammation**

L'inflammation peut-être causée par des agressions physiques (la chaleur, le froid, les radiations ionisantes), chimiques (composés acides ou basiques, toxines bactériennes). Elle peut être la conséquence d'une infection (en rapport avec la présence dans l'organisme d'agents pathogènes tels que les bactéries, virus, parasites ou champignons). Elle peut être provoquée par une réaction immunitaire à la réintroduction dans l'organisme d'un antigène (allergie) tel qu'un antibiotique. Enfin elle est la conséquence d'une nécrose tissulaire.

##### **2-1-1-3-Classification des inflammations**

On distingue deux types d'inflammation: l'inflammation aiguë qui est évolutive et caractérisée par la prédominance des phénomènes vasculosanguins et l'inflammation chronique où domine la prolifération des fibroblastes (Kerbaum et coll., 1998).

❖ **L'inflammation aiguë** : la réaction inflammation aiguë n'est pas spécifique. Elle fait intervenir à la fois une réponse localisée et une réponse systématique. Quelques minutes après la lésion des tissus, on note une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'émigration leucocytaire contrôlées par la production et la diffusion des messagers chimiques tels que la bradykinine, les fibrinopeptides, l'histamine et les prostaglandines (Stevens et Lowe, 1997). Cette réponse locale est accompagnée de l'induction de la fièvre, de l'augmentation de la synthèse de l'hormone adénocorticotrope et

de l'hydrocortisone, de l'induction de la production des leucocytes et des protéines de la phase aiguë telles que la protéine C-réactive du foie (Kerbaum et coll., 1996).

❖ **L'inflammation chronique:** les composantes des membranes de certains agents pathogènes les rendent résistants à la phagocytose, ce qui conduit à une réponse inflammatoire chronique. Cette réponse est également associée à certaines maladies auto-immunes et aux cancers. L'inflammation chronique aboutit souvent à la formation des granulomes qui sont une masse en forme de tumeur dont la zone centrale est formée de cellules géantes multinuclées issues de la fusion des macrophages activés. Cette zone est entourée de lymphocytes activés. Ces cellules exercent une fonction phagocytaire et une fonction sécrétoire dans la défense contre les agents agresseurs. Elles sécrètent entre autre des cytokines qui stimulent la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène. Cette fonction est importante dans les phénomènes de réparation (Stevens et Lowe, 1997).

#### 2-1-1-4- Mécanisme d'action

La réaction inflammatoire déclenchée par les lésions tissulaires empêche la propagation des agents toxiques dans les milieux environnants, élimine les débris cellulaires et les agents pathogènes et amorce les premières étapes du processus de réparation. Les mécanismes de cette réaction impliquent plusieurs événements en cascade selon la séquence et les manifestations cellulaires et tissulaires.

Il y a tout d'abord une phase vasculaire due à la libération de médiateurs de l'inflammation sous l'influence de l'agent initiateur: l'acide arachidonique, acide gras constituant des phospholipides membranaires qui est libéré grâce à l'activation de la phospholipase A2 par des stimuli divers.

L'oxydation de l'acide arachidonique conduit, selon trois voies principales (A, B, C), à différents métabolites, médiateurs de l'inflammation (Figure 47). (Schorderet et Dayer, 1992; Robertson, 1995, Phipper et coll, 1994; Amano et coll., 2003).

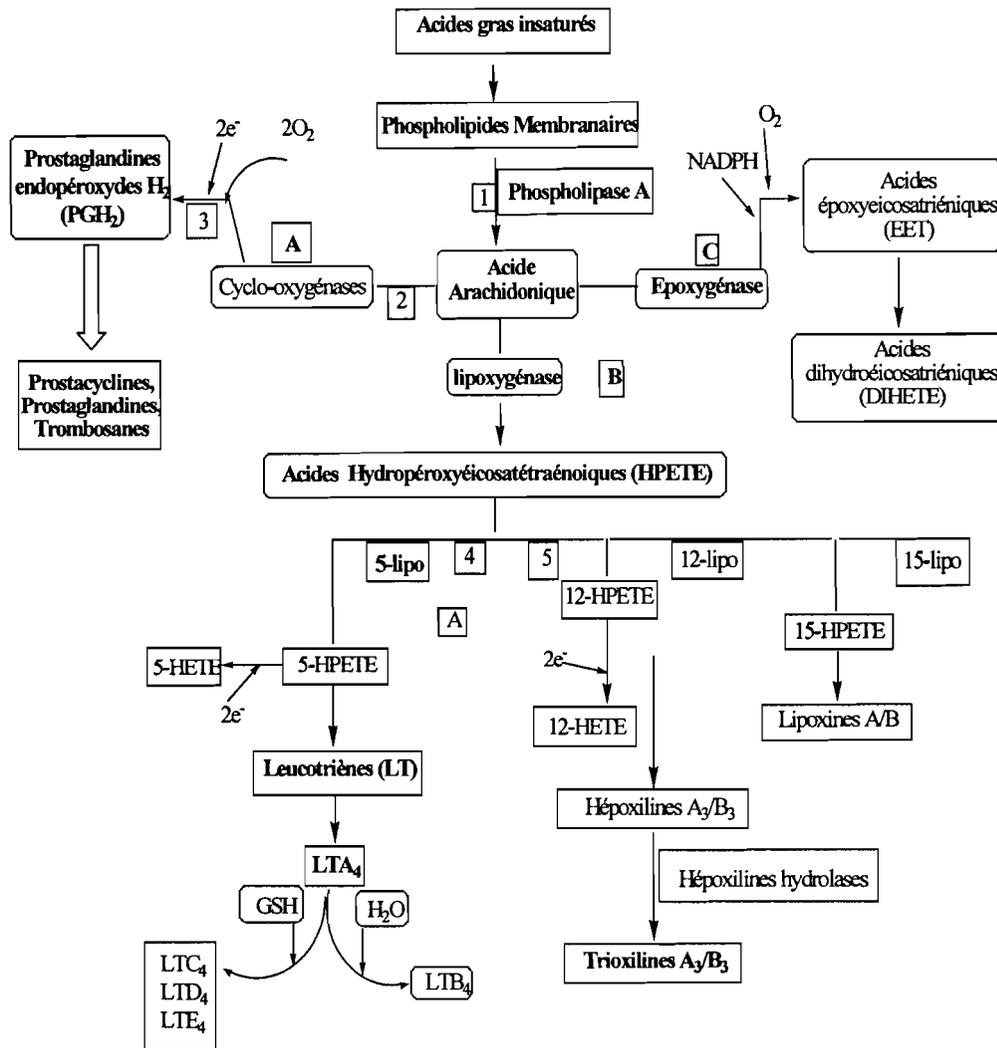
✓ Voie A: l'addition de 2 moles d'oxygène sur l'acide arachidonique, catalysée par les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) conduit à la formation d'un composé tricyclique endopéroxyde dont la réduction conduit à une prostaglandine endopéroxyde  $H_2$   $PGH_2$ . Le  $PGH_2$  est un intermédiaire instable à partir duquel sont formées différentes structures «prostanoïdes» selon plusieurs réactions enzymatiques: prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes.

✓ Voie B: elle est initiée par l'action des lipoxygénases sur l'acide arachidonique pour conduire aux trioxilines et aux leucotriènes.

✓ Voie C: elle aboutit aux acides dihydroeicosatriéniques (DIHETE) catalysée par les époxygénases. Cette voie est encore mal connue et a tendance à être négligée.

Les médiateurs lipidiques formés à partir de l'acide arachidonique interviennent dans le processus de l'inflammation à différents niveaux, par exemple certaines prostaglandines, en l'occurrence la PGE2 et la PGI2, qui induisent une vasodilatation locale, favorisent l'œdème et l'afflux leucocytaire.

Les leucotriènes induisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi qu'un bronchospasme (**Robertson, 1995; Amano et coll., 2003**).



- 1- Inhibition par les corticoïdes médiée par la lipocortine
- 2- Inhibition par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).
- 3- Inhibition par l'ergotéine (superoxyde dimustase, SOD), la catalase, la peroxydase et les capteurs de radicaux libres.
- 4- Inhibition par divers agents pharmacologiques (analogues de l'acide arachidonique, nafazatom, acide caféique etc.), quelques AINS (bénoxaprofène, diflunisal) et anti-asthmatiques potentiels (A-64077)
- 5- Inhibition par des analogues de l'acide arachidonique et quelques AINS (salicylates, indométacine).

**Figure 47 :** Prostanoides et substances apparentées formées à partir de l'acide arachidonique chez l'animal (Schorderet et Dayer, 1992)

## **2-1-2- Anti-inflammatoire**

### **2-1-2-1- Définition**

Un anti-inflammatoire est un médicament destiné à combattre une inflammation.

De nombreux anti-inflammatoires sont en vente libre dans les pays africains, ce qui tend à banaliser leur usage. Et comme tous les médicaments, ils ont des effets secondaires et peuvent être à l'origine d'intoxication, notamment par surdosage ou interaction avec d'autres médicaments, ainsi que d'allergies.

### **2-1-2-2- Classes d'anti-inflammatoires**

Le premier anti-inflammatoire (le moins cher et sans effet secondaire si il est bien utilisé) est le froid. On distingue deux catégories de médicaments anti-inflammatoires.

- les corticoïdes (anti-inflammatoires stéroïdiens)
- les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

#### **2-1-2-2-1-Les corticoïdes ou anti-inflammatoires stéroïdiens**

Ce sont des hormones naturelles synthétisées dans la zone corticale (externe) des glandes surrénales à partir du cholestérol. Ils sont également appelés corticostéroïdes (**Vane et Botting, 1998**). Les corticoïdes utilisés comme médicaments, sont des hormones naturelles mais puissants et plus spécifiques. Ils agissent en bloquant la phospholipase A. En fonction de leur activité principale, il existe 3 classes:

- Les glucocorticoïdes comme le cortisol, qui agissent essentiellement sur le métabolisme glucidique et protéique.
- Les minéralocorticoïdes comme l'aldostérone, qui agissent sur le métabolisme hydrominéral.
- Les androgènes.

#### **2-1-2-2-2-Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médiateurs symptomatiques à action rapide qui ont des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires, certains sont antipyrétiques. Ils ont des structures très diverses et agissent à différents niveaux. Les AINS

peuvent obéir à différents mécanismes, mais on considère souvent que leur point d'impact essentiel est l'inhibition des cyclooxygénases et des lipoxygénases. (Polisson, 1996).

#### **2-1-2-2-1- Inhibiteurs des cyclooxygénases, AINS**

La majorité des AINS ont été découverts et utilisés en clinique bien que leur mécanisme d'action ne soit pas connu. Plusieurs études ont permis de classer les principaux inhibiteurs des cyclooxygénases en fonction de leur sélectivité d'action anticyclooxygénase. On distingue les inhibiteurs préférentiels des cyclooxygénases de type I (COX-1) par exemple l'aspirine, l'indométacine et des inhibiteurs sélectifs des cyclooxygénases de type II (COX-2), en principe dépourvus d'effet ulcérogène (il s'agit de Celebrex<sup>R</sup> et Celebid 100<sup>R</sup>) et enfin des inhibiteurs non sélectifs (ibuprofène et naproxène) (Vane et Botting, 1995; Piret et coll., 1997; Benjarano, 1999).

#### **2-1-2-2-2-Inhibiteurs des lipoxygénases**

Les recherches s'intéressent de plus en plus à des inhibiteurs potentiels de lipoxygénases. Le zileuton est un inhibiteur de la 5-lipoxygénase qui, en inhibant la synthèse des leucotriènes correspondants, a donné des résultats intéressants dans le traitement de l'asthme. Il a une courte durée d'action du fait de sa métabolisation rapide. Son principal effet indésirable serait l'élévation des transaminases avec risque d'hépatite.

L'activité de la méسالazine est liée à l'inhibition de la 5-lipoxygénase responsable de la synthèse du LTB<sub>4</sub>.

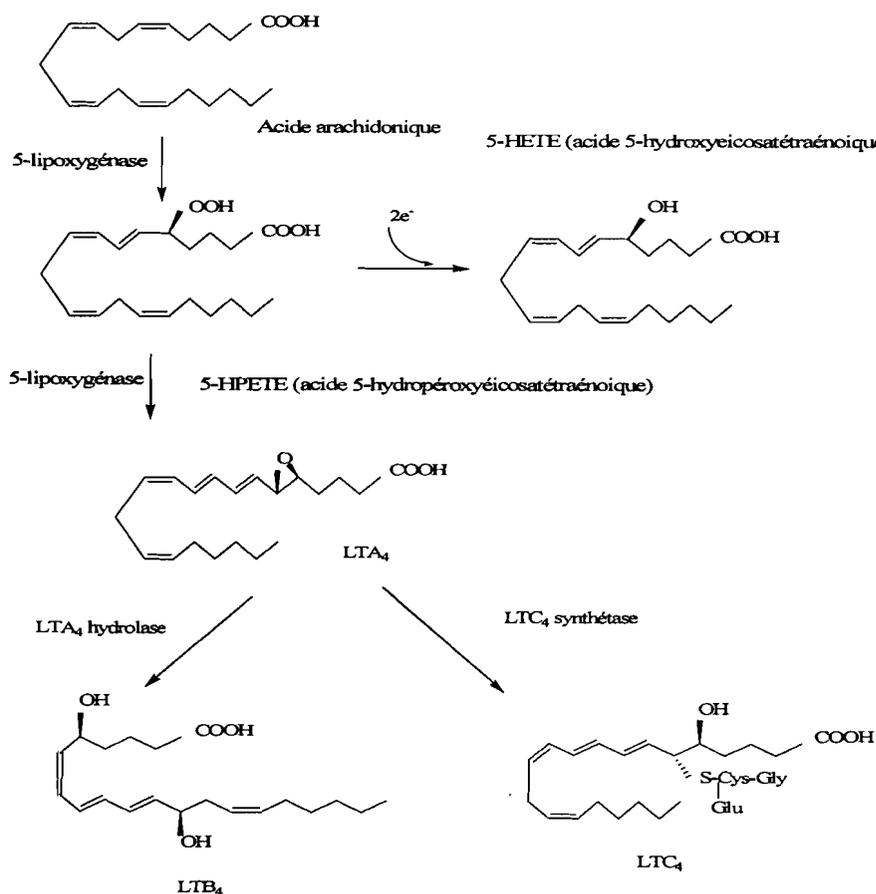
L'esculétine, dérivé coumarinique extrait d'*Aesculus hippocastrum*, inhibe l'activité de la 12-lipoxygénase et a montré des effets antiprolifératifs sur certaines tumeurs expérimentales (Piret et coll., 1997).

#### **2-1-3-Rôle de la 5-lipoxygénase dans le processus de l'inflammation**

L'inhibition de la 5-lipoxygénase représente une cible thérapeutique pour diverses maladies depuis qu'il a été démontré que les leucotriènes, produits majeurs de la 5-lipoxygénase, sont des médiateurs biologiques actifs, très importants dans le processus de l'inflammation tels que l'asthme, l'arthrite, le rhumatisme, la douleur, la réponse allergique, etc. (figure 48) (Braga et coll., 2000).

La 5-lipoxygénase catalyse l'oxydation du motif (Z), (Z)-pentadiène de l'acide arachidonique en son dérivé hydroperoxyde (Z), (E) conjugué. Les produits terminaux sont le 5-HETE et le leucotriène LTA<sub>4</sub>. Celui-ci subit encore l'action catalytique de deux enzymes conduisant aux LTB<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub> hydrolase) et LTC<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub> synthétase).

Il faut signaler qu'il existe plusieurs types de lipoxygénases avec différentes spécificités et aucun effet inhibiteur d'un type ne peut-être extrapolé sur un autre. Les inhibiteurs potentiels de cette enzyme sont nombreux, ceux d'origine végétale encore plus et spécialement certaines huiles essentielles (Sircar et coll., 1983; Alexander, 2001; Baylac et Racine, 2003).

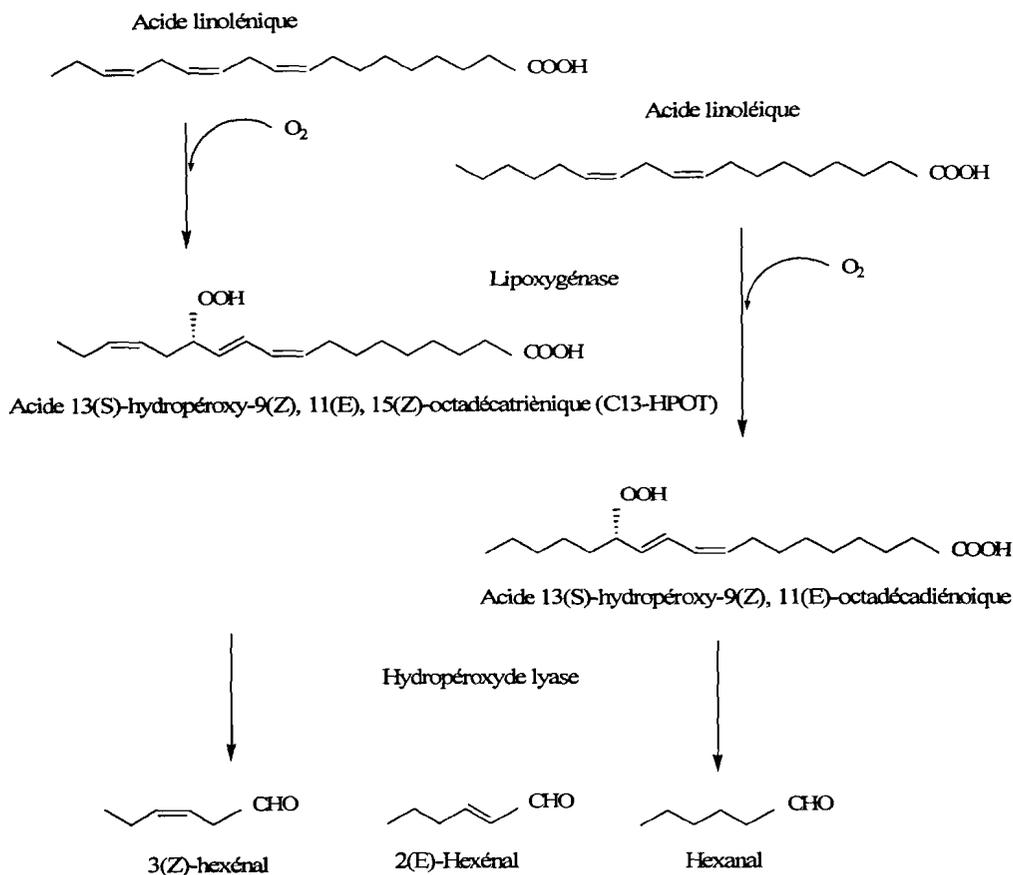


**Figure 48** : Formation des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique

#### 2-1-4- Etude de l'inhibition des lipoxygénases in vitro

On retrouve également les lipoxygénases sur l'ensemble du règne végétal ; ces enzymes catalysent l'oxydation des acides gras polyinsaturés comportant un motif 1,4-diène

(Z), (Z) en leurs dérivés hydroperoxydes conjugués. Les substrats «les plus courants» des lipoxygénases du règne végétal sont les acides linoléiques et linoléiques (**Figure 49**).



**Figure 49** : Réactions biocatalytiques des “notes vertes” à partir de l’acide linoléique et linoléique

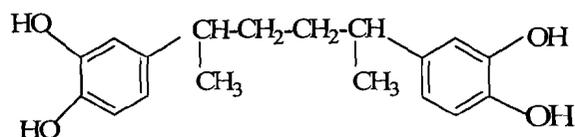
La dégradation ultérieure des dérivés hydroperoxydes par lyases conduits aux dérivés aliphatiques caractérisés par des notes vertes (hexanals, hexénals).

On retrouve donc un processus catalytique très semblable à celui observé sur l’acide arachidonique, ce qui justifie l’utilisation des lipoxygénases d’origine végétale (germe de soja, pomme de terre), faciles d’accès, comme «modèles» pour le screening d’anti-inflammatoires potentiels.

### 2-1-5-Méthodes

Il existe plusieurs méthodes de mesure de l'activité inhibitrice des lipoxygénases *in vitro*. La plus utilisée est celle décrite par **Sircar et coll. (1983)** et **Safayhi et coll. (1992)** appliquée dans le cadre de notre étude.

Cette méthode est basée sur le suivi de l'oxydation d'un acide gras contenant le motif diène 1,4-(Z), (Z), l'acide linoléique, dont la conversion en dérivé hydroperoxyde 1,3-(Z), (E), catalysée par la lipoxygénase, est suivie en spectrophotométrie UV par mesure de l'absorption à 234 nm motif diène conjugué. L'inhibition de la vitesse de l'oxydation en présence de l'huile essentielle est comparée à celle observée en présence du NDGA (acide nordyhydroguaiarétique) qui est un inhibiteur de référence des lipoxygénases.



**Acide nordyhydroguaiarétique (NDGA)**

### 2-1-6 –Quelques résultats des tests de l'inhibition de la 5-lipoxygénase.

En 1983, **Sircar et coll.**, ont testé l'inhibition de la lipoxygénase par une série d'anti-inflammatoires non stéroïdiens synthétiques. La conversion de l'acide linoléique en acide 1,3-hydroperoxydilinéoléique est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre à 24°C. Ils ont montré que toutes les molécules testées à savoir la Naproxen, la BW755C, l'indométhacine et l'isoxican ont la meilleure activité; par contre l'acide méclofénamique, la phénylbutazone, la benzoprofen, l'ubiprofen et la zomepirac ont une faible activité.

En 2003, **Michaelidou et Hadjipavlou-Litina**, ont appliqué la même méthode sur une série d'amides synthétiques en étudiant parallèlement les activités antioxydantes, et analgésiques. Parmi toutes les molécules testées, deux seulement ont une activité inhibitrice inférieure à 50%, ce qui conduit les auteurs à éliminer ce type de structure comme anti-inflammatoire potentiel.

En 2000, **Braga et coll.** ont étudié l'activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase sur les extraits de quelques plantes brésiliennes. La technique mise en jeu est de mesurer la réduction de la production de l'acide 5-hydroxy-6, 8, 11, 14-éicosatétraénoïque (5-HETE) issu de

l'acide 14C-arachidonique. Les extraits les plus actifs sont ceux obtenus à partir des rhizomes de *Hedychium coronarium*, des graines de *Xylopiya aethiopica* et de la résine de *Hymenaea courbaril*. Les extraits à l'hexane de *Bidens campylotheca* ont donné une inhibition significative avec un  $IC_{50} = 8\mu\text{g/mL}$ .

**Baylac et Racine, en 2003**, ont étudié l'action inhibitrice sur la 5-lipoxygénase de soja de plusieurs huiles essentielles et extraits végétaux. Cette inhibition a été comparée à celle du NDGA (acide nordihydroguaiarétique). Ils ont montré que les huiles essentielles de *Commiphora myrrha*, *Copaifera officinalis*, *Commiphora erytraea*, *Cedrus deodora*, *Chamomilla recutita*, *Juniperus communis* ont une bonne action inhibitrice de la 5-lipoxygénase avec un  $IC_{50}$  faible, ce qui justifie leur utilisation en aromathérapie. Par contre les huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* et *Citrus limon* qui ont montré une activité intéressante ne sont pas utilisées en aromathérapie pour leur activité anti-inflammatoire.

La meilleure activité est obtenue avec la résine d'*Hibiscus abelmoschus* mais l'extrait brut n'inhibe pas la 5-lipoxygénase. La résine de *Commiphora myrrha* a une activité comparable à celle de son huile essentielle.

**Sahouo B. et coll., 2003** ont déterminé l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum*, d'*Eucalyptus citriodora* et de *Cymbopogon giganteus* en étudiant leur potentiel inhibiteur de la lipoxygénase L-1 et de la cyclooxygénase des PGHS.

Le suivi de l'activité de la lipoxygénase L-1 a été mesuré à 30°C par mesure de la consommation de l'oxygène.

L'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* a donné une inhibition efficace de la lipoxygénase L-1 avec une  $IC_{50} = 72\text{ppm}$ . L'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* est active sur les deux enzymes testées (125 $\mu\text{g/mL}$  pour la cyclooxygénase et 144 $\mu\text{g/mL}$  pour la lipoxygénase).

Enfin nous avons rassemblé ci-après les paramètres d'inhibition obtenus pour le NDGA dans des conditions expérimentales diverses:

- **Abad et coll. (1995)**, Lipoxygénase de soja, substrat: acide arachidonique ; pH= 8,  $IC_{50}$  NDGA = 44 $\mu\text{M}$ .

- **Baylac et Racine (2003)**, 5-Lipoxygénase de pomme de terre; substrat: acide linoléique ; pH= 6,  $IC_{50}$  (NDGA) = 5ppm.

- **Sircar et coll. (1983)**, Lipoxygénase de Soja, substrat: acide linoléique, pH = 9,  $IC_{50}$  NDGA = 6.1 $\mu\text{M}$ .

- **Safayhi et coll. (1992)**, Lipoxygenase/ milieu neutrophiles de rat, substrat acide arachidonique;  $IC_{50}$  NDGA= 0.5 $\mu$ M.

On observe donc une grande diversité des valeurs suivant les conditions expérimentales.

## **2-2- Résultats et discussion**

### **2-2-1-Screening des huiles essentielles**

Nous avons procédé au screening de nos échantillons d'huiles essentielles en évaluant leur activité potentielle inhibitrice de la 5-lipoxygénase de soja. Nous avons classé les huiles essentielles en trois groupes en fonction des résultats obtenus:

- La première catégorie regroupe les huiles essentielles qui n'ont aucune activité
- La deuxième catégorie réunit les huiles essentielles qui sont moyennement actives.
- La troisième catégorie est constituée des huiles essentielles qui sont très actives.

### **2-2-2- Huiles essentielles « non actives »**

Certains échantillons d'huiles essentielles ne présentent aucune activité anti-inflammatoire. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 48 ci-dessous.

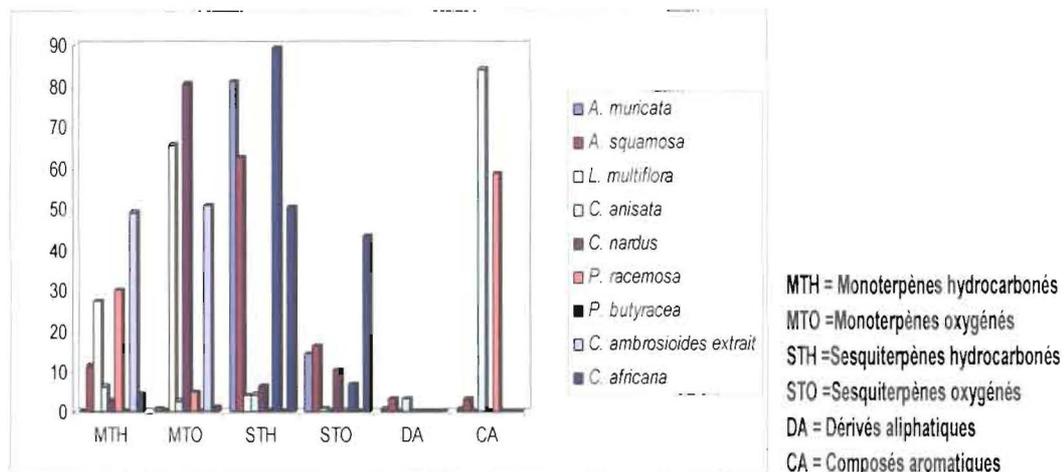
**Tableau 48 : Activités anti-inflammatoires des échantillons d'huiles essentielles « non actives »**

Nom des HE	Concentrations (ppm)	Pourcentage d'inhibition (%)	IC50 (ppm)
<i>Annona muricata</i>	100	0	-
<i>Cymbopogon nardus</i>	100	0	-
<i>Lippia multiflora</i>	100	0	-
<i>Commiphora africana</i>	50	0	-
<i>Pentadesma butyracea</i> (feuilles)	50	0	-
<i>Pentadesma butyracea</i> (écorces)	50	0	-
<i>Clausena anisata</i>	échantillon 1	0	-
	échantillon 2	0	-
	échantillon 3	0	-
	échantillon 4	0	-
	échantillon 8	0	-
<i>Annona squamosa</i>	10	0	-
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (extrait)	10	0	-
<i>Pimenta racemosa</i>	10	0	-

La concentration maximale testée est conditionnée par la solubilité de l'échantillon et son absorbance dans la solution enzymatique.

Les huiles essentielles d'*Annona muricata*, de *Cymbopogon nardus* et de *Lippia multiflora* ont été testés à 100ppm et ne présentent aucun effet inhibiteur à cette concentration.

Les échantillons 1, 2, 3, 4 et 8 de *Clausena anisata*, de l'huile essentielle *Pentadesma butyracea* (feuilles et écorces) et de *Commiphora africana* ont été testés à une concentration de 50 ppm, mais n'ont montré aucune activité anti-inflammatoire à cette concentration. Enfin, les huiles essentielles de *Annona squamosa*, *Chenopodium ambrosioides* et *Pimenta racemosa* n'ont présenté aucune activité anti-inflammatoire à 10 ppm, la concentration limite de leur solubilité. Leurs caractéristiques chimiques sont données dans la figure 50



**Figure 50** : Répartition des constituants dans les échantillons d'huiles essentielles non actives

On retrouve donc une grande diversité de structures chimiques dans les huiles essentielles « non actives » sur la lipoxygénase de soja.

### 2-2-3- Huiles essentielles « moyennement actives »

Certains échantillons d'huiles essentielles ont présenté une faible activité anti-inflammatoire. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 49 ci-dessous.

**Tableau 49 : Activités anti-inflammatoires des échantillons d'huiles essentielles  
« moyennement actives »**

Nom des HE		Concentrations (ppm)	Pourcentage d'inhibition (%)	IC50 (ppm)
	1	100	35	-
<i>Aeolanthus</i>	2	100	35	-
<i>pubescens</i>	3	100	35	-
	4	100	32	-
<i>Chenopodium</i>	2	100	20	-
<i>ambrosioides</i>	3	100	23	-
	5	100	13	-
<i>Ocimum canum</i>		50	30	-
<i>Ocimum gratissimum</i>		50	36	-
		20	16	-
<i>Xylopi aethiopica</i>		50	12	-
<i>Clausena anisata</i> (Houin)		10	16	-
échantillon 7				
<i>Monodora myristica</i>		10	28	-

➤ *Aeolanthus pubescens*

A 100 ppm les échantillons (1, 2 et 3) d'huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens* à chémotype thymol conduisent à 35% d'inhibition de la lipoxigénase de soja tandis que celui à chémotype carvacrol (échantillon 4) donne 32% d'inhibition.

La composition chimique n'influe donc pas directement sur l'activité anti-inflammatoire des deux chémotypes («thymol» et ou «carvacrol») (Tableau 50).

**Tableau 50** : Composés majoritaires des échantillons d'huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens*

Nom des composés	IR*	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)
p-cymène	1023	5.5	12.2	5.6	9.0
$\gamma$ -terpinène	1060	6.6	1.8	6.4	11.2
thymol	1298	63.8	64.7	63.9	9.7
carvacrol	1303	2.1	2.9	3.1	51.1
acétate de thymyle	1346	10.2	9.3	9.8	0.8
acétate de carvacryle	1360	0.7	0.7	0.8	6.1

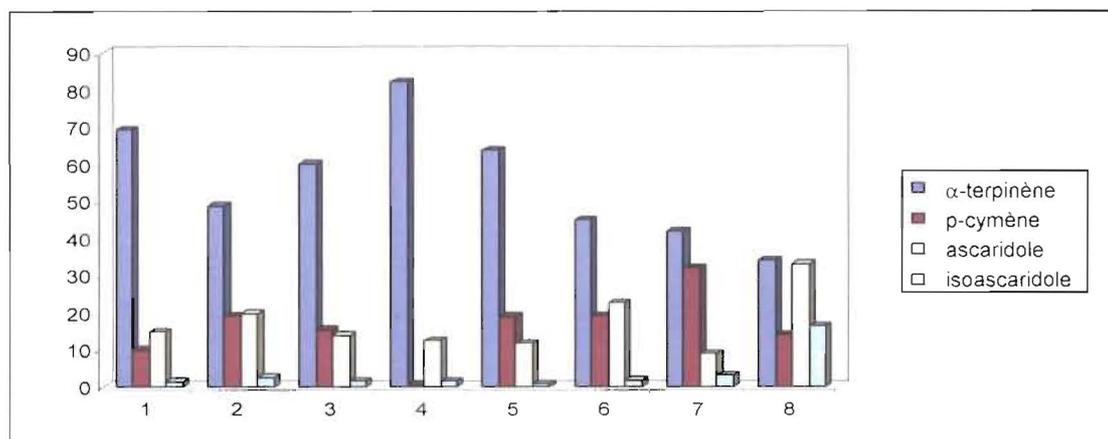
1= Récolté à Togon le 28/06/03; 2= Récolté à Tré le 28/06/03

3= Récolté à Awaya le 28/06/03; 4= Récolté à Tré le 10/08/04; \*IR sur une colonne DB1

➤ *Chenopodium ambrosioides*

A **100 ppm** (concentration maximale susceptible d'être testée compte tenu de la solubilité de l'échantillon dans le milieu) on obtient **20%**, **23%** et **13%** d'inhibition respectivement pour les échantillons 2, 3 et 5 d'huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides*.

Ces échantillons d'huiles essentielles sont caractérisés par un taux important de monoterpènes hydrocarbonés, en particulier l' $\alpha$ -terpinène, accompagné d'ascaridole ; aucune corrélation composition chimique/activité biologique n'apparaît clairement à l'examen des résultats.



**Figure 11 :** Répartition des composés caractéristiques dans les échantillons d'huiles essentielles et dans l'extrait au pentane des feuilles de *Chenopodium ambrosioides* L.

➤ *Ocimum canum*

- A 50 ppm on obtient 30% d'inhibition. Le composé majoritaire de cet échantillon est le terpinèn-4-ol accompagné du linalol; le pourcentage d'inhibition observé pourrait s'expliquer par l'action de ces constituants ou d'une synergie entre plusieurs constituants.

**Tableau 51 :** Composés majoritaires de l'huile essentielle d' *Ocimum canum* Sims.

Nom des composés	*IR	%
limonène	1030	3.4
$\gamma$ -terpinène	1058	6.9
<b>linalol</b>	<b>1097</b>	<b>14.7</b>
acétate d'octèn-3-yle	1101	0.6
<b>terpinèn-4-ol</b>	<b>1189</b>	<b>41.1</b>

\* IR sur une colonne DB1

➤ *Ocimum gratissimum*

On obtient pour l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* à **50 ppm et 20 ppm, 36% et 16%** d'inhibition de la lipoxygénase ce qui nous permet de dire que l'huile essentielle possède une faible activité inhibitrice de la lipoxygénase, confirmée par un effet de concentration entre 20 ppm et 50 ppm (concentrations maximales susceptibles d'être testées compte tenu de la solubilité de l'échantillon dans le milieu).

L'échantillon est donc un peu plus actif que ceux d'*Aeolanthus pubescens*, (environ 30% pour une concentration de 100 ppm) pour un taux de thymol /carvacrol beaucoup plus faible (27% contre 65% environ).

L'activité inhibitrice ne proviendrait donc pas uniquement de la présence de ces constituants mais peut être de la participation de constituants minoritaires susceptibles de «renforcer» l'effet des constituants phénoliques.

Des essais réalisés avec les échantillons authentiques permettraient peut être de compléter cette analyse.

**Tableau 52 : Composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* (feuilles)**

Nom des composés	*IR	1 (%)
$\alpha$ -thujène	922	8.2
myrcène	985	6.4
<b>p-cymène</b>	<b>1018</b>	<b>17.6</b>
$\gamma$ -terpinène	<b>1054</b>	<b>20.0</b>
<b>thymol</b>	<b>1281</b>	<b>26.9</b>
carvacrol	1288	0.7

1 = Feuilles récoltées à Cotonou le 18/08/02.

➤ *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich

A **50 ppm** on obtient **12%** d'inhibition (concentration maximale susceptible d'être testée compte tenu de la solubilité de l'échantillon dans le milieu).

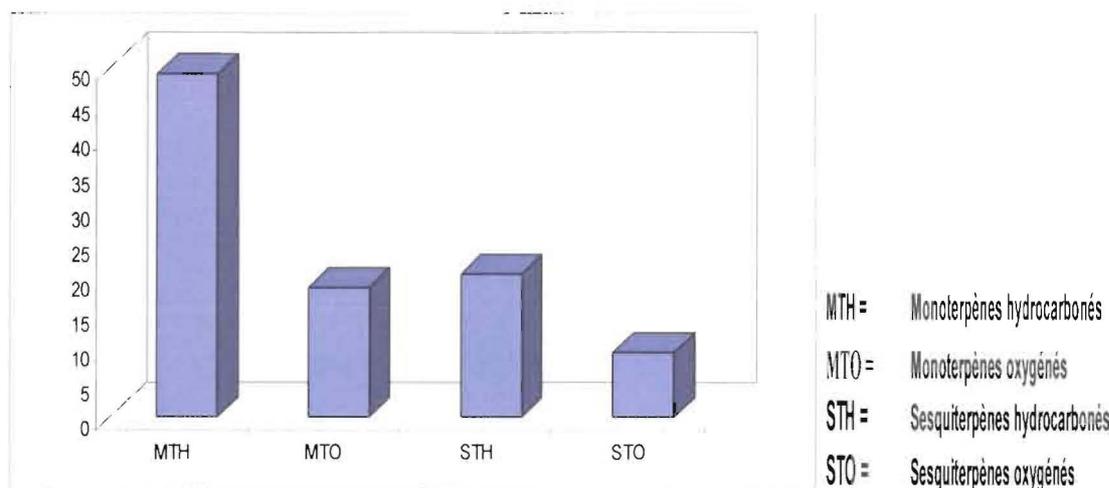
On retrouve, comme dans l'échantillon d'*O. canum*, un taux important de terpinèn-4-ol mais rien ne nous permet de dire que l'activité observée provient de la présence de ce composé.

Des mesures complémentaires seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

**Tableau 53 : Composés majoritaires de l'huile essentielle de *Xylopia aethiopica* (Dunal)**

**A. Rich**

Nom des composés	*IR	%
sabinène	974	12.6
β- pinène	981	7.1
p- cymène	1022	16.0
limonène	1032	7.9
terpinèn-4-ol	1179	11.3
β-élémente	1402	10.6



**Figure 8 :** Répartition des terpénoïdes dans l'huile essentielle des feuilles de *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich

Deux échantillons n'ont pu être étudiés à concentration > 10 ppm : Il s'agit des échantillons d'huiles essentielles de *Monodora myristica* et de *Clausena anisata* récolté à Houin.

➤ *Monodora myristica*

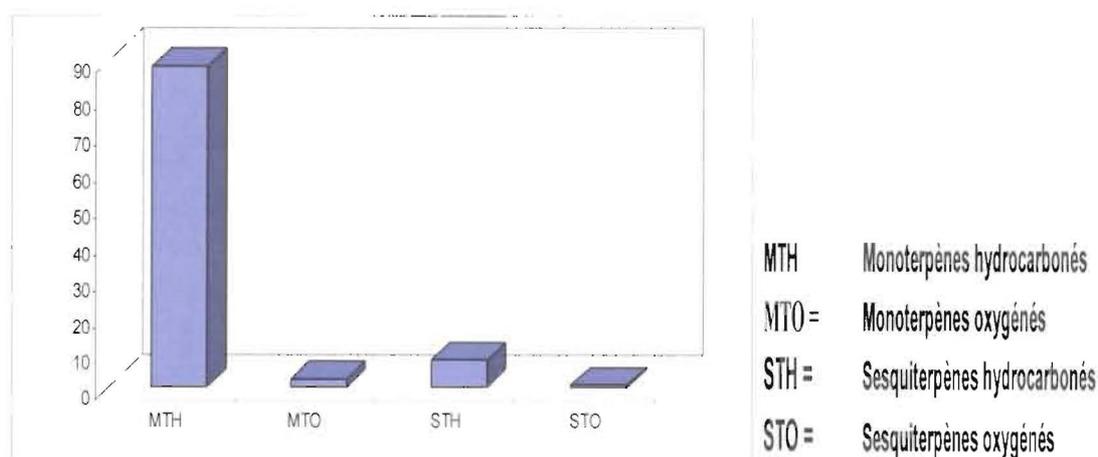
Cet échantillon très riche en monoterpènes hydrocarbonés, est très peu polaire.

A **10 ppm** on obtient **28%** d'inhibition (concentration maximale susceptible d'être testée compte tenu de la solubilité de l'échantillon dans le milieu).

Il serait intéressant de tester cet échantillon à des concentrations plus élevées en présence de solubilisants comme les cyclodextrines, pour confirmer l'activité potentielle de cet échantillon par la mise en évidence d'un «effet de concentration».

**Tableau 54 : Principaux constituants de l'huile essentielle de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal**

Nom des composés	*IR	%
$\alpha$ - pinène	937	6.2
$\beta$ - pinène	985	4.8
$\alpha$ -phellandrène	1009	65.5
p-cymène	1020	4.5
limonène	1029	4.2



**Figure 7 :** Répartition des terpénoïdes dans l'huile essentielle feuilles de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal.

- *Clausena anisata* (Willd). J. D. Hook. ex. Benth. récoltées à différentes périodes à Houin.

Les différents échantillons d'huiles essentielles de *Clausena anisata* récoltés à Houin ont des caractéristiques chimiques très différentes. Seul l'échantillon 7 a été testé.

A 10 ppm on obtient pour cet échantillon, 16% d'inhibition (concentration maximale susceptible d'être testée compte tenu de sa solubilité dans le milieu).

Il serait intéressant, comme dans le cas de l'huile essentielle de *Monodora myristica*, de tester cet échantillon à des concentrations plus élevées en présence de solubilisants comme les cyclodextrines, mais également de tester les autres « chémotypes ».

**Tableau 55 : Principaux constituants des huiles essentielles des feuilles de *Clausena anisata* (Willd). J. D. Hook. ex. Benth. récoltées à différentes périodes à Houin.**

Nom des composés	*IR	5(%)	6(%)	7(%)	8(%)
$\alpha$ -pinène	939	17.1	20.1	10.7	3.2
sabinène	975	6.4	6	7.4	1.1
(Z)- $\beta$ -ocimène	1037	10.3	11.1	6.1	1.5
(E)- $\beta$ -ocimène	1043	8.0	6.3	4.7	1.2
méthyl chavicol	1193	1.0	-	30.5	64.1
$\beta$ -caryophyllène	1441	12.2	12.8	9.7	8.6
$\alpha$ -humulène	1475	14.8	15.2	11.8	8.3
germacrène D	1499	5.5	8.5	4.3	3.1

5 = Récoltées à Houin le 27/12/03; 6 = Récoltées à Houin le 18/04/04

7 = Récoltées à Houin le 26/09/04; 8 = Récoltées à Houin le 31/08/05

\*IR sur une colonne DB1

**2-2-4- Huile essentielle « active » : *Cymbopogon giganteus***

L'action de 3 échantillons (1, 2, 3) d'huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* sur la réaction d'oxydation de l'acide linoléique par la 5-lipoxygénase de soja a été testée et comparée à celle du composé de référence, le NDGA.

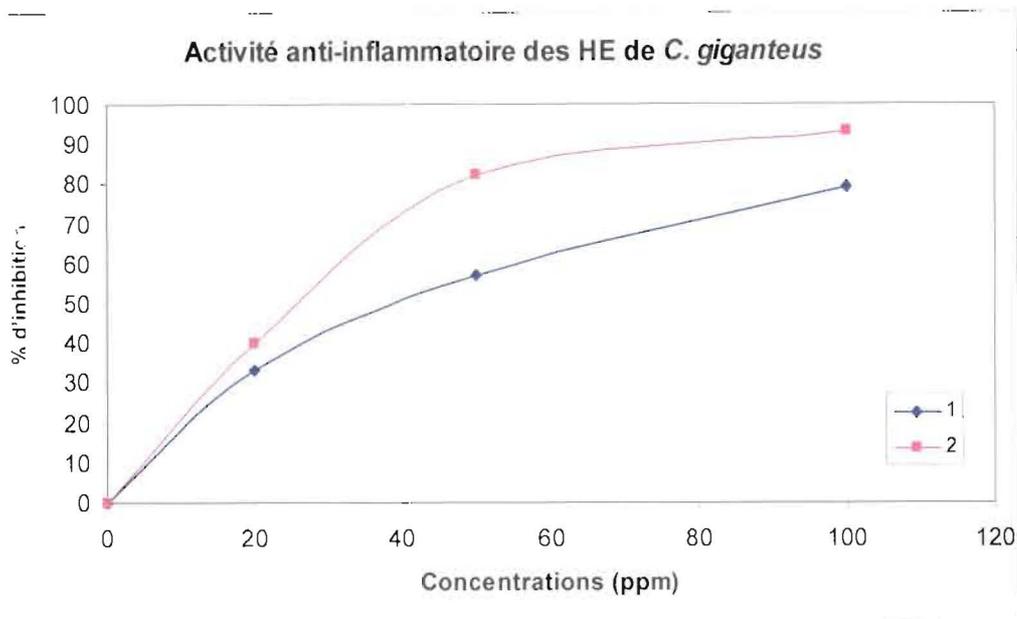
A 100 ppm, tous les échantillons entraînent une inhibition > 50%, une action inhibitrice du même ordre de grandeur est obtenue pour le NDGA à une concentration plus de 100 fois inférieure (Tableau 56).

**Tableau 56 : Activités anti-inflammatoires des différents échantillons d'huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus***

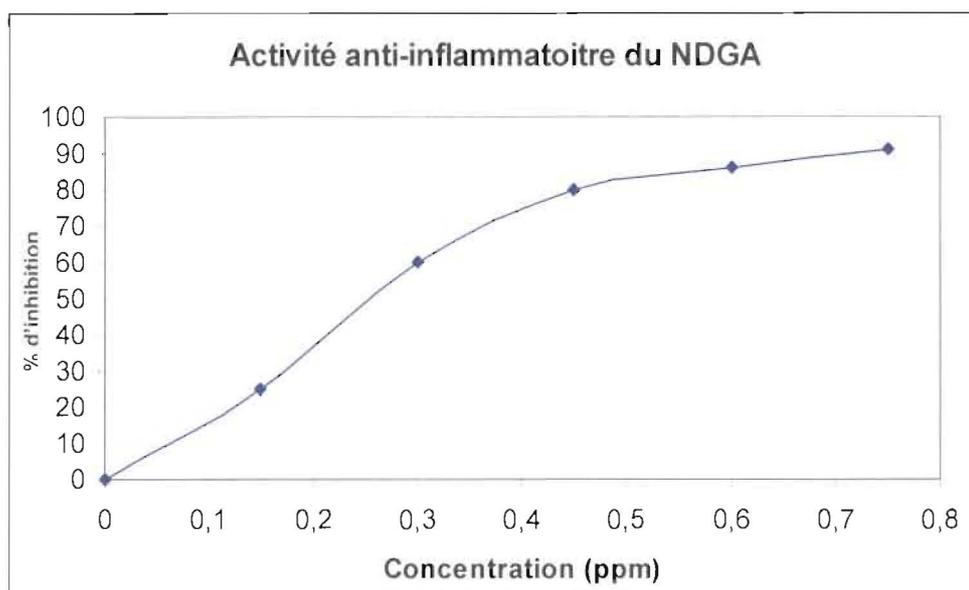
Huile essentielle de <i>C. giganteus</i>	Concentrations (ppm)	Pourcentage d'inhibition (%)	IC50 (ppm)
1 (échantillon récolté à Savalou le 02/01/04)	100	79.3	40
2 (échantillon récoltée à Setto le 13/01/04)	100	93.1	30
3 (échantillon récoltée à Setto le 10/08/04)	100	82	40
NDGA	0.75	91	0.23

L'effet de concentration a été étudié pour chacun des 3 échantillons, ainsi que pour le composé de référence, permettant de calculer leur IC<sub>50</sub>.

Les figures 51 et 52 donnent les représentations graphiques de cette étude pour les échantillons 1 et 2 et pour le NDGA.



**Figure 51:** Activité anti-inflammatoire des échantillons 1 et 2 de *Cymbopogon giganteus*



**Figure 52 :** Activité anti-inflammatoire du NDGA (acide nordihydroguaiarétique)

On trouve un facteur de 130-170 entre les échantillons d'huiles essentielles et le NDGA.

La différence observée pour l'IC<sub>50</sub> du NDGA, déterminée dans le cas de notre étude à 0.23ppm avec celle obtenue par **Baylac et Racine en 2003 (IC<sub>50</sub> = 5ppm)** s'explique probablement par les conditions d'études (lipoxygénase de pomme de terre (*Solenum tuberculosis*, substrat: acide linoléique à pH= 6). Par contre **Sircar et coll. en 1983** ont trouvé

un  $IC_{50} = 6.1\mu M$  avec le même modèle enzymatique (la lipoxygénase de Soja) et le même substrat qui est acide linoléique à pH= 9.

Dans le tableau 57 nous avons représenté les principaux constituants dans les huiles essentielles examinées.

**Tableau 57 : Principaux constituants des huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus***

Nom des composés	*IR	1(%)	2(%)	3(%)
limonène	1029	7.7	1.2	13.7
<i>trans</i> -p-2,8-menthadièn-1-ol	1118	14.3	14	16.4
<i>cis</i> - p-2,8-menthadièn-1-ol	1132	10.1	10.3	9.5
3,9-époxymentha-1,8(10)-diène	1189	21.2	24.3	6.4
<i>trans</i> -p-1(7),8-menthadièn-2-ol*		1.1	1.3	0.3
<i>cis</i> -dihydrocarvone	1193	0.1	0.2	6.4
<i>trans</i> -isopipériténol	1199	7.1	7.6	7.1
<i>trans</i> -dihydrocarvone	1201	0.1	0.2	4.6
M=150	1205	1.6	0.8	1.0
<i>cis</i> -isopipériténol	1215	4.5	5.1	5.9
<i>trans</i> -carvéol	1217	2.5	3.0	0.1
<i>cis</i> -p-1(7),8-menthadièn-2-ol	1229	19.9	22.0	19.4
<i>cis</i> -carvéol	1237	4.2	4.5	2.9
carvone	1244	0.6	1	0.5
périllaldehyde	1272	0.4	0.4	1.8

1 = Récoltées à Savalou le 02/01/04

2 = Récoltées à Setto le 13/01/04

3 = Récoltées à Setto 10/08/04

L'échantillon le plus actif est l'échantillon 2. L'analyse comparative des compositions chimiques pourrait laisser supposer que cette activité provient de la présence des dérivés p-menthadiénols, puisque l'échantillon 2 se caractérise par la teneur la plus élevée en ces composés, au détriment du limonène.

Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en procédant au fractionnement sur florisil de l'huile essentielle de l'échantillon 3 et en testant les différentes fractions obtenues.

Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 58 ci-dessus.

**Tableau 58 : Fractionnement de 2g de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* de Setto 2 (échantillon 3) sur Florisil + activité anti-inflammatoire**

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	HE		
<b>Masse (mg)</b>	25.2	494.9	431.6	44.3	59.5	46.5	258.6	2000		
<b>Concentration (ppm)</b>	100	100	100	100	50	100	100	100	50	
<b>Pourcentage d'inhibition (%)</b>	24	26	18	32	16	14	0	0	82	60

On constate qu'à 100 ppm, le pourcentage d'inhibition est inférieur à celui de l'huile essentielle, quelles que soient les fractions considérées.

La fraction la plus active est la fraction F4, de toute façon moins inhibitrice que l'huile essentielle.

L'analyse du Tableau 59 montre que la fraction F4 est dominée par le *cis*-p-mentha-2,8-diène-1-ol, le *cis*-isopipériténol et la carvone.

On constate donc une fois de plus de la difficulté des opérations de purification bio-guidée, dans la mesure où aucune fraction n'est plus efficace que l'huile essentielle, ce qui laisse supposer qu'il existe, dans l'huile essentielle, une synergie entre différents constituants.

**Tableau 59:** Composition chimique de l'échantillon 3 d'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. (feuilles) et des fractions obtenues par chromatographie liquide/solide

Nom des composés	*IR	3(%)	F1	F2	F3	F4	F5	F6
myrcène	1002	0.1	0.6					
p-cymène	1021	0.4	4.7					
<b>limonène</b>	<b>1029</b>	<b>13.7</b>	<b>90.9</b>					
p-cyménène	1081	0.1	1.9					
nonanal	1092	0.1						
1,3,8-p-menthatriène	1105	0.1	1.1					
<b>trans-p-mentha-2,8-diène-1-ol</b>	<b>1118</b>	<b>16.4</b>		<b>20.6</b>	<b>7.5</b>	<b>0.7</b>	<b>1.0</b>	
<b>cis-p-mentha-2,8-diène-1-ol</b>	<b>1132</b>	<b>9.5</b>		<b>2.7</b>	<b>16.5</b>	<b>19.6</b>	<b>0.9</b>	
trans-époxy limonène	1138	0.1						
tétrahydroacétophénone	1141	0.4			0.8	7.8	3.0	
NI						2.4	0.4	
<b>4-isopropénylcyclohex-2-énone</b>	<b>1155</b>	<b>1.2</b>				<b>2.0</b>	<b>23.9</b>	
p-méthylacétophénone	1170	0.3						
<b>3,9-époxymentha-1,8(10)-diène</b>		<b>6.4</b>		<b>27.4</b>	<b>2.3</b>			
<b>trans-p-mentha-1(7),8-diène-2-ol</b>	<b>1189</b>	<b>0.3</b>		<b>22.3</b>	<b>4.3</b>	<b>0.8</b>	<b>4.2</b>	<b>7.0</b>
cis-dihydrocarvone	1193	6.4		1.1				
<b>trans-isopipériténol</b>	<b>1199</b>	<b>7.1</b>				<b>9.3</b>	<b>4.0</b>	<b>8.4</b>
trans-dihydrocarvone	1201	4.6		2.2				
dihydropérillaldéhyde*	1202	-		0.6	0.7			
<b>M=150</b>	<b>1205</b>	<b>1.0</b>				<b>2.6</b>	<b>30.0</b>	<b>9.5</b>
<b>cis-isopipériténol</b>	<b>1215</b>	<b>5.9</b>			<b>12.1</b>	<b>13.2</b>	<b>2.1</b>	

**Tableau 59:** Composition chimique de l'échantillon 3 d'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. (feuilles) et des fractions obtenues par chromatographie liquide/solide (suite)

Nom des composés	*IR	3(%)	F1	F2	F3	F4	F5	F6
<i>trans</i> -carvéol	1217	0.1			19.7			
M=150 p-mentha-1(7),8-dien-2-one						5.5	1.4	
<i>cis</i> -p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	1229	19.4		18.2	29.1	5.7	3.0	10.7
<i>cis</i> -carvéol	1237	2.9						
M=152	1242	0.1						
carvone	1244	0.5			5.9	14.4	2.5	5.6
hexanoate d'isoamyle	1267	0.2		0.8				
isopipériténone	1270						5.1	25.9
périllaldéhyde	1272	1.8		2.6		-		
alcool de périlla	1295	0.4				1.2	2.2	7.2
oxyde de pipériténone	1369					0.8	1.2	
octanoate d'isoamyle	1468		0.3	0.3				
<b>Composés aliphatiques</b>		<b>0.7</b>						
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		<b>14.4</b>						
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		<b>80.6</b>						
<b>Composés aromatiques et dérivés</b>		<b>0.7</b>						
<b>Total</b>		<b>96.4</b>	<b>99.2</b>	<b>98.8</b>	<b>98.9</b>	<b>86</b>	<b>84.9</b>	<b>74.3</b>

3 = Récoltées à Setto 10/08/04;

\*IR sur une colonne DB1

### 3 - Conclusion sur les activités antiradicalaires et anti-inflammatoires

Tous nos échantillons ont été testés in vitro pour leurs activités antiradicalaires et anti-inflammatoires qui ont été comparées à celles de composés de référence.

Les échantillons les plus actifs sur le plan antiradicalaire sont ceux obtenus à partir d'*Aeolanthus pubescens*, d'*Ocimum gratissimum* et de *Pimenta racemosa*. Ce résultat était attendu compte tenu de leur teneur élevée en constituants phénoliques.

Néanmoins, une comparaison du pouvoir antiradicalaire de ces huiles essentielles avec ceux obtenus avec les échantillons authentiques (thymol, carvacrol et eugénol) indique probablement un effet synergique induit par d'autres composés minoritaires, contenus dans les huiles essentielles, dans la mesure où l'activité observée est plus importante que celle attendue sur la base de leurs teneurs en constituants phénoliques.

Seuls les échantillons d'huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* sont réellement intéressants pour leur activité anti-inflammatoire avec des IC<sub>50</sub> de 30ppm et 40ppm. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle pour de nombreuses affections dont deux applications en rapport avec une activité inflammatoire au niveau de la peau. Des tests in vitro réalisés sur une huile essentielle de la même espèce récoltée en Côte d'Ivoire avaient montré une faible activité inhibitrice de lipoxigénase L-1 de graines de Soja, avec un IC<sub>50</sub> de 130 ppm, soit une activité quatre fois moins importante que celle déterminée dans le cadre de notre étude. La méthode expérimentale adoptée par ces auteurs pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de leurs huiles essentielles était différente de la nôtre, ce qui explique probablement la différence observée.

Ce résultat montre clairement l'importance du choix du modèle enzymatique pour tester les matières premières dans le domaine de l'activité anti-inflammatoire. Il serait intéressant de tester les mêmes échantillons sur d'autres cibles enzymatiques pour contrôler notamment le rôle du modèle choisi sur les résultats de leur évaluation.

## CONCLUSION

## CONCLUSION

La flore béninoise riche et diversifiée dispose de nombreuses espèces aromatiques réputées pour leurs fragrances. Quelques unes ont été introduites mais la plupart poussent spontanément. Ces espèces sont susceptibles de produire des mélanges naturels (huiles essentielles, extraits) originaux recherchés dans des domaines très variés tels que l'alimentation, la parfumerie, la pharmacie, l'industrie et la médecine traditionnelle.

En ce qui concerne particulièrement les huiles essentielles, en plus des utilisations énumérées ci-dessus, elles sont recherchées pour leurs activités biologiques: pouvoir antiseptique, pouvoir contre les affections respiratoires, propriétés anthelminthiques, antibactériennes et antifongiques, pesticides, antiradicalaires et anti-inflammatoires.

Notre étude s'inscrit dans la perspective de la valorisation des huiles essentielles extraites par hydrodistillation des plantes aromatiques dont certaines sont endémiques.

L'objectif de notre étude était de faire de manière approfondie, l'analyse chimique des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques qui semblaient avoir des potentialités intéressantes, sur le plan thérapeutique ou pour des applications cosmétiques et d'évaluer leur activité biologique.

Après une mise au point sur les méthodes d'extraction et d'analyse des huiles essentielles, les résultats de notre étude sont présentés en deux parties :

✓ Dans la partie chimique, les constituants volatils extraits de 15 espèces aromatiques appartenant à 9 familles botaniques, collectées dans différentes régions du Bénin ont été étudiés. Ces différentes familles ont l'avantage de renfermer des espèces aromatiques que l'on retrouve souvent au Bénin; elles sont employées diversement en pharmacopée traditionnelle, en alimentation etc..

L'extraction de ces différentes huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation avec des rendements variant de 0.01% à 2.4%, la valeur minimum correspondant aux feuilles de *Pentadesma butyracea* (Guttiferae) et le rendement maximum étant obtenu avec les feuilles de *Pimenta racemosa* (Myrtaceae).

L'analyse chimique des échantillons met en évidence des compositions chimiques relativement classiques dominées:

➤ Par des structures terpéniques: des monoterpènes (*Monodora myristica*, *Xylopia aethiopica*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum canum*, *Ocimum gratissimum* (fleurs), *Cymbopogon giganteus*, *Cymbopogon nardus*, *Lippia multiflora*, *Clausena anisata*); les sesquiterpènes (*Annona muricata*, *Annona squamosa*, *Commiphora africana*, *Pentadesma butyracea*).

➤ Par des structures phénoliques (*Aeolanthus pubescens*, *Ocimum gratissimum* (feuilles), *Pimenta racemosa*) ou phényl propanoïques, *Clausena anisata* (Houin)

Deux chémotypes (thymol et carvacrol), ont été mis en évidence pour les échantillons d'huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens*.

➤ Parmi les espèces dominées par les monoterpènes, deux d'entre elles se distinguent par des compositions chimiques particulières : l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* se caractérise par la présence constante d'un endopéroxyde dérivé de l' $\alpha$ -terpinène: l'ascaridole tandis que celle de *Cymbopogon giganteus* est dominée par des p-menthadiénols, quelle que soit l'origine géographique de la plante.

Parmi les huiles essentielles présentées, celle obtenue à partir de *Pentadesma butyracea* est décrite pour la première fois.

✓ Dans la partie biologique, les résultats de l'évaluation des propriétés antiradicalaires et anti-inflammatoires de ces huiles essentielles sont présentés.

L'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* a montré un potentiel anti-inflammatoire intéressant. Les huiles essentielles de trois autres espèces, *Aeolanthus pubescens*, *Pimenta racemosa* et *Ocimum gratissimum* (feuilles), riches en composés phénoliques, ont présenté une forte activité antiradicalaire. Une évaluation des fractions chimiques de ces huiles essentielles et de leurs composants majoritaires a permis de mieux appréhender la relation structure/activité de ces échantillons.

L'ensemble des résultats, tant sur le plan chimique que biologique, met en évidence les potentialités de certaines espèces, pour une exploitation de leur huile essentielle à des fins thérapeutiques ou pour des applications cosmétiques.

Les objectifs possibles restent multiples:

- tester les échantillons les plus actifs en utilisant d'autres méthodes d'évaluation, autant pour leurs propriétés antiradicalaires qu'anti-inflammatoires;
- compléter les activités biologiques en s'intéressant à d'autres propriétés tels que leur potentiel antimicrobien ou antifongique;

- poursuivre l'inventaire des plantes aromatiques du Bénin;
- rester en étroite collaboration avec les botanistes afin de pouvoir les repérer et les identifier, sélectionner celles qui n'ont pas été ou très peu étudiées;
- approfondir l'étude des espèces les plus intéressantes pour «préparer» les meilleures conditions d'une exploitation à plus grande échelle, en définissant notamment les conditions optimales de culture et d'exploitation.

Il est important que le Bénin multiplie les initiatives hardies en vue de promouvoir et de renforcer le volume de ses exportations de manière à combler le déficit de sa balance commerciale. L'exploitation des huiles essentielles représente certainement un des secteurs à développer sur le plan économique, en s'appuyant sur l'initiative privée en étroite collaboration avec les services de recherche des laboratoires locaux et étrangers.

**Quatrième Partie:**  
**PARTIE EXPERIMENTALE**

## **1-Traitement du matériel végétal et Extraction**

### **1-1- Traitement du matériel végétal**

Dans la partie des généralités, nous avons évoqué les facteurs qui peuvent influencer la composition chimique d'une huile essentielle. Parmi ceux-ci nous citons le prétraitement du matériel végétal.

La collecte ayant été souvent faite à des endroits éloignés du lieu d'extraction, le matériel végétal était directement séché à l'air libre dans des salles ouvertes ou sous les terrasses pendant 48 heures pour le blocage des réactions enzymatiques pouvant conduire à des modifications de la composition chimique des essences.

### **1-2- L'extraction**

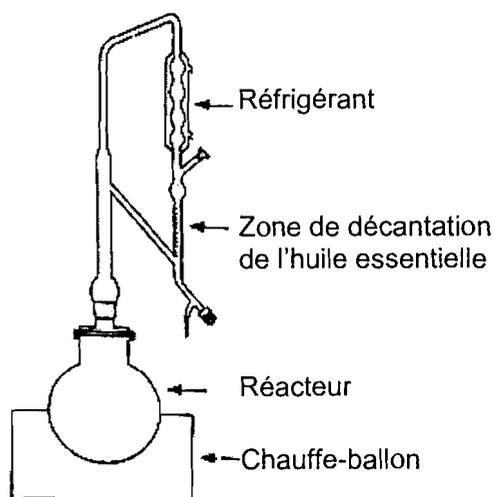
Tous les extraits volatils étudiés dans le cadre de notre travail ont été obtenus par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger (Figure 53).

Le matériel végétal pesé, est introduit dans le réacteur avec une quantité d'eau égale à 10 fois celle du matériel pesé, et porté à ébullition.

L'huile essentielle est entraînée par la vapeur d'eau dans le réfrigérant où elle se condense et tombe dans la tubulure graduée. Elle est séparée par décantation. La phase inférieure aqueuse est recyclée dans le réacteur (Figure 53).

Le volume d'huile essentielle obtenu est lu directement au niveau de la tubulure graduée. L'huile essentielle est ensuite décantée, séchée sur sulfate de sodium et conservée à l'abri de la lumière dans un flacon hermétique à basse température.

Les rendements en huiles essentielles obtenues ont été calculés sur la base du rapport de la masse de l'huile essentielle/poids du matériel végétal. L'état du matériel végétal est précisé dans les résultats.



**Figure 53** : Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger

## 2- Analyse des huiles essentielles

### 2-1- Analyse par chromatographie en phase gazeuse

Les analyses chromatographiques ont été réalisées sur un appareil de type Varian CP-3380, équipé de deux colonnes capillaires (apolaire et polaire) et relié à un intégrateur Varian (Model C-R4A)

#### 2-1-1- Caractéristiques techniques de l'équipement

Le chromatographe Varian CP-3380, est composé de:

- un bloc injecteur capillaire SPL 14 (Split / Splitless),
- un four avec programmation et contrôle de la température,
- 2 colonnes capillaires en silice fondue de 30m de longueur 0,25mm de diamètre interne. Les deux phases stationnaires utilisées étaient le polyéthylène glycol (Carbowax 20M) pour la colonne polaire et le diméthylpolysiloxane (DB-1) pour la colonne apolaire.
- un bloc détecteur à ionisation de flamme (FID),
- un intégrateur Varian (Model C-R4A) équipé d'une imprimante à transfert thermique, d'une unité de lecture de disquettes et d'un écran de visualisation.

### **2-1-2- Conditions de travail**

Les analyses chromatographiques gaz liquide de tous nos échantillons ont été menées dans les mêmes conditions :

- données thermiques : les températures de l'injecteur et du détecteur étaient fixées respectivement à 200°C et 200°C, tandis que celle du four était programmée de 50°C à 200°C avec un gradient de 5°C/min.

- débit des gaz utilisés : pour l'élution, le gaz utilisé était l'azote (gaz vecteur) avec un débit réglé à 0,8mL/min.

- rapport de Split: 1:100

- injection : 1µL d'une solution de 1-10% (dans le pentane, l'éther ou le dichlorométhane suivant la solubilité de l'échantillon).

Les calculs d'indices de rétention ont été réalisés par comparaison des temps de rétention des constituants avec ceux d'un mélange d'alcane (C9-C20 pour DB-1 et C9-C26 pour CWX 20M) obtenus dans les mêmes conditions expérimentales.

## **2-2- Analyse par chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse**

### **2-2-1- Caractéristiques techniques de l'équipement**

➤ Identification à partir des indices de rétention et des spectres de masse

Tous les échantillons d'huile essentielle ont été analysés par CPG/SM, technique consistant à séparer les constituants du mélange sur une colonne montée en série avec un spectromètre de masse. Ainsi, chaque constituant sortant de la colonne, passe directement dans le champ d'ionisation du spectromètre. La molécule, soumise à l'impact électronique est fragmentée. Les spectres de masse obtenus pour chaque composé sont comparés aux données de la littérature ainsi qu'à ceux de la banque de données du laboratoire.

Les couplages CPG/SM ont été réalisés sur un appareil de type Hewlett Packard-Quadrupôle (Model 5970). Le chromatographe était équipé d'une colonne capillaire de silice fondue de 30m de longueur et 0,25mm de diamètre intérieur avec une phase greffée de type diméthylpolysiloxane (DB-1) de 0,25µm d'épaisseur.

### 2-2-2- Conditions de travail

- la température de l'injecteur était fixée à 220°C
- le voltage du spectromètre de masse était de 70eV
- la température du four était programmée de 70° à 200°C avec un gradient de 10°C/min.
- le gaz vecteur (l'hélium) était réglé à un débit de 0,6mL/min.

### 2-2-3- Chromatographie liquide solide.

#### 2-2-3-1- Chromatographie sur couche mince

Les conditions opératoires du fractionnement des huiles essentielles et le suivi de ce fractionnement sont définis en fonction des résultats obtenus par chromatographie sur couche mince (CCM).

#### Composition du réactif de révélation

Condition : 1µL d'huile essentielle est mis en solution (1%) dans de l'éther de pétrole.

Eluant : système de solvants éther de pétrole/éther diéthylique dans les proportions variables (le plus couramment 80/20 (V/V)).

p-anisaldéhyde-acide sulfurique (AS): dans 0.5mL de para anisaldéhyde sont ajoutés 10mL d'acide acétique glacial, 85mL de méthanol et 5mL d'acide sulfurique. La phase est vaporisée avec ce réactif, puis chauffée pendant quelques minutes à 100°C.

#### 2-2-3-2- Fractionnement par chromatographie liquide/solide sur colonne

Plusieurs essais de fractionnement ont été réalisés sur gel de silice (35-70 µm) :

L'essai réalisé sur l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* présenté dans ce travail, a finalement été réalisé sur Florisil<sup>R</sup> (60-100 mesh) [Mg 03 Si; 205455000] Acros Organic.

➤ **Fractionnement sur Florisil.**

Fractionnement de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus*

**Conditions opératoires :** On utilise 60g de Florisil pour 2g d'huile essentielle et des volumes d'élution de 100mL d'un mélange d'éther de pétrole/éther éthylique avec des proportions variant de 100:0 à 0:100 (V/V) jusqu'à l'élution totale.

Les différentes fractions obtenues ont été analysées par chromatographie sur couche mince et les fractions ayant montré le même profil ont été réunies.

**2-2-3-3-Identification par comparaison avec des échantillons authentiques obtenus par hémisynthèse.**

Dans le cas de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus*, nous avons, pour confirmer l'identification des constituants de l'huile essentielle, procédé à l'hémisynthèse de certains d'entre eux et à la transformation chimique de l'huile essentielle.

❖ **Oxydation du limonène en carvone et isopipéritone (Méthode de Guillon et coll., 2000)**

**Mode opératoire**

2.21 g d'hexacarbonyl de chrome (0.0102 mole) sont ajoutés, sous agitation, à une solution préparée par dissolution de 2.8 g (20.5 moles) de limonène dans 75 mL d'acétonitrile, à température ambiante. Une solution d'hydroperoxyde de t-butyle (5.29 g d'une solution à 70% dans l'eau, 0.041 moles) est ensuite additionnée goutte à goutte. Le mélange est mis au reflux pendant une nuit. L'ensemble est refroidi dans un bain de glace, filtré et le précipité est lavé avec du cyclohexane glacé.

Le filtrat est dilué à l'éther éthylique, lavé avec une solution de bisulfite de sodium (1M), à l'eau, puis avec une solution saturée de NaCl et enfin séchée sur du MgSO<sub>4</sub>.

Le rendement brut est de 60%.

❖ **Oxydation de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus***  
**(Méthode de D'Souza et coll., 2004)**

**Mode opératoire**

100 mg de l'huile essentielle mis en solution dans 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont ajoutés à une solution contenant 100 mg de chlorochromate de pyridinium dans 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 2 heures. 30 mL d'Et<sub>2</sub>O sont ajoutés, mis sous agitation pendant une minute puis le mélange est laissé pendant une nuit pour décantation. La phase étherée est décantée, lavée avec du NaOH 7% (3x10 mL), HCl 10% (3x10 mL), NaHCO<sub>3</sub> saturé (2x50 mL), une solution saturée de NaCl (1x50 mL) et enfin séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis évaporée.

**3- Tests biologiques**

**3-1- Activité antiradicalaire**

**3-1-1- Synthèse du chavicol**

Cette synthèse a été réalisée par la déméthylation du 4-allylanisole par BBr<sub>3</sub> (Agharahimi et LeBel, 1995).

**3-1-1-1- Réactifs**

- 4-allylanisole 95% Fluka [A1 156]
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> redistillé
- BBr<sub>3</sub>, 1M dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**3-1-1-2- Mode opératoire**

- Addition goutte à goutte d'une solution de BBr<sub>3</sub> 1M dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3,5 mL) à 0.5 g/mL soit 3.26 mmol de 4-allylanisole en solution dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. L'addition est effectuée à -78°C (l'azote liquide).

- Retour à la température ambiante pendant 30 min
- Agitation lente poursuivie pendant 90 min.

- Addition de 3mL de d'eau dans un bain de glace (réaction violente).
- Agitation pendant 1H.
- Extraction du mélange réactionnel (aqueux) avec 3 x 20mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
- La phase organique regroupée est lavée avec 3x10mL d'une solution saturée de NaCl puis séchée sur MgSO<sub>4</sub>.
- La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM), Révélateur : MnO<sub>4</sub>K ; (Eluant : Ether de Pétrole/AcOEt: 9/1).
- Le produit de la réaction est purifié par flash chromatographie avec 30g de gel de silice (35-70 µm).
- L'élution est réalisée par fractions de 30mL de: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (x2), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (30/1.5), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (30/2).
- Le produit est élué dans la 4ème fraction.
- Masse de produit = 0.413g
- Rendement de la réaction: 95%

### 3-1-2- Tests antiradicalaires

#### 3-1-2-1-Réactifs

- \* DPPH: 2,2-diphénylpicrylhydrazyl [EC: 217-591-8] Aldrich
- \* Méthanol
- \* Ethanol
- \* BHT: t-Butyl-hydroxy toluène [DA, 740-4] Aldrich
- \* BHA: t-Butyl-hydroxy anisole (98%) [16, 737-1] Aldrich
- \* Thymol (> 99%) [89330] Fluka
- \* Carvacrol (98%) [28, 219-7] Aldrich
- \* Eugénol (99%) [4332] Avocado
- \* Acide gallique (97%) [14, 791-5] Aldrich

### **3-1-2-2-Etude spectrophotométrique du pouvoir antiradicalaire**

#### **3-1-2-2-1-Méthode**

La méthode d'évaluation de l'activité antiradicalaire des huiles essentielles est inspirée de celle décrite par **Brand-Williams et coll., 1995 ; Cotelle et coll., 1996; Cuvelier et Richard, 1997 ; Mellors et Tappel, 1996**, puis mise au point par **Agnaniet et coll. en 2004**.

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage de radicaux libres d'une solution de DPPH. Ce piégeage est visualisé par la disparition de la couleur pourpre de la solution qui peut être suivie par spectrophotométrie à 517nm (spectrophotomètre UV-mc2, Safas Monaco).

Les cuves sont laissées dans un bain thermostaté à 30°C et les absorbances (A) des solutions sont mesurées toutes les 10 minutes pendant une heure.

Pour chaque série de mesures, le comportement des solutions en présence d'antiradicalaire est comparé à celui d'une solution de référence (solution de DPPH) sans inhibiteur.

Toutes les mesures ont été répétées au moins 3 fois et les résultats donnés correspondent à la valeur moyenne sur les 3 mesures.

#### **3-1-2-2-2- Préparation des solutions**

##### **3-1-2-2-2-1-Solution de DPPH 100µM**

\* 20mg de DPPH dans 50mL d'éthanol solution mère (SM 1mM)

\* Préparation de la solution de DPPH 100µM : on prélève 5mL de cette solution SM dans une fiole jaugée de 50mL, on complète jusqu'au trait de jauge par de l'éthanol. Le mélange est homogénéisé.

La solution de DPPH étant relativement «instable», la concentration «réelle» est déterminée à partir de la mesure de l'absorbance à 517nm contre l'éthanol.

##### **3-1-2-2-2-2-Préparation du blanc**

Toutes les mesures sont effectuées contre un «blanc» composé de 1900µL (1.9mL) d'éthanol et 100µL (0.1mL) de méthanol soit un volume de 2mL dans la cuve.

### 3-1-2-2-2-3- Préparation des solutions antiradicalaires à tester

#### ➤ Eugénol et BHA

On prépare une solution mère de concentration 1g/L (SM). Pour cela, on dissout 50mg d'eugénol ou de BHA dans un minimum de méthanol. La solution est transvasée dans une fiole jaugée de 50mL et complétée au trait de jauge par du méthanol. On prépare ensuite, à partir de la solution mère, des gammes étalon de [0.02 à 0.4g/L] par dilution dans le méthanol.

Les mesures sont effectuées en introduisant 100 $\mu$ L des différentes solutions dans 1.9mL de la solution de DPPH.

#### ➤ BHT

On prépare une solution mère de concentration 2g/L (SM). Pour cela, on dissout 100mg de BHT dans un minimum de méthanol. La solution est transvasée dans une fiole jaugée de 50mL et complétée au trait de jauge par du méthanol.

Des gammes étalon de [0.04 à 1.6g/L] sont préparées par dilution de la SM dans le méthanol.

Les mesures sont effectuées en introduisant 100 $\mu$ L des différentes solutions dans 1.9mL de solution de DPPH.

#### ➤ Thymol ou carvacrol

On prépare une solution mère de concentration 100g/L (SM). Pour cela on dissout 5g de thymol ou de carvacrol avec un minimum de méthanol. La solution est transvasée dans une fiole jaugée de 50mL et on complète au trait de jauge par du méthanol. On prépare ensuite une gamme étalon à partir de la solution mère de la manière suivante:

Des gammes étalon de [1 à 60g/L] sont préparées par dilution de la SM dans le méthanol.

Les mesures sont effectuées en introduisant 100 $\mu$ L des différentes solutions dans 1.9mL de solution de DPPH.

➤ **Chavicol**

On prépare une solution de concentration **50g/L**. Pour cela on dissout 50mg de chavicol dans 1mL de méthanol.

Les mesures sont réalisées en introduisant 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 30 $\mu$ L, 40 $\mu$ L, ....100 $\mu$ L de cette solution dans 2mL de DPPH

➤ **Acide gallique**

On prépare une solution mère de concentration **0.1g/L (SM)**. On dissout pour cela 10mg d'acide gallique avec un minimum de méthanol. La solution est transvasée dans une fiole jaugée de 100mL et on complète au trait de jauge par du méthanol. Une gamme étalon de [0.004 à 0.04g/L] est préparée par dilution de la SM dans le méthanol.

Les mesures sont effectuées en introduisant 100 $\mu$ L des différentes solutions dans 1.9mL de solution de DPPH.

➤ **Huiles essentielles**

Un premier screening est réalisé en introduisant 10 $\mu$ L d'huiles essentielles pures dans 2 mL de la solution de DPPH.

Les essais sont ensuite réalisés, suivant la réactivité observée, à des concentrations plus élevées (20 $\mu$ L, 30 $\mu$ L, .....80 $\mu$ L) pour les huiles essentielles les moins actives, ou selon la même méthode que celle décrite précédemment pour les référents (gammes de dilution réalisées à partir d'une solution mère) pour les huiles essentielles plus actives.

✓ **Fractionnement des huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens*, d'*Ocimum gratissimum* et de *Pimenta racemosa***

Les huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens*, d'*Ocimum gratissimum* et de *Pimenta racemosa* contiennent des quantités importantes de constituants phénoliques. Nous avons procédé à l'extraction de ces constituants «acides» par traitement acido-basique de façon à tester la fraction «acide» riche en constituants phénoliques et la fraction «neutre». Le mode opératoire suivi est le suivant:

2g d'huile essentielle sont dissous dans 100mL d'éther éthylique. La solution obtenue est traitée avec 3 fois 30mL d'une solution de NaOH 1M. La phase organique renferme les produits «non ionisables» notée F1 (fraction neutre) tandis que la phase aqueuse renferme les phénols sous leur forme ionisée.

✓ **Phase organique (F1):** après décantation, elle est lavée 3 fois avec 20mL d'eau distillée pour revenir à la neutralité, puis séchée sur du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avant d'être évaporée.

Dans certains cas, lorsque l'analyse montre la présence de constituants phénoliques résiduels dans cette phase, le traitement est renouvelé pour obtenir une fraction «neutre» notée F'1.

✓ **Phase aqueuse:** elle est acidifiée avec du HCl à 10%, puis extraite 3 fois avec 20mL d'éther éthylique. Les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau distillée, séchées et le solvant est évaporé.

### **3-2- Activités anti-inflammatoires**

#### **3-2-1-Réactifs**

- \* Enzyme: 5-Lipoxygénase de soja (Fluka: [EC. 1.13. 11.12])
- \* Substrat: Acide linoléique (Sigma Chemical Co [822-17-3])
- \* Dihydrogénophosphate de potassium 99% [EEC231 913 4] Aldrich
- \* Solution d'hydroxyde de sodium (1M)
- \* Eau désionisée
- \* Ethanol
- \* Inhibiteur de référence: Acide Nordihydroguaiarétique (NDGA) [500.38.9]
- \* Inhibiteurs: Huiles essentielles

#### **3-2-2- Etude spectrophotométrique du pouvoir anti-inflammatoire**

##### **3-2-2-1- Méthodes**

Nous avons testé l'action inhibitrice de nos échantillons sur la lipoxygénase de soja en utilisant l'acide linoléique comme substrat.

La réaction enzymatique conduit à :

❖ la formation, à partir des doubles liaisons non conjuguées de l'acide linoléique, d'hydroperoxydes contenant un motif « diènes conjugués » et caractérisés par une absorption à 234nm ce qui permet de suivre leur formation en spectrophotométrie.

L'action des huiles essentielles sur la lipoxygénase est comparée à celle de l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA), reconnu comme inhibiteur efficace de cette enzyme et qui est choisi comme référence.

### **3-2-2-2- Préparation des solutions**

#### **➤ Solution Tampon 0.1M à pH = 9**

Dissoudre 13.6g de dihydrogénophosphate de potassium dans 500mL d'eau distillée, ramener le pH du mélange à 9 avec une solution d'hydroxyde de sodium NaOH (1M) et compléter à 1L dans une fiole jaugée avec de l'eau.

#### **➤ Substrat (Solution d'acide linoléique 100µM)**

Dissoudre 30mg d'acide linoléique (substrat) dans 100mL d'une solution tampon 0.1M (fiole jaugée de 100mL). Cette solution est ensuite diluée 10 fois dans du tampon phosphate pour obtenir la solution 100µM utilisée pour les tests.

#### **➤ 5-lipoxygénase de soja**

Dissoudre 10 mg de 5-lipoxygénase de soja dans 1 mL de solution tampon 0.1M, (solution mère SM).

Préparer à partir de cette solution mère, plusieurs lots de solution d'enzyme de la façon suivante: prélever 10 µL de la solution mère (SM) et compléter à 1 mL avec la solution tampon (ajouter 990 µL).

Ces «lots» sont conservés au congélateur jusqu'à utilisation. Pendant la série d'expérience, le «lot» de la solution enzymatique utilisée est conservé dans la glace.

#### **➤ Solution d'acide norhydroguaiarétique (NDGA)**

Dissoudre 20 mg de NDGA dans 10 mL d'éthanol (2 g/L).

Préparer une solution à 0.2 g/L en effectuant une dilution par 10 dans l'éthanol.

Préparer à partir de la solution à 0.2 g/L, une gamme de solutions de concentrations comprises entre 20 et 200mg/L.

#### ➤ Solutions d'huiles essentielles

Dissoudre 100 mg de l'huile essentielle dans 5 mL d'éthanol (solution mère, SM à 20g/L).

Une gamme de solutions est préparée à partir de la solution mère par dilution de [0.2 à 20g/L] dans l'éthanol.

#### 3-2-2-3 Conditions de mesure

2mL de solution de substrat sont introduits dans chaque cuve. On ajoute 10µL d'éthanol au contenu de la première cuve qui sert de témoin, et 10µL de la solution d'huile essentielle ou de NDGA dans les cuves de mesure.

Les solutions testées sont donc diluées par un facteur de 200 ce qui conduit, pour les huiles essentielles, à tester une gamme de concentration de 1 à 100ppm et pour le NDGA de 0.1 à 1 ppm.

#### 3-2-2-4-Cinétique

Les cuves contenant les solutions (substrat +inhibiteur) sont placées dans le portoir multi cuves thermostaté à 30°C et laissées 5 min pour stabilisation de la température; 50µL de la solution d'enzyme soit 0.046 unités pour 2mL sont ajoutés; les cuves sont agitées rapidement puis replacées dans le porte cuves et la cinétique est lancée à 234 nm. La durée de la mesure est de 6 minutes avec une mesure de l'absorbance toutes les 9 secondes.

La constante de vitesse est obtenue à partir de la vitesse initiale de la réaction enzymatique, obtenue sur les 27 premières secondes de la réaction.

Les résultats obtenus avec les différents échantillons sont systématiquement comparés à celui du «témoin», réalisé dans les mêmes conditions en absence d'inhibiteur.

### 3-2-2-5-Traitement des résultats

#### ❖ Calcul des vitesses initiales

Les vitesses initiales sont calculées sur la partie «linéaire» de la courbe cinétique à partir de l'équation suivante :

$$V_i = \frac{A(t=27s) - A(t=0)}{t(27s)}$$

A (t = 0) = Absorbance mesurée à t = 0

A (t = 27s) = Absorbance mesurée à t = 27s

Ces vitesses sont déterminées en absence et en présence d'inhibiteur.

#### ❖ Calcul du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition est déterminé d'après l'équation suivante:

$$\%dIC = \frac{V_T - V_I}{V_T} \times 100$$

$V_T$  = Vitesse initiale mesurée pour le témoin

$V_I$  = Vitesse initiale mesurée en présence d'inhibiteur (NDGA ou huile essentielle)

#### ❖ Détermination de l'activité anti-inflammatoire

La courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations en inhibiteur permet de déterminer la concentration correspondant à 50% d'inhibition ( $IC_{50}$ ).

Un premier screening des huiles essentielles est réalisé à 100ppm et les dilutions ne sont effectuées qu'en cas de réponse positive.

# BIBLIOGRAPHIE

## Bibliographie

**Abad M. J., Bermejo P., Villar A.,** The activity of flavonoids extracted from *Tanacetum microphyllum* DC. Compositae on soybean lipoxygenase and prostaglandin synthetase. *Gen Pharmac*, **1995**, 26 (4), 815-819.

**Abaul J., Bourgeois P., Bessière J. M.,** Chemical composition of the essential oils of chemotypes of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (P. Miller) J. W. Moore (Bois d'Inde) of Guadeloupe (F. W. I.), *Flav. Fragr. J.*, **1995**, 10, 319-321.

**Abbiw D. K.,** Useful plants of Ghana West African use of wild and cultivated plants. Intermediate Technology Publications and the Royal Botanic Gardens Kew, **1990**, ISBN N° 1-85339-043-7 or 1685339-080-1 Hardback

**Abegaz B., Asfaw N., Lwande W.,** Constituents of the essential oils from wild and cultivated *Lippia adoensis* Hochst. Ex Walp., *J. Essent. Oil Res.*, **1993**, 5, 487-491.

**Abegaz B., Dagne E.,** Monoterpene-rich resin from Kenyan Burseraceae, *Flav. Fragr. J.*, **1989**, 2, 115-118.

**Abena A. A., Diatewa M., Gakosso G., Gbeassor M., Hondi-Assah Th., Ouamba J. M.,** Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*, *Fitoterapia*, **2003**, 74 (3), 231-236.

**Aberra G., Dawit A., Asfaw D., Zew dneh M., Frehiwot A., Frehiwot T., Tesfaye K., Kebede K. U., Kidist Y., Teklele B., Bisrat H. M., Mulugeta G.,** Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles, *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 97 (3), 421-427.

**Adams R. P.,** Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL **2001**.

**Addae-Mensah I., Asomaning W. A., Oteng-Y. A.,** Creation of small enterprises Togo-Benin-Ghana. Commercialization of essential oils for small and large scale Saop and Cosmetics Industries-The Ghana Experience with Cooperative Farmers, *Actes du colloque de Saint-Jean-sur-Richelieu* (Canada), 18-24 octobre, **1995**.

**Addae-Mensah I., Asomaning W. A., Oteng-Yeboah A., Garneau F. X., Gagnon H., Jean F. -I., Moudachirou M., Koumaglo K. H.,** (E)-anethole as a major essential oil constituent of *Clausena anisata*, *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8, 513-516.

**Adegoke G. O., Makinde O., Falade K. O., Uzo-Peters I.,** Extraction and characterization of antioxydants from *Aframomum melegueta* and *Xylopia aethiopica*, *Eur. Food Res. Technol.*, **2003**, 216 (6), 526-528.

**Adjanohoun E. J., Abel A., Aké Assi L., Brown D., Chetty K. S., Chong-Seng L., Eyme J., Friedman F., Gassita J. N., Goudote E., Govinden P., Keita A., Koudogbo B., Lai-Lam G., Landreau D., Lionnet G., Soopramanien A., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques aux Seychelles, ACCT, Paris, 1983, p. 170.**

**Adjanohoun E. J., Adjakidje V., Ahyi M. R. A., Ake Assi L., Akoegninou A., d'Almeida J., Apovo F., Boukef K., Chadare M., Cusset G., Dramane K., Eyme J., Gassita J. N., Gbaguidi N., Goudote E., Guinko S., Houngnon P., Issa L., Keita A., Kiniffo H. V., Kone-Bamba D., Musampa Nseyya A., Saadou M., Sodogandji T., de Souza, S., Tchabi A., Zinsou Dossa C., Zohoun T., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin, 1989, ACCT, Paris.**

**Adjanohoun E. J., Ahyi M. R. A., Ake Assi L., Akpgana K., Chibon P., El-Hadji A., Eyme J., Garba M., Gassita J. N., Gbeassor M., Goudote E., Guinko S., Hodouto K. K., Houngnon P., Keita A., Keoula Y., Klugla-Ocloo W. P., Lo, I., Siamevi K. M., Taffame K. K., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo, 1986, ACCT, Paris, p.671.**

**Adjanohoun E. J., Ahyi M. R. A., Aké Assi L., Baniakina J., Chibon P., Doulou V., Enznza A., Eyme J., Goudote E., Guinko S., Keita A., Mbemba C., Mollet J., Moutsambote J. M., Mpati J., Sita P., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Congo, 1988, ACCT, Paris**

**Adjanohoun E. J., Ahyi M. R. A., Ake Assi L., Dan Dicko L., Daouda H., Delmas M., de Souza S., Garba M., Guinko S., Kayonga A., N'Golo D., Raynal J. L., Saadou M., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger, 1985, ACCT, Paris, p. 250.**

**Adjanohoun E. J., Ake Assi L., Ahmed A., Eymé J., Guinko S., Kayonga A., Keita A., Lebras M., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques aux Comores, 1982, ACCT, Paris, p216.**

**Adjanohoun E. J., Aké Assi L., Chibon P., Cuffy S., Darnault J. J., Edwards M. J., Etienne C., Longuefosse J. L., Portecop J., Soopia-manien A., Troisan J., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à la Dominique (Commonwealth of Dominica), 1985, ACCT, Paris.**

- Adjanohoun E. J., Ake Assi L., Chibon P., De Vecchi H., Duboze E., Eyme J., Gassita J. N., Goudote E., Guinko S., Keita A., Koudogbo B., Le Bras M., Mourambou I., Mve-Mengome E., Nguema M. G., Olome J. B., Posso P., Sita P., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Gabon, 1984, ACCT, Paris
- Adjanohoun E. J., Ake Assi L., Eyme J., Gassita J. N., Goudote E., Guého J., Ip F. S. L., Jackaria D., Kalachand S. K. K., Keita A., Koudogbo B., Landreau D., Owadally A. W., Soopramanien A T., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à Maurice (Iles Maurice et Rodrigues), 1983, ACCT, Paris, p. 214.
- Adjanohoun E. J., Aké Assi L., Floret J. J., Guinko S., Koumaré M., Ahyi A. M. R., Raynal J., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali, 2<sup>ème</sup> Ed., 1979, ACCT, Paris.
- Adjanohoun E. J., Floret J. J., Ginko S., Koumare M., Ahyi M. R. A., Raynal J., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali, 4<sup>ème</sup> Ed., 1985, ACCT, Paris, p. 249.
- Adjanohoun E., Ake Assi L., Chibon P., Cuffy S., Darnault J. J., Edwards M. J., Etienne C., Eyme J., Goudote E., Jeremie J., Keita A., Longuefosse J. J., Portecop J., Soopramanien A., Troian J., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à la Dominique, 1985, ACCT, Paris.
- Adjanohoun E.J., Aké Assi L., Ahmed A., Eyme J., Guinko S., Kayonga A., Keita A., Lebras M., Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques aux Comores, 1982, ACCT, Paris.
- AFNOR, Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles, Association Française de Normalisation, Tome 2, vol 1, Paris, 2000, 79-86.
- Agharahimi M. R., LeBel N. A., Synthesis of (-) - monoterpenylmagnolol and magnolol, *J. org. chem.*, 1995, 60 (6), 1856-1863.
- Agnaniet H, Menut C, Bessière J. M., Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XLIX: Chemical composition of essential oils of the leaf and rhizome of *Aframomum giganteum* K. Schum. from Gabon, *Flav. Fragr. J.* 2004, 19: 205-9.
- Agnaniet H., Anguillet J. J., Bessière J. M., Menut C., Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XLVII. Chemical and biological investigation of *Ocimum* species from Gabon, *J. Essent. Oil Res.*, 2005(a), 17 (4), 466-470.

**Agnaniet H., Makani T., Akagah A., Menut C., Bessière J M.,** Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XLV. Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils from *Lippia multiflora* Mold. growing in Gabon, *Flav. Fragr. J.*, **2005**, 20 (1), 34-38.

**Agnaniet H., Menut C., Bessière J. M.,** Aromatic Plants of Tropical Central Africa. Part LII\*. Comparative study of the volatile constituents from barks of four Annonaceae species growing in Gabon, *J. Essent. Oil Bear. Plants*, **2004**, 7 (3), 201-209.

**Ahmed A. A.,** Highly oxygenated monoterpenes from *Chenopodium ambrosioides*, *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 983-991.

**Alexander M.,** Aromatherapy and immunity: how the use of essential oil aids immune potentiality. Part 3. Immune responses to inflammation and essential oils useful in inhibiting them, *Int. J. Aromatherapy*, **2001**, 11 (4), 220-224.

**Ali M. E., Shamsuzzaman A. M.,** Investigations on *Ocimum gratissimum* Linn. III, Constituents of the essential oil, *Sci. Res. (Dacca)*, **1968**, 5, 91-94 in C.A., **1967**, 70, 60746c.

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

**Amano H., Hayashi I., Endo H., Kistasato H., Yamashina S., Mauyama T., Kobayashi M., Satoh K., Narita M., Sugimoto Y., Murata T., Yoshimura H., Narumiya S., Majima M.,** Host prostaglandin E2-EP3 signaling regulated tumor-associated angiogenesis and tumor growth, *J. Exp. Med.*, **2003**, 197 (2), 221-232.

**Amvam H. P., Biyiti L., Tchoumboungang F., Menut C., Lamaty G., Bouchet Ph.,** Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon, *Flav. Fragr. J.*, **1998**, 13, 107-114.

**Andranoelisoa H. S., Menut C., Collas de Chatelperron P., Saracco J., Ramanoelina P., Danthu P.,** Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oils from *Ravensara aromatica* Sonnerat, a tree endemic to Madagascar, *Flav. Fragr. J.*, **2006**, in press.

**Asekun O. T., Adeniyi B. A.,** Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopiya aethiopica* from Nigeria, *Fitoterapia*, **2004**, 75 (3-4), 368-70.

**Asekun O. T., Kunle O.,** The chemical constituents of *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich from Nigeria, *J. of Essent. Oil-Bearing Plants*, **2004**, 7 (2), 186-9.

**Aurore G. S., Abaul J., Bourgeois P., Luc J.**, Antimicrobial and antifungal activities of the essential Oils of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* P. Miller (J. W. Moore) (Myrtaceae), *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, 10 (2), 161-164.

**Avlessi F., Alitonou G., Sohounhloue D. K., Bessière J. M., Menut C.**, Aromatic Plants of Tropical West Africa. Part XV. Chemical and biological evaluation of leaf essential oil of *Commiphora africana*. from Benin, *J. Essent. Oil Res.*, **2005**, 17, 569-571.

**Avlessi F., Alitonou G., Sohounhloue D. K., Menut C., Bessière J. M.**, Aromatic Plants of Tropical West Africa. Part XIV. Chemical and Biological Investigation of *Lippia multiflora* Mold. essential oil from Benin, *J. Essent. Oil Res.*, **2005**, 17, 405-407.

**Avlessi F., Dangou J., Wotto V. D. Alitonou G. A., Sohounhloue D. K., Menut C.**, Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook, *C. R. Chimie*, **2004**, 7, 1057-1061.

**Awuah R. T., Kpodo K. A.**, High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in stored groundnut in Ghana and the use of microbial assay to assess the inhibitory effects plant extracts on aflatoxin synthesis, *Mycopathologia*, **1996**, 134 (2), 109-114.

**Ayedoun A. M., Adeti S. B., Menut C., Lamaty G., Bessière J. M.**, Aromatic plants from Tropical West Africa. IV. Chemical composition of leaf oil of *Pimenta racemosa* (Miller) J. W. Moore var. *racemosa* from Benin, *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8 (2), 207-209.

**Ayedoun A. M.**, Contribution à la connaissance chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques du Bénin en vue de leur valorisation, **1995**, Thèse de doctorat de l'Université Nationale du Bénin.

**Ayedoun M. A., Houenon J. G., Sossou P. V., Menut C., Lamaty G., Bessière J. M.**, Aromatic Plants of Tropical West Africa. V. Major components of the leaf and fruit essential oils of *Clausena anisata* (Willd.) J.D. Hook. from Benin, *J. Essent. Oil Res.*, **1997**, 9, 247-248.

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

**Ayedoun M. A., Moudachirou M., Tomi F., Casanova J.**, Identification par RMN du carbone-13 et par CPG/SM des principaux constituants des huiles essentielles des feuilles de *Xylopi aethiopica* (Dunal). Richard et de *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl. du Bénin, *J. S. O. A. CHIM*, **1997**, 003, 29-35.

- Ayedoun M. A., Sohounhloue D. K., Menut C., Lamaty G., Molangui T., Casanova J., Tomi F.**, Aromatic Plants of Tropical West Africa. VI.  $\alpha$ -Oxobisabolene as main constituent of the leaf essential oil of *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl. from Benin., *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, 10 (1), 105-107.
- Ayedoun, A. M., Adeoti B. S., Sossou P.V.**, Influence of fruit conservation methods on the essential oil of *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Richard from Benin, *Flav. Fragr. J.*, **1995**, 5/568
- Ayisi N. K., Nyadedzor C.**, Comparative in vitro effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchormea cordifolia*, and *Elaeophorbia drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections, *Antiviral Res.*, **2003**, 58 (1), 25-33.
- Balbaa S. S. I., Huggag M. Y., Taha K. Y.**, Study of volatile oil content of the leaves of *Annona squamosa* growing in Egypt, *Egypt. J. Sci.*, **1977**, 18 (1), 1-8.
- Banquar S. R.**, The role of traditional medicine in a rural medicine. In: Sindiga I, Nyaigattichacha C, Kanunah MP (Eds), Traditional Medicine in Africa. Nairobi, *English Press Ltd*, **1993**.
- Bassole I. H. N., Nebie R., Savadogo A., Ouattara C. T., Barro N., Traore S. A.**, Composition and antimicrobial activities of the leaf and flower essential oils of *Lippia chevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso, *African J. Biotechnol.*, **2005**, 4 (10), 1156-1160.
- Bassole I. H. N., Ouattara A. S., Nebie R., Ouattara C. A. T., Kabore Z. I., Traore S. A.**, Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso, *Phytochem.*, **2003**, 62 (2) 209-212.
- Baylac S., Racine P.**, Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts, *Int. J. Aromatherapy*, **2003**, 13 (2/3), 138-142.
- Bedrossian A. G., Beauchamp P. S., Bernichi B., Dev V., Kitaw Kitaw Z., Rechtshaffen H., Bottni A. T. H. H.**, Analysis of North American *Chenopodium botrys* essential oil isolation and structure of two new sesquiterpene alcohols, *J. Essent. Oil Res.*, **2001**, 13 (6), 393-400.
- Bello A.**, Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle chez les Guizica, au Cameroun, Thèse de Pharmacie, n° 14, Université de Dakar, **1984**, Sénégal.
- Bello A., Pino J., Marbot R., Urquiola A., Aguero J.**, Volatile components of Myrtaceae plants from Western Cuba, *Revista CENIC, Ciencias Quimicas*, **2001**, 32 (3), 143-147.

- Bello A., Rodriguez M. L., Castineira N., Urquiola A., Rosado A., Pino J. A.**, Chemical composition of the leaf oil of *Pimenta racemosa* (Mill.) J. Moore from Western Cuba, *J. Essent. Oil Res.*, **1995**, 7 (4), 423-424.
- Bello A., Urquiola A., Garcia J. J., Rosado A., Pino J. A.**, Essential oil from leaves of *Pimenta racemosa* (Mill) J. Moore (Myrtaceae) from Western Cuba, *Ingenieria y Ciencia Quimica*, **1998**, 18 (1), 21-23.
- Benjarano P. F.**, Management of anti-inflammatory pain with selective COX-2 inhibitors: promises and facts, *Curr. Rev. Pain.*, **1999**, 3, 432-439.
- Berhaut J.**, Flore illustrée du Sénégal, Dicotylédones, Tome 2, Balanophoracées à Composées, Dakar, **1974**.
- Bissangou M. F.**, Contribution à l'étude des composés organiques volatils extraits des plantes aromatiques d'Afrique subsaharienne, **1993**, Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier 2.
- Bose P. K., Chakravarti S., Barua A. K.**, Chemical examination of *Clausena excavata*, *J. Ind. Chem. Soc.*, **1973**, 50 (11), 753-754.
- Boti J. B.**, Contribution à la caractérisation des plantes aromatiques de Côte d'Ivoire et de Corse. Apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles et d'un extrait, **2004**, Thèse de Doctorat des Universités de Corse Pascal Poali et de Cocody-Abidjan.
- Boti J. B., Muselli A., Tomi F., Koukoua G., N'Guessan Y. T., Costa J., Casanova J.**, Combined analysis of *Cymbopogon giganteus* Chiov. leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR, *C. R. Chimie*, **2006**, 9, 164-168.
- Bouquet A.**, Plantes médicinales du Congo-Brazzaville: *Uvariopsis*, *Pauridiantha*, *Diospyros*. ORSTOM, Paris, **1972**.
- Braga F. C., Wagner H., Lomberdi J. A., de Oliveira A. B.**, Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase, *Phytomed.*, **1999/2000**, 6 (6), 447-452.
- Brand-Williams W., Cuvelier M-E., Berset C.**, Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxydant Activity, *Lebensm.-Wiss. U. Technol.*, **1995**, 28, 25-30.
- Brophy J. J., Goldsack R. J.**, The essential oils of the Australian species of *Xylopi* (Annonaceae), *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, 10, 469-472.
- Brunel J. F., Scholz H., Scholz-Khün U., Berg C.C., Butzin F, Cusset C., Ern H., Hakki M. I., Hiekpo P., Lack H. W., Leewemberg A. J. M., Leuenberg B. E., Potzal E., Raadts E., Timler F. K., Zepernick B.**, *Flore analytique du Togo. Phanérogames*, GTZ, Eschborn, *Allemagne*, **1984**.
- Bruneton J.**, *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie*. Lavoisier Paris, **1987**.

- Bruneton J.**, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, 3<sup>ème</sup> Edition Tec et Doc, Lavoisier Paris, 1999, 1120p.
- Burt S. A., Reinders R. D.**, Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, 36 (3) 162-167.
- Cavalli J. F., Tomi F., Bernardini A. F., Casanova J.**, Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC/MS and <sup>13</sup>C- NMR Spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound, *Phytochem. Anal.*, 2004, 15, 275-279.
- Chagonda L. S., Makanda C. D., Chalchat J. C.**, The essential oils of *Ocimum canum* Sims (basilic camphor) and *Ocimum urticifolia* Roth from Zimbabwe, *Flav. Fragr. J.*, 2000, 15, 23-26.
- Chalchat J. C.**, Les antioxydants naturels: distribution dans le règne végétal, *Revista Italiana EPPOS*, 1997, numero spécial, 231-234
- Chalchat J. C., Garry R. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R., Chopineau J.**, Correlation between chemical composition and antibacterial activity. VI. Activity of some african essential oils, *J. Essent. Oil Res.*, 1997, 9(1); 67-75.
- Chalchat J. C., Garry R. P., Sidibe L., Harama M.**, Aromatic plants of Mali (II): Chemical composition of essential oils of *Ocimum canum* Sims., *J. Essent. Oil Res.*, 1999, 11, 473-476.
- Chalchat J. C., Garry R. Ph., Harama M., Sidibé L.**, A study of plants from Mali. Chemical composition of essential oils of two *Cymbopogon* varieties: *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus*, *Revista Italiana EPPOS*, 1998, 741-752.
- Chalchat J. C., Gary R. Ph., Harama M., Sidibe L.**, Aromatic plants from Mali. *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum canum* Sims., *Revista Italiana EPPOS*, 1996, 7, 618-626.
- Chalchat J. C., Moudachirou M., Yayi E.**, Chemical composition of the essential oils from Benin: *Ocimum basilicum*, *O. canum* and *O. gratissimum* L., *Revista Italiana EPPOS*, 1997, 551-560.
- Chandrashekar K. S., Joshi A. B.**, Antimicrobial efficacy of essential oil of *Cymbopogon* species, *Indian Perfum.*, 2004, 48 (3), 327-329.
- Chaumont J. P., Mandin D., Sanda K., Koba K., de Souza C. A.**, In vitro antimicrobial activities of five essential oils of Lamiaceae of Togo against representative strains of cutaneous microflora, *Acta Botanica Gallia*, 2001, 148 (2), 93-101.

**Chowdhury J. U., Yusuf M., Begum J., Mondello L., Previti P., Dugo G.,** Studies on the essential oil bearing plant of Bangladesh. Part IV. Composition of the leaf oils of three *Cymbopogon* species: *C. flexuosus* (Nees ex Steud.) Wats., *C. nardus* (L.) Rendle var. *confertiflorus* (Steud.) N. L. Bor and *C. martinii* (Roxb.) Wats. var. *martinii*, *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, 10, 301-306.

**Cimanga K., Apers S., de Bruyne T., Van Miert S., Hermans N., Totté J., Pieters L., Vlietinck A., Kambu K., Tona L.,** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, *J. Essent. Oil Res.*, **2002a**, 14 (5), 382-387.

**Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totté J., Pieters L., Vlietinck A. J.,** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, *J. Ethnopharmacol.*, **2002b**, 79 (2), 213-220.

**Cotelle N., Bernier J-L., Catteau J-P., Pommery J., Wallet J-C., Gaydou E.,** Antioxidant Properties of Hydroxy-flavones, *Free Radical Biology and Medicine*, **1996**, 20 (1), 35-43.

**Courtin O.,** (Clarins S. A.), *Eur. Pat. Appl.*, **1986**, 13pp., Coden:EPXXDW EP 180505 A1 19860507. (CAN 105: 102350 AN 1986: 502350).

**Craveiro A. A., Fernandes A. G., Sousa Andrade C. H., De Abreu Matos F. J., De Alencar J. W., Lacerda M. M. I.,** Oleos Essenciais de Pllantas do Nordeste., Universidade Federale do Ceara, Fortaleza, Brazil, **1981**, p. 25.

**Croteau F.,** Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the Essential Herbs: spices and medicinal plants; Recent advances in botany, horticulture and pharmacology. Vol. 1, Craken, Simon, Oryx Press, Phœnix, **1986**.

**Cuvelier M. E., Martel P.,** Additifs antioxydants, dans: **Multon J. L.,** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires, Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris, **2002**, 207-231.

**Cuvelier M. E.,** Molécules antioxydantes, relation structure-activité, *Revista Italiana EPPOS*, **1997**, numéro spécial, 201-211.

**Cuvelier M. E., Richard H.,** Mesure de l'efficacité des antioxydants, *Revista Italiana EPPOS*, **1997**, numéro spécial, 189-198.

**D'Souza A. M., Paknikar S. K., Dev V., Beauchamp P. S., Kamat S. P.,** Biogenetic-type synthesis of (+)-Cymbodiacetal, a constituent of *Cymbopogon martinii*, *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 700-702.

- De Billerbeck V.G., Roques C.G., Bessière J. M., Fonvieille J. L., Dargent R.,** Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*, *Can. J. Microbiol.*, **2001**, 47 (1), 9-17.
- De Medici D., Pieretti S., Salvatore G., Nicoletti M., Rasoanaivo P.,** Chemical analysis of essential oils of Malagasy medicinal plants by gas chromatography and NMR Spectroscopy, *Flav. Fragr. J.*, **1992**, 7, 275-281.
- De Vasconcelos S. M. G., Dos Santos R. J. A., Machado M. I. L.,** Volatile constituents from leaf, inflorescence and root oils of *Ocimum americanum* L. grown in north-eastern Brazil, *Flav. Fragr. J.*, **2003**, 18 (4) 303-304.
- Delepaul Q., De Billerbek V. G., Roques C. G., Michel G., Marquier-Vinuales C., Bessière J. M.,** The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods, *J. Essent. Oil Res.*, **2000**, 12 (2), 256-266.
- Dembélé 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, **1988**, Côte d'Ivoire.
- Denys J. C., Simon J. E.,** A new geraniol chemotype of *Ocimum gratissimum* L., *J. Essent. Oil Res.*, **1992**, 4, 231-234.
- Djibo A. K., Samate A. D., Nacro M.,** Chemical composition of the essential oil of *Ocimum americanum* Linn. syn. *Ocimum canum* Sims from Burkina Faso, *C. R. Chimie*, **2004**, 7 (10-11), 1033-1037.
- Duke J. A.,** Handbook of Medicinal Herbs, *CRC Press*, Florida, **1986**, 134-147.
- Ekundayo O. Hammerschmidt F. J.,** Constituents of the essential oil of *Monodora myristica* seeds, *Fitoterapia*, **1988**, 59 (1), 52-4.
- Ekundayo O.,** A review of volatiles of the Annonaceae, *J. Essent. Oil Res.*, **1989**, 1 (5), 223-245.
- Ekundayo O.,** Essential oil. VIII. Volatile constituents of the leaves of *Ocimum viride*, *Planta Med.*, **1986**, 3, 200-202.
- Ekundayo O., Laakso I., Hiltunen R.,** Constituents of the volatile oil from leaves of *Ocimum canum* Sims., *Flav. Fragr. J.*, **1989**, 4, 17-18.
- Ekundayo O., Oguntimein B. O., Hammerschmidt F. J.,** Constituents of the essential oil of *Clausena anisata* leaves, *Planta Med.*, **1986**, 6, 505-506.
- Erman W. F.,** Chemistry of Monoterpenes, part B, Marcel Dekker, New York, **1985**.
- Escarraman M. S., Del Refugio M., Juarez F., Gonzalez,** Determination of seven flavor components of custard apple by gas chromatography, *Technol. Aliment.*, **1982**, 17 (6), 3-4, 6-7.

**Eyele-Mve-Mba C.**, Contribution à l'étude chimique des constituants volatils extraits de plantes aromatiques de l'Afrique subsaharienne, 1997, Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier 2.

**Fekam B. F., Amvam Zollo P. H., Menut C., Lamaty G., Bessière J. M.**, Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXVII. Comparative study of the volatile constituents of five Annonaceae species growing in Cameroon, *Flav. Fragr. J.*, 1996, 11 (6), 333-338.

**Fekam B. F.**, Huiles essentielles de quelques Annonacées du Cameroun: teneur, caractéristiques chimiques et propriétés pharmacodynamiques, 1992, Thèse de doctorat de l'Université de Yaoundé.

**Fekam B. F., Ngouana V., Amvam Zollo P. H., Menut C., Bessière J. M., Gut Jiri, Rosenthal P. J.**, Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants, *Phytochem.*, 2003, 64 (7), 1269-75.

**Fernandez A., Alvarez A., Garcia M. D., Saenz M. T.**, Anti-inflammatory effect of *Pimenta racemosa* var. *ozua* and isolation of the triterpene lupeol, *Farmaco*, 2001b, 56 (4), 335-338.

**Fernandez M. A., Tomos M. P., Garcia M. D., De las Heras B., Villar A. M., Saenz M. T.**, Anti-inflammatory activity of abietyl acid, a diterpen isolated from *Pimenta racemosa* var. *racemosa*, *J. Pharm.*, 2001a, 53 (6), 867-872.

**Formacek V., Kubeczka K. H.**, Essential oil analysis by capillary gas chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy, John Wiley and Sons, Bristol, 1982.

**Fortin D., Lo M., Mayart G.**, Plantes médicinales du Sahel, 55 monographies des plantes utiles pour les soins de santé primaires, CECI/ENDA, 1990, p. 280.

**Fournier G., Leboeuf M., Cavé A.**, Annonaceae essential oils: a review, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, 11, 131-142.

**Franco R., M. S., Rodriguez-A., Moraes M. C. A.**, Gas chromatographic profiles of Soursop (*Annona muricata*) juice volatiles trapped on Pora-pak Q., *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 1983, 3 (2), 117-128.

**Fun C. E., Baerheim S. A.**, Composition of the essential oils of *Ocimum basilicum* var *canum* Sims and *Ocimum gratissimum* grown in Aruba, *Flav. Fragr. J.*, 1990, 5 (3), 173-177.

**Garcia D., Alvarez A., Tornos P., Fernandez A., Saenz T.**, Gas Chromatographic-mass Spectrometry study of the essential oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *Pimenta racemosa* var. *grisea*, *J. Biosci.*, 2002, 57 (5/6), 443-451.

**Garcia-A. M., de Pascual-T. S., Santos-Buelga C., Rivista-Gonzalo J. C.**, Evaluation of the antioxydant properties of fruits, *Food. Chem.*, 2003, 84 (1), 13-18.

- Garneau F. X., Gagnon H., Jean F. I., Koumaglo H. K., Moudachirou M., Adde-Mensah I.**, Les chémotypes de *Lippia multiflora*, *Melaleuca quinquenervia* et *Clausena anisata* du Togo, Bénin et Ghana, *Actes du Colloque de Saint-Jean-sur-Richelieu*, **1995**, p. 125-135.
- Garneau F. X., Pichette A., Gagnon H., Jean France-I., Addae-Mensah I., Osei-Safu D., Asomaning W. A., Oteng-Yeboah A., Moudachirou M., Koumaglo K. H.**, (E)- and (Z)-foeniculin, constituents of the leaf oil of a new chemovariety of *Clausena anisata*, *J. Essent. Oil Res.*, **2000**, 12, 757-762.
- Garnero J.**, Development of gas phase chromatographic techniques in the chemical composition study of essential oils. *Spectra 2000*, Grasse, **1985**.
- Germosen-R. L.**, Hacia una farmacopea caribena (Tramil7), Enda Caribe, Santo Domingo, **1995**, p.481-485.
- Gibernau M.**, Odeurs et spécificité dans les mutualismes figuier-pollinisateur: le cas de *Ficus carica* L. et *Blastophaga psenes* L., **1997**, Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier 2.
- Govindachari T. R., Pai B. R., Subramaniam P. S., Muthukumaraswamy N.**, Coumarins of *Clausena dentata*, *Tetrahedron*, **1967**, 24 (2), 753-7.
- Guenther E.**, Oil of *Chenopodium* in the essential oils: Individual essential oils of the Plant Families, **1952**, vol.6, 151-161.
- Guenther E.**, The Essential oils : history, origin in plants, production and analysis, Vol 1, R. E. Krieger Publishing Co., Malabar, **1948a**.
- Guenther E.**, The essential oils, Vol II, *Van Nostrand Co.*, New York, **1948**.
- Guenther E.**, The Essential oils. Individual essential oils of the plant families Rutaceae and Labiatae. Vol. 3, R. E. Krieger Publishing Co., Malabar, **1949**.
- Guigues de Souza S., Poitou F., Viano J., Masotti V., Gaydou E. M.**, Anatomical and chemical studies of *Xylopi aethiopica* fruits from Benin, *Rivista Italiana EPPOS*, **1996**, 7 (spec.Num.), 650-653.
- Guillon J., Rioult J. P., Robba M.**, New synthesis of isopiperitenol, previously isolated from species of *Cymbopogon*, *Flav. Flagr. J.*, **2000**, 15, 223-224.
- Gulati B. C., Shawl A. S., Garg S. N.**, Chemical examination of the essential oil of *Ocimum viride* Willd., *Indian Perfum.*, **1979**, 23, 197-198.
- Gundidza M., Chinyanganya F., Chagonda L., De Pooter H. L., Mavi S.**, Phytoconstituents and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Clausena anisata* (Willd.) J. D. Hook. ex. Benth., *Flav. Fragr. J.*, **1994**, 9, 299-303.

- Gupta D., Charles R., Mehta K. V., Garg S. N., Kumar S.**, Chemical examination of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from the Southern Hills of India, *J. Essent. Oil Res.*, **2002**, 14, 93-94.
- Gupta S. C., Sobti S. N.**, Inheritance pattern of methyl chavicol and citral in *Ocimum americanum*, *Indian Perfum.*, **1990**, 34 (4), 253-259.
- Gupta S. C., Tava A.**, Chemical composition of an improved hybrid strain of *Ocimum canum* Sims. (RRL-OC-11), *J. Essent Oil Res.*, **1997**, 9, 375-377.
- Gupta S. C.**, Variation in herbage yield, oil yield and major component of various *Ocimum* species/varieties (chemotypes) harvested at different stages of maturity, *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8, 275-279.
- Gupta, S., Sobti S. N.**, Inheritance pattern of camphor and linalool in *Ocimum canum* Sims., *Indian Perfum.*, **1991**, 35 (4), 213-217.
- Gurib-Fakim A., Guého J., Sewraj M. D., Dulloo E.**, Plantes Médicinales de l'Île Rodrigues, Editions de l'Océan Indien, Université de Maurice, **1994**, p53.
- Guyot M.**, Référence à la flore du Togo, *Systématique des Angiospermes*, Editogo, Lomé, Togo, **1992**, p. 143.
- Hartwell J. L.**, Plants used against cancer. A survey, *Lloydia*, **1970**, 33, 288-392.
- He Hong P., Shen Y. M., Du Z. Z., Zhao Y. B., Hao X. J.**, New O-terpenoidal coumarins from *Clausena excavata*, *Heterocycl.*, **2004**, 63 (9), 2087-2090.
- Hegnauer R.**, Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhauser Verlag Basel, **1966**, 4, 314, C. A., **1967**, 66, 102603 d.
- Helme J-P., Chazan J-B., Perrin J-L.**, Antioxydants, actifs et additifs en cosmétologie, **1992**, 2<sup>ème</sup> édition Tec et Doc, 329-352.
- Hifnawy M. S., Rashwan O. A., Rabeh M. A.**, Comparative chemical and biological investigations of certain essential oils belonging to families Asteraceae, Lamiaceae and Graminae, *Bulletin of the Faculty of Pharmacy*, **2001**, 39 (2), 35-53.
- Huang X., Kong L.**, Study on chemical constituents of volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L., *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, **2002**, 33 (3), 256-257 (CAN 139: 74160 AN 2003: 30965).
- Hutchinson J. et Dalziel J. M.**, Flora of West Tropical Africa, 2<sup>ème</sup> Edition, Vol.I Part 2, **1958**.
- Hutchinson J., Dalziel J. M.**, Flora of West Tropical Africa 2, **1963**, 2, p. 457.
- Hutchinson J., Dalziel J. M.**, Flora of West Tropical Africa, 2<sup>ème</sup> Ed., Vol. I Part I, **1954**, p 295.

- Hutchinson J., Dalziel J. M.**, Flora of West Tropical Africa, 2<sup>ème</sup> Ed. Volume III, part II, p 482, 1972.
- Irvine F. R.**, "Woody Plants of Ghana". Oxford University Press., 1961, 406-497.
- Ito C., Itoigawa M., Katsuno S., Omura M., Tokuda H., Nishino H., Furukawa H.**, Chemical constituents of *Clausena excavata*: isolation and structure elucidation of novel furanone-coumarins with inhibitory effects for tumor-promotion, *J. Nat. Prod.*, 2000, 63 (9), 1218-1224.
- Iwaoka W. T., Zhang X., Hamilton R. A , Chia C. L., Tang C. S.**, Identifying volatiles in Soursop and comparing their changing profiles during ripening, *Hort-Science*, 1993, 28 (8), 817-819.
- Jennings W., Shibamoto T.**, Quantitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatographie, Academic Press, New York, 1980.
- Jirovetz L., Buchbauer G. Ngassoum M. B., Ngamo L. T., Adjoudji O.**, Combined investigation of the chemical composition of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Xylopiya aethiopica* from Cameroon and their insecticidal activities against stored maize pest *Sitophilus zeamais*, *Ernaehrung (Vienna, Austria)*, 2005, 29 (2), 55-60.
- Jirovetz L., Buchbauer G., Fleischhacker W., Kaul V. K.**, Analysis of the essential oil of the leaves of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum* (L.) A. Gray from India, *Scientia Pharmaceutica*, 2000, 68 (1), 123-128.
- Jirovetz L., Buchbauer G., Ngassoum M. B., Ngamo L. T., Adjoudji O.**, Combined investigation of the chemical composition of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Xylopiya aethiopica* from Cameroun and their insecticidal activities against stored maize pest *Sitophilus zeamais*, *Ernaehrung*, 2005, 29 (2), 55-60.
- Jirovetz L., Buchbauer G., Shafi M. P., Kaniampady M. M.**, Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India, *Eur. Food Res. Technol.*, 2003, 217 (2), 120-124.
- Joulain D., König W. A.**, The Atlas of Spectral data sesquiterpenes hydrocarbons. E. B. Verlag, Hamburg, 1998.
- Kanko C., Koukoua G., Nguessan Y.T., Lota M-L., Tomi F., Duman H.**, Composition and intraspecific variability of the leaf oil of *Lippia multiflora* Mold. from the Ivory Coast, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, 11(2), 151-152.
- Kanko C., Sawaliho B. El-H., Kone S., Koukoua G., N'Guessan T. Y.**, Study of physicochemical properties of essential oils from *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*, *C. R. Chimie*, 2004, 7 (10-11), 1039-1042.

**Karioti, A., Hajipavlou-Litiana D., Mensah M. L. K., Fleischer T. C., Skaltsa H.,** Composition and antioxydant activity of the essential oils of *Xylopi aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, and fresh and dried fruits growing in Ghana, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52 (26), 8094-8098.

**Kasali. A. A., Ekundayo O., Paul C., König W. A., Eshilokun A. O., Ige B.,** 1, 2, 3, 4-diépoxy-p-menthane and 1,4-époxy-p-menth-2-ène: rare monoterpenoids from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. var. *ambrosioides* leaves, *J. Essent. Oil Res.*, **2006**, 18, 13-15.

**Kéita A.,** Recherches phytochimiques et pharmacologiques sur une préparation utilisant *Vepris heterophylla* R. L. (Rutaceae) et *Cymbopogon giganteus* Chiov. (Poaceae) comme antihypertenseur en médecine traditionnelle au Mali, Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Toulouse, **1986**.

**Keita B., Sidibe L., Figueredo G., Chalchat J. C.,** Chemical composition of the essential oil of *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. from Mali, *J. Essent. Oil Res.*, **2003**, 15 (4), 267-269.

**Keita S. M., Vincent C., Schmit J-P., Belanger A.,** Essential oil composition of *Ocimum basilicum*, *O. gratissimum* and *O. suave* in the Republic of Guinea, *Flav. Fragr. J.*, **2000**, 15 (5), 339-341

**Kerbaum S., Costa J. M., Deltoue F., Faurisson C., Rouviex B.,** Dictionnaire de médecine, Médecine Sciences Flammarion, **1998**, Paris p. 475.

**Kerbaum S.,** Eléments de pathologie infectieuse, 6<sup>ème</sup> Ed. SIMEP/Masson, **1996**, Paris, p 1-28.

**Kerharo J., Adam J. G.,** La pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle: Plantes médicinales et toxiques, Vigot Frères, Paris, **1974**.

**Ketoh G. K., Glitho A. I., Koumaglo K. H., Garneau F. X.,** Evaluation of essential oils from six aromatic plants in Togo for *Callosobruchus maculatus* F. pest control, *Insect Sci. Appl.*, **2000**, 20 (1), 45-49.

**Khan N. D., Naqvi S. W. I.,** Constituents of the genus *Clausena*, *J. Sci. Ind. Res.*, **1988**, 47 (9), 543-6.

**Khosla M. K., Balyan S. S., Pal S., Kaul B. I.,** RRL-Oc-12, methyl cinnamate rich variety of *Ocimum canum* Sims., *Indian Perfum.*, **1994**, 38, 85-89.

**Kimbi H. K., Fagbenro-Beyiokou A. F.,** Efficacy of *Cymbopogon giganteus* and *Enantia chlorantha* against chloroquine resistant *Plasmodium yoelii nigeriensis*, *East Afric. Med. J.*, **1996**, 73 (10), 636-637.

- Kishore Dubey N., Tiwari T. N., Mandin D., Andriamboavonjy H., Chaumont J. P., Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype), *Fitoterapia*, **2000**, 71 (1), 567-569.
- Kiuchi F., Itano Y., Uchiyama N., Honda G., Tsubouchi A., Nakajima-Shimada J., Aoki T., Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*, *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 509-512.
- Koba K., Sanda K., Raynaud C., Millet J., Chaumont J. P., Composition chimique des huiles essentielles d'*Aeollanthus pubescens Benth.* acclimatée au Togo, *C. R. Chimie*, **2004**, 7, 1107 - 1111.
- Kotkar H. M., Mendki P. S., Sadan Sangeetha V. G. S., Jha Shipr R., Upasani S. M., Maheshwari V. L., Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*, *Pest Management Sci.*, **2002**, 58 (1); 33-37.
- Koumaglo K. H., Akpagana K., Glitho A. I., Garneau F-X., Gagnon H., Jean F-I., Moudachirou M., Addae-Mensah I., Geranial and neral, major constituents of *Lippia multiflora* Moldenke leaf oil, *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8 (3), 237-240.
- Kouninki H., Haubruge E., Noudjou F. E., Lognay G., Malaisse F., Ngassoum M. B., Goudoum A., Mapongmetsem P. M., Ngamo L. S. T., Hance T., Potential use of essential oils from Cameroon applied as fumigant or contact insecticides against *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculioniadea), *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, **2005**, 70 (4), 787-792.
- Krishna Rao R. V., Murty N., Seshagiri Rao J. V. L. N., Occurrence of Borneol and Camphor and a new Terpene in *Annona squamosa*, *India J. Pharma. Sci.*, **1978**, 40 (5), 170-171.
- Kunle O., Okogun J., Egamana E., Emojevwe E., Shok M., Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract, *Phytomed.*, **2003**, 10 (1), 59-61.
- Lal R. K., Sharma J. R., Misra H. O., Sharma S., Naqvi A. A., Genetic variability and relationship in quantitative and qualitative traits of Java citronella (*Cymbopogon winterianus*, Joowitt), *J. Essent. Oil Res.*, **2001**, 13 (3), 158-162.
- Lamaty G., Menut C., Bessièrè J. M., Amvam Zollo P. H., Fekam F., Aromatic plants of Tropical Central Africa. I. Volatile components of two Annonaceae from Cameroon: *Xylophia aethiopica* (Dunal) A. Richard and *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal., *Flav. Fragr. J.*, **1987**, 2 (3), 91-94.

- Lamaty G., Menut C., Bessière J.M., Ouamba J. M., Silou T.,** 2-methyl-6-méthyl-7-octen-4-one, a constituent of *Lippia multiflora* essential oil, *Phytochem.*, **1990**, 29 (2), 521-522.
- Landrum L. R.,** Campomanesia, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium* and *Luma* (Myrtaceae), *Fl. Neotrop. Monogr.*, **1986**, 45.
- Lavergne R., Véra R.,** Médecine traditionnelle et pharmacopée: études ethnobotaniques des plantes utilisées dans la pharmacopée à la Réunion, **1989**.
- Lawrence B. M.,** Labiatae oils: mother nature's chemical factor. Essential Oils: **1988-1991**, Edit. **Lawrence B. M., Allured Publ., Stream, IL, 1992**, 188-206.
- Lawrence B. M.,** Progress in Essential Oils: *Chenopodium ambrosioides* oil, *Perfum. Flav.*, **1999**, 24, 45-53.
- Lawrence B. M.,** Progress in Essential Oils: *Ocimum gratissimum* oil, *Perfum. Flav.*, **1997**, 22, 70-74.
- Leclercq P. A., Dung N. X., Thin N. N.,** Constituents of the leaf oil of Vietnamese *Clausena excavata* Burm. f., *J. Essent. Oil Res.*, **1994**, 6 (1), 99-100.
- Letouzey R.,** Manuel de Botanique Forestière Afrique Tropicale, Nogent-sur-Marne, *Cent. Tech. Forest. Trop.*, **1972**, 2B: p 423-435.
- Leung A. Y., Foster S.,** Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics, 2ème Edition, **1996**.
- Lockwood G. B.,** The essential oil from leaves of *Clausena heptaphylla*, *Fitoterapia*, **1984**, 55 (2), 123-124.
- Lutz,** *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **1940**, 22, 497.
- Luu D. H., Caple R., Kamperdrick C., Nguyen T. D., Karim R.,** Isomeranzin against Herpes simplex virus in vitro from *Clausena heptaphylla* (Roxb.) W. & Arn.: Isolation, structure and biological assay, *Tap Chi Hoa Hoc*, **2004**, 42 (1), 115-120.
- Mabberley D. J.,** The plant book, Cambridge University Press, **1990**.
- MacLeod A. J., Pieris N. M.,** Volatile Flavor Components of Soursop (*Annona muricata*), *J. Agric. Food Chem.*, **1981**, 29, 488-490.
- Mahalwal V. S., Ali M.,** Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle, *Flav. Fragr. J.*, **2003**, 18, 73-76.
- Mahmout Y.,** Contribution à l'étude de quelques aromates et condiments utilisés au Tchad, **1992**, Thèse de Doctorat, Université Montpellier 2.
- Mann J.,** Secondary metabolism. 2nd Ed., Clarendon Press, Oxford, **1987**.

**Martins A. P., Salgueiro L. R., Vila R., Tomi F., Canigueral S., Casanova J., Proenca da Cunha A., Adzet T.**, Composition of the essential oils of *Ocimum canum*, *O. gratissimum* and *O. minimum*, *Planta Med.*, **1999**, 65, 187-189.

**Martins A. P., Salgueiro L. R., Vila R., Tomi F., Canigueral S., Casanova J., Proenca da Cunha A., Adzet T.**, Composition of the essential oils of *Ocimum canum*, *O. gratissimum*, and *O. minimum*, *Planta Med.*, **1999**, 65 (2), 187-189.

**Massada Y.**, Analysis of essential oils by gas chromatographic and mass spectrometry. Wiley J., Sons, Vol. 1 and 2, New York, **1976**

**Masotti V., Viano J., Gaydou E. M., Dherbomez M., Letoumeux Y.**, Phytochemical and antimicrobial studies on *Xylopi aethiopica*, *Fitoterapia*, **1998**, 69 (5), 461-462.

**Masotti V., Viano J., Dherbomez M., Letourneux Y., Gaydou E. M.**, Action de l'huile essentielle de fruits de *Xylopi aethiopica* (Dun. Rich.) sur différentes souches microbiennes, *Revista Italiana EPPOS*, **1997**, N° special, 617-621.

**Mac Caskill D., Croteau R.**, Recent advances in terpenoid biosynthesis: Implications for essential oil production. 4<sup>èmes</sup> Rencontres Techniques et Economiques, Plantes Aromatiques et Medicinales, 5-7 Dec., Nyons, **1994**.

**McHale D., Laurie W. A., Woof M. A.**, Composition of West Indian bay oils, *Food Chem.*, **1977**, 2, 19-25.

**Mellors A., Tappel A. L.**, The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 241, 4353-4356.

**Menut C., Bessière J. M., Samata D., Djibo A. K., Buchbauer G., Schopper B.**, 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. Oils Res.*, **2000**, 12, 207-212.

**Menut C., Lamaty G., Bessière J. M., Koudou J., Maidou J.**, Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XVII. 6,7-Epoxy myrcene, the major unusual constituent of *Lippia multiflora* s. l. Moldenke essential oil from the Central African Republic, *Flav. Fragr. J.*, **1995**, 10 (2), 75-77.

**Menut C., Lamaty G., Sohounhlou K. D., Dangou J., Bessière J. M.**, Aromatic plants of Tropical West Africa. III. Chemical composition of leaf essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke from Benin, *J. Essent. Oil Res.*, **1995**, 7, 331.

**Menut C., Valet G.**, Etude de la composition chimique de l'huile essentielle d'une plante aromatique cultivée au Cameroun: *Ocimum gratissimum*, *Ann. Fac. Sci. Biol. Biochim.*, **1985**, III (3), 91-95.

- Meyer T. M., The essential oil from the leaves of *Clausena anisata*, *Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas et de la Belgique*, **1947**, 66, 395-400.
- Michaelidou A., Hadjipavlou-Litina D., Anti-inflammatory, antioxidant and analgesic amides, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, **2003**, 18 (6), 537-544.
- Miller H. E., A simplified Method for the Evaluation of Antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1971**, 48, 91.
- Mondello L., Zappia G., Controneo A., Bonaccorsi I., Chowdhury J., U., Yusuf M., Dugo G., Studies on the essential oil-bearing plants of Bangladesh. Part VIII. Composition of some *Ocimum* oils *O. basilicum* L. var. *purpurascens*; *O. sanctum* L. green; *O. sanctum* L. purple, *O. americanum* L., citral type; *O. americanum* L. camphor type, *Flav. Fragr. J.*, **2002**, 17 (5), 335-340.
- Moody J. O., Adeleye S. A., Gundidza, M. G., Wyllie G., Ajayi-Obe O. O., Analysis of the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle growing in Zimbabwe, *Pharmazie*, **1995**, 50, 74-75.
- Moudachirou M., Ayedoun M. A., Gbenou J., Garneau F. X., Koumaglo K. H., Mensah-Addae I., Chemical composition of the essential oils of *Clausena anisata* from Ghana and Togo, *J. S. O. A. CHIM*, **1997**, 2 (3), 49-54.
- Muhayimana A., Chalchat J.-C., Garry R.-P., Chemical composition of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. from Rwanda, *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, 10, 690-692.
- Mwangi J. W., Addae-Mensah I., Muriuki G., Munavu R., Lwande W., Hassanali A., Essential oils of *Lippia* species in Kenya. IV: Maize Weevil (*Sitophilus Zeamais*) repellancy and larvicidal activity, *Int. J. Pharm.*, **1992**, 30 (1), 9-16.
- Naithani V., Kakkar P., *Ocimum gratissimum*, *Ocimum canum* and *Ocimum kilimandscharicum*: A review, *J. Med. Aromatic Plant Sciences*, **2002**, 24 (2), 441-455.
- Nakahara K., Alzoreky N. S., Yoshihashi T., Nguyen H. T. T., Trakoontivakorn G., Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass), *JIRCAS*, **2003**, 37, 249-252.
- Nakamura C. V., Ishida K., Faccin L. C., Dias Filho B. P., Cortez D. A. G., Rozental S. S., de Souza W., Ueda-Nakamura T., In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species, *Res. Microbiol.*, **2004**, 155 (7), 579-586.
- Nakamura C. V., Ueda-Nakamura T., Bando E., Melo A. F. N., Cortez D. A. G., Dias Filho B. P., Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1999**, 94 (5), 675-678.

- Nath S. C., Bordoloi D. N., Major constituents of the essential oil of *Clausena heptaphylla* W and a leaves, *Indian Perfum.*, 1991, 35 (2), 97-99.
- Nath S. C., Hazarica A. K., Sarma K. K., Chemical composition of the leaf and fruit oil of *Clausena heptaphylla* W & A from Northeast India, *J. Essent. Oil Res.*, 1996, 8 (2), 197-198.
- Ndoye Foe-Beling E. F., Etude chimique et évaluation des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des huiles essentielles d'espèces aromatiques tropicales en provenance de la province Est du Cameroun, 2001, Thèse de doctorat de l'Université Montpellier 2.
- Nebie R. H. Ch., Sereme A., Belanger A., Yameogo R., Sie F. S., Investigation of aromatic plants from Burkina Faso. Chemical and biological characteristics of *Lippia multiflora* essential oils, *J. S. O. A. CHIM.*, 2002, 7 (13), 27-37.
- Ngadjui B. T., Ayafor J. F., Sondengam B. L., Connolly J. D., Coumarins from *Clausena anisata*, *Phytochem.*, 1989b, 28 (2), 585-589.
- Ngadjui B.T., Ayafor J. F., Sondengam B. L., Connolly J., D., Prenylated coumarins from the leaves of *Clausena anisata*, *J. Nat. Prod.*, 1989a, 52 (2), 243-247.
- Ngassoum M. B., Jirovetz L., Buchbauer G., Schmaus G., Hammerschmidt F. J., Chemical composition and olfactory evaluation of the leaves and seeds of *Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook. ex Benth. from Cameroon, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, 11, 231-237.
- Ngassoum M. B., Ousmaila H., Ngamo L., Maponmetsem P. M., Jirovetz L., Buchbauer G., Aroma compounds of essential oils of two varieties of the spice plant *Ocimum canum* Sims from northern Cameroon, *J. of Food Composition and Analysis*, 2004, 17, 197-204.
- Nguefack J, Leth V., Amvam Zollo P. H., Mathur S. B., Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling spoilage and mycotoxin producing fungi, *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 94, 329-334.
- Nicholas H. J., Phytochemistry. Organic metabolites, Vol. 2, Yonkers, New York, 1973.
- Norme AFNOR, Huile essentielle de citronnelle type Ceylan Paris, Décembre.1982, NFT 75-224.
- Norme AFNOR, Huile essentielle de citronnelle type Java ISO 3848, 2001
- Norme AFNOR, Huile essentielle de citronnelle type Sri Lanka (*Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson var. *lenabatu* Spatf.) ISO 3849, 2003.
- Normes AFNOR, 2004, Huile essentielle de bay (*Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore), ISO/FDIS 3045.
- Ntezurubanza L., Scheffer J. J. C., Looman A., Composition of the essential oil of *Ocimum canum* grown in Rwanda, *Pharmaceutisch Weekblad, Scientific Edition*, 1986, 7, 273-276.

- Nyarko A. K., Asare-Anane H., Ofosuhene M., Addy M. E., Teye K., Addo P., Aqueous extract of *Ocimum canum* decreases levels of fasting blood glucose and free radicals and increases antiatherogenic lipid levels in mice, *Vascular Pharmacol.*, **2003**, 39 (6), 273-279.
- Ogunwande I. A., Olawore N. O., Adeleke K. A., Contribution to the study of essential oil of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich: isolation and characterization of zerumbone, *J. Essent. Oil-Bearing Plant*, **2005**, 8 (2), 159-164.
- Ojewole J. A. O., Hypoglycemic effect of *Clausena anisata* (Willd) Hook methanolic root extract in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **2002**, 81 (2), 231-237.
- Okpekon T., Yolou S., Gleye C., Roblot F., Loiseon P., Bories C., Grellier P., Frappier F., Laurens A., Hocquemiller R., Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast, *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, 90 (1), 91-97.
- Okunade A. L., Olaifa J. I., Estragole: an acute toxic principle from the volatile oil of the leaves of *Clausena anisata*, *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50 (5), 990-991.
- Oliveros-Belardo L., The predominant terpenes in the fruit peel oil of *Annona squamosa* L., *Philipp. J. Sci.*, **1977**, 106, 37-47.
- Oluwafemi F., Taiwo V., Reversal of toxigenic effects of aflatoxin B-1 on cockerels by alcoholic extract of African nutmeg, *Monodora myristica*, *J. Sci. Food Agric.*, **2004**, 84 (4), 333-340.
- Onocha P. A., Ekundayo O., Eramo T., Laakso I., Essential oil constituents of *Chenopodium ambrosioides* L. leaves from Nigeria, *J. Essent. Oil Res.*, **1999**, 11, 220-222.
- Onyenekwe P. C., Ogbadu G. H., Deslauriers H., Gagnon M., Collin G. J., Volatile constituents of the essential oil of *Monodora myristica* (Gaertn) Dunal, *J. Sci. Food Agric.*, **1993**, 61 (3), 379-381.
- Opdyke D. L. J., Monographs on fragrance raw materials: Bay oil, *Food Cosmet. Toxicol.*, **1973**, 11 (5), 869-870.
- Orenga E., Cosmetic composition for hair treatment, (Phytéma, Fr.), Fr. Demande, **2003**, 9pp., CODEN: FRXXBL FR 2832627 A1 20030530 (CAN 138: 406578 AN 2003: 417501).
- Ouamba J. M., Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo. Extraction et analyse des huiles essentielles. Oximation des aldéhydes naturels, **1991**, Thèse de doctorat d'Etat de l'Université de Montpellier 2.
- Oussou K. R., Kanko C., Guessend N., Yolou S., Koukoua G., Dosso M., N'Guessan Y. T., Figueredo G., Chalchat J. C., Antimicrobial activities of essential oils of three aromatic plants from Ivory Coast, *C. R. Chimie*, **2004**, 7 (10-11), 1081-1086.

- Owusu-Ansah E., Oppong-Boachie F. K., Awuah R. T.,** Chemical constituents of essential oil from the leaves of Ghanaian *Ocimum gratissimum* L., *Asian J. Chem.*, **2005**, 17 (3), 1446-1448.
- Pandey A. K., Chowdhury A. R.,** Composition of the essential oil of *Ocimum gratissimum* grown in Madhya Pradesh, *J. Med. Arom. Plant Sci.*, **2001**, 22/4A-23/1A, 26-28.
- Paranagama P. A., Abeysekera K. H. T., Nugaliyadde L., Abeywickrama K. P.,** Repellency and toxicity of four essential oils to *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), *J. Nat. Sci. Found. Sri Lanka*, **2004**, 32 (3 et 4), 127-138.
- Pardhasaradhi B. V. V., Reddy M., Ali A. M., Kumari A. L., Khar A.,** Antitumour activity of *Annona squamosa* seed extract is through the generation of free radical and induction of apoptosis, *Ind. J. Biochem. Biophys.*, **2004**, 41 (4), 167-172.
- Paris R. R., Moyses H.,** Matière médicale, Masson, Paris, **1976**.
- Park II-K., Park Ju-Y., Kim K. H., Choi K. S., Choi I. H., Kim C. S., Shin S. C.,** Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*), *Nematology*, **2005**, 7 (5), 767-774.
- Paton A., Harley M. R., Harley M. M.,** *Ocimum*: an overview of classification and relationships, dans "Basil. The genus *Ocimum*", Ed. par Hiltunen R. et Holm Y., Harwood Academic Publishers, **1999**.
- Paul R. E., Deputy J., Chen J. N.,** Changes in organic acids, sugars, and head-space volatiles during fruit ripening of Soursop *Annona muricata* L., *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1983**, 108 (6), 931-934.
- Pelissier Y., Marion C., Casadebaig J., Milhau M., Kone D., Loukou G., Nanga Y., Bessière J. M.,** A chemical, bacteriological, toxicological and clinical study of the essential oil of *Lippia multiflora* Mold. (Verbenaceae), *J. Essent. Oil Res.*, **1994**, 6 (6), 623-630.
- Pelissier Y., Marion C., Kone D., Lamaty G., Menut C., Bessière J. M.,** Volatile components of *Annona muricata*, *J. Essent. Oil Res.*, **1994**, 6 (4), 411-414.
- Pharmacopée Française*, 1. 1, Vol. 4, 5, 8, Maisonneuve, Paris, **1985**.
- Pino J. A., Aguero J., Marbot R.,** Volatile components of soursop (*Annona muricata*), *J. Essent. Oil Res.*, **2001**, 13 (2), 140-141.
- Pino J. A., Garcia J., Martinez M. A.,** A comparison between the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of *Ocimum gratissimum* L., *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, 10, 575-577.

- Pino J. A., Marbot R., Fuentes V.**, Aromatic plants from Western Cuba IV. Composition of the leaf oils of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels and *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr., *J. Essent. Oil Res.*, **2006**, 18 (2), 139-141.
- Pino J. A., Marbot R., Real I. M.**, Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from Cuba, *J. Essent. Oil Res.*, **2003**, 15, 213-214.
- Pino J. A., Rosado A., Fuentes V.**, Composition of the essential oil from leaves and flowers of *Ocimum gratissimum* L. grown in Cuba, *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8, 139-141.
- Pipper P. J., Letts L. C., Samhoun M. N., Tippins J. R., Palmer M. A.**, Advances in Prostaglandin, Tromboxane and Leukotriene Research. *Raven Press*, New York, Vol 9, **1994**.
- Piret M., Van R. J., Mauz A.**, Differential inhibition of COX-1 and COX-2 by NSAIDS: a summary of result using various test systems dans **Vane J., Botting J.**, Eds. Selective COX-2 inhibitors Pharmacology, clinical effects and therapeutic potential, **1997**, (vol. 3) Dordrecht: Kluwer Academic Press, 27-46.
- Polisson R.**, Non-steroidal anti-inflammatory drugs: practical and theoretical considerations in their selection, *Am. J. Med.*, **1996**, 100 suppl. 2A: 31-36.
- Popielas L., Moulis C., Kéita A., Fouraste I., Bessière J. M.**, The essential oil of *Cymbopogon giganteus*, *Planta Med.*, **1991**, 57, 586-587.
- Prakash D., Lakshmi V., Raj K., Kapil R. S.**, Constituents of *Clausena indica* root, *Fitoterapia*, **1989**, 60 (4), 347-348.
- Provan G. J., Gray A. I., Waterman P. G.**, Chemistry of the Burseraceae. Part 6. Monoterpene-rich resins from Kenyan Burseraceae, *Flav. Fragr. J.*, **1987**, 2(3), 115-118.
- Puertas-Mejia M., Hillebrand S., Stashenko E., Winterhalter P.**, In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil, *Flav. Fragr. J.*, **2002**, 17, 380-384.
- Raponda-Walker A., Sillans R.**, Les plantes utiles du Gabon, Ed. Lechevalier, Paris, **1961**, 614p.
- Ravid U., Putievsky E., Katzir I., Lewinsohn E.**, Enantiomeric composition of linalol in the essential oils of *Ocimum* species and in commercial basil oils, *Flav. Fragr. J.*, **1997**, 12, 293-296.
- Redl K., Breu W., Davis B., Baue R.**, Anti-inflammatory active polycetylenes from *Bidens campylotheca*, *Planta Med.*, **1994**, 60, 58-62.
- Reisch J., Adesina S. K., Bergenthal D., Hussain R. A.**, Natural Product Chemistry. Part 105. Chemosystematics in the Rutaceae: Volatile constituents of *Clausena anisata* (Willd.) Oliv. pericarp, root and leaf, *Sci. Pharm.*, **1985**, 53, 153-158.

- Reisch J., Wickramasinghe A.**, Coumarins of *Clausena anisata* fruits, *Pharmazie*, **1989**, 44 (10), 736-737.
- Rivera de Leon M., Panlilio B. G., Bamba E. M., Bognot F. L., Dizon D. S.**, Antimicrobial properties of local medicinal plants against selected test organisms, *Am. Chem. Soc.*, **2001**, August 26-30.
- Robertson R. P.**, Icosano des en pathologie humaine, dans «Médecine Interne», 13<sup>ème</sup> Ed. Arnette, Milano, **1995**, 65-71.
- Roberty G.**, Monographie systématique des Andropogonées du globe, Thèse Doctorat Sciences Naturelles, Université de Toulouse, **1960**.
- Robineau L.**, Towards a Carabbean Pharmacopeia (Tramil 4), Enda Caribe, Santo Domingo, **1991**, 287-295.
- Saenz M. T., Tornos M. P., Alvarez A., Fernandez M. A., Garcia M. D.**, Antimicrobial activity of essential oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *Pimenta racemosa* var. *grisea*, *Fitoterapia*, **2004**, 75 (6), 599-602.
- Safayhi H., Mack T., Sabiaeraj J., Anazodo M. I., Subramanian L. R., Ammon H. P. T.**, Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase, *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **1992**, 261 (3):1143-1146.
- Sagrero-Nieves L., Bartley J. P.**, Volatile Constituents from the leaves of *Chenopodium ambrosioides* L., *J. Essent. Oil Res.*, **1995**, 7, 221-223.
- Sahouo B. G., Tonzibo Z. F., Boti B., Chopard C., Mahy J. P., N'guessan Y. T.**, Anti-inflammatory and analgesic activities: chemical constituents of essential oils of *Ocimum gratissimum*, *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon giganteus* inhibited lipoxygenase L-1 and cyclooxygenase of PGHS, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, **2003**, 17 (2), 191-197.
- Sanda K., Koba K., Akpagana K., Tchepan T.**, Content and chemical composition of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. at different harvest periods after sowing, *Rivista Italia EPPOS*, **2001**, 31, 3-7.
- Sanda K., Koba K., Baba A G., Amouzouvi K., Tchala W., Akpagana K., Vilarem G., Gaset A.**, *Ocimum canum* Sims. A lesser known source of volatile oil with terpineol-4 as the major constituent, *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **1998b**, 12, 173-176.
- Sanda K., Koba K., Nambo P., Gaset A.**, Chemical investigation of *Ocimum* species growing in Togo, *Flav. Fragr. J.*, **1998a**, 13 (4), 226-232.
- Sanda K., Koba K., Walla B. A., Akpagana K., Garneau F. X., Gagnon H. Jean F. L.**, *Aeolanthus pubescens*, a potential source of thymol-rich essential oil, *J. Essent. Oil Res.*, **1999**, 11 (2), 257 - 258.

- Sarin Y. K., Agarwal S. G., Thappa R. K., Singh K., Kapahi B. K.,** A high yielding citral-rich strain of *Ocimum americanum* L. from India, *J. Essent. Oil Res*, **1992**, 4 (5), 515-519.
- Schorderet M., Dayer J. M.,** Analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et substances apparentées, dans «Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques», **1992**, Ed. Frion-Roche, Paris, 541-562.
- Shen Z. F., Chen Q. M., Liu H. F., Xie M. Z.,** The hypoglycemic effect of *Clausena* coumarine, *Acta Pharma. Sin.*, **1989**, 24 (5), 391-392.
- Shirwaikar A., Rajendran K., Kumar C. D.,** In vitro antioxydant studies of *Annona squamosa* Linn. leaves, *Indian J. Exp. Biol.*, **2004**; 42 (8) 803-807.
- Sidibé L., Chalchat J. C., Garry R. P., Lacombe L.,** Aromatic Plants of Mali (IV): Chemical composition of essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf and *Cymbopogon giganteus* (Hochst) Chiov., *J. Essent. Oil Res.*, **2001**, 13, 110-112.
- Silva M. G. V, Matos F. J. A., Lopes P. R. O., Silva F. O., Holanda M. T.,** Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction, *ARKIVOC (Gainesville, FL, United States)*, **2004**, 6, 66-71.
- Singh S. P., Rao G. P., Upadhyaya P. P.,** Fungitoxicity of essential oils of some aromatic plants against sugarcane pathogens, *Sugar Cane*, **1998**, (2), 14-17.
- Sinha G. K., Gulati B. C.,** Study of essential oil from *Ocimum americanum* Linn., *Philippine J. Sci.*, **1990**, 119 (4), 347-355.
- Sinsin B., Sinadouwirou A. T.,** Valorisation socio-économique et pérennité du *Pentadesma butyracea* Sabine en galeries forestières au Bénin, *Cahier Agricultures*, **2003**, 12, 1-5.
- Sircar J. C., Schwender C. F., Johnson E. A.,** Soybean lipoxygenase inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Prostaglandins*, **1983**, 25 (3), 393-396.
- Sobti S. N., Khosla M. K., Pushpangadan P.,** Inheritance pattern of certain phenolic and sesquiterpene constituents of essential oils in the interspecific hybrids of *Ocimum* species, *Indian Perfum.*, **1978**, 22, 256-258.
- Sohounhloue K. D., Dangou J., Djossou L., Akoegninou A., Adjobo R., Garneau F.-X., Gagnon H., Jean F. I.,** Chemical composition of the leaf and flower oils of *Aeolanthus pubescens* Benth. From Benin, *J. Essent. Oil Res.*, **2002**, 14, 80-81.
- Sohrab M. H., Mazid M. A., Rahman E., Hasan C. M., Rashid M. A.,** Antibacterial activity of *Clausena heptaphylla*, *Fitoterapia*, **2001**, 72 (5), 547-549.
- Stevens A., Lowe J.,** Les réponses tissulaires aux agressions, Anatomie Pathologie, 1<sup>ère</sup> Ed. De Boeck University, **1997**, 57-75

- Tairu A. O., Holmann T., Schieberle P.**, Characterization of the key aroma compounds in dried fruits of the West African Pepper tree *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae) using aroma extract dilution analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47 (8), 3285-3287.
- Talalaj S.**, Essential oil from *Ocimum viride* grown in Ghana, *W. African Pharm.*, **1964**, 6, 113-114.
- Tchoumboungang F., Amvam Z. P. H., Dagne E., Mekonnen Y.**, In vitro antimalaria activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*, *Planta Med.*, **2005**, 71 (1), 20-23.
- Tchoumboungang F., Amvam Z. P.; H., Avlessi F., Alitonou G. A., Sohounhloué D. K., Ouamba J. M., Tsomambet A., Okemy-Andissa N., Dagne E., Agnanié H., Bessièrè J. M., Menut C.**, Variability in the Chemical Compositions of the essential oils of five *Ocimum* species from Tropical African Area, *J. Essent. Oil Res.*, **2006**, 18, 194-199.
- Tchoumboungang F.**, Contribution à la détermination des teneurs, des caractéristiques chimiques et des activités antifongiques des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques, condimentaires et médicinales du Cameroun, **1996**, Thèse de doctorat de l'Université de Yaoundé I.
- Tchuella J.**, Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle Bamiléké, Thèse de Pharmacie, n°105, Université de Dakar Sénégal, **1964**.
- Teisseire P. J.**, Chimie des substances odorantes, Lavoisier, Paris, **1991**.
- Tkhashi J. A., Pereira C. R., Pimenta L. P. S., Boaventura M. A. D., Silva L. G. F. E.**, Antibacterial activity of eight brazilian Annonaceae plants, *Nat. Prod. Res.*, **2006**, 20 (1), 21-26.
- Tranchant J.**, Manuel de chromatographie en phase gazeuse, Masson et Cie, Paris, **1982**.
- Trongtokit Y., Rongsriyam Y., Komalamisra N., Apiwathnasom C.**, Comparative repellency of 38 essential oils mosquito bites, *Phytother. Res.*, **2005**, 19 (4), 303-339.
- Tucker A., Maciarello M. J., Adams R. P., Landrum L. R., Zaroni T. A.**, Volatile leaf oils of Caribbean Myrtaceae. I. Three varieties of *Pimenta racemosa* (Mill.) J. Moore of the Dominican Republic and commercial bay oil, *J. Essent. Oil Res.*, **1991**, 3 (5), 323-329.
- Vahirua-Lechat I., Menut C., Lamaty G., Bessièrè J-M.**, Etude chimique des huiles essentielles de quelques Labiées de Polynésie Française, *Revista Italiana EPPOS*, **1997**, 704-711
- Valentin A., Pelissier Y., Benoît F., Marion C., Kone D., Mallie M., Bastide J. M., Bessièrè J. M.**, Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*, *Phytochem.*, **1995**, 40 (5), 1439-1442.

- 
- Vane J. R., Botting R. M.**, New insights into mode of action of anti-inflammatory drugs, *Inflamm. Res.*, **1995**, 44, 1-10
- Vane J. R., Botting R. M.**, Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action, *Inflamm. Res.*, **1998**, 47 suppl. 2, 78-87.
- Velasco-Negueruela A., Perez-Alonso M. J., Gusman C. A., Zygadlo J. A., Ariza-Espinar L., Sanz J., Garcia-Vallejo M. C.**, Volatile constituents of forty *Lippia* species from Cordoba (Argentina), *J. Essent. Oil Res.*, **1993**, 5, 513-524.
- Vieira R. F., Simon J. E.**, Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil, *Economic Botany*, **2000**, 54 (2), 207-216.
- Vostrowsky O., Garbe W., Bestmann H. J., Maia J. G. S.**, Essential oil of Alfavaca, *Ocimum gratissimum* from Brazilian Amazon. *Zit Naturforsch.*, **1990**, 45c, 1073-1076 (C.A., 113, 2298931, 1990).
- Wallach O.**, Terpene and Camphor, 2nd Ed., Vit. Leipzig, **1914**.
- Wei X., Xie H., Wu S., Zheng X., Liu M., Yang R.**, Annonaceous acetogenins with antitumor activity and its preparing, *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, **2002**, Chem. Abstrats.
- Wong K. C., Khoo H. K.**, Volatile components of Malaysian *Annona* fruits., *Flav. Fragr. J.*, **1993**, 8 (1), 5-10.
- Wong K. C., Wong S. N., Sam T. W., Chee S. G.**, Volatile constituents of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels fruit, *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, 10 (6), 700-702.
- Xaasan C. C., Cabdulraxmaan D. A., Salvatore P., Piozzi F., Schmid J.**, Constituents of the essential oil of *Ocimum canum*, *J. Nat. Prod.*, **1981**, 44, 752-753.
- Yang Y. L., Chang F. R., Wu C. C., Wang W. Y., Wu Y. Y.**, New ent-diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*, *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65 (10), 1462-1467.
- Yayi E.**, Contribution à l'étude des huiles essentielles de plantes aromatiques du Bénin: cas de l'*Ocimum basilicum*, *O. canum* et *O. gratissimum* dans la perspective de leur production, **1998**, Thèse de doctorat des Universités Nationale du Bénin et Blaise-Pascal de Clermont-Ferrand II.
- Yayi E., Gbenou J. D., Ahoussi L. A., Moudachirou M., Chalchat J-C.**, *Ocimum gratissimum* L., site of complex chemical variations during growth, *C. R. Chimie*, **2004**, 7 (10-11), 1013-1018.
- Yayi E., Moudachirou M., Chalchat J-C.**, Chemotyping of three *Ocimum* species from Benin: *O. basilicum*, *O. canum* and *O. gratissimum*, *J. Essent. Oil Res.*, **2001**, 13 (1), 13-17.

**Yeh Shang-H., Chang F.-R., Wu Y.-C., Yang Y.-L., Zhuo S.-K., Hwang T.-L.,** An anti-inflammatory ent-kaurane from the stems of *Annona squamosa* that inhibits various human neutrophil functions, *Planta Med.*, **2005**, 71 (10), 904-909.

**Yenjai C., Sripontan S., Sriprajun P., Kittakoop P., Jintasirikul A., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y.,** Coumarins and carbazoles with antiplasmodial activity from *Clausena harmandiana*, *Planta Med.*, **2000**, 66 (3), 277-279.

**Yusuf M., Begum J., Mondello L., D'Alcontres I. S.,** Studies on the essential oil bearing plant of Bangladesh. Part VI. Composition of the oil of *Ocimum gratissimum* L., *Flav. Fragr. J.*, **1998**, 13, 163-166.

**Zhao J., Peng N., Zhong Y.,** Chemical composition of the essential oils of *Clausena lansium* from Hainan island, China, *J. Biosci.*, **2004**, 59 (3/4), 153-156.

**Zhu L., Zeng H., Li Y., Mai L., LI Z., Chen W., Lu B.,** *Clausena dunniana* Levl. (Rutaceae), a new resource of isoanethole, *Zhiwu Xuebao*, **1987**, 29 (4), 416-421, Chem. Abst. 108: 62241 AN 1988: 62241).

# ANNEXES

---

## ANNEXE 1 : LISTE DES ABREVIATIONS

<i>A. muricata</i>	:	<i>Annona muricata</i>
<i>A. squamosa</i>	:	<i>Annona squamosa</i>
<i>A. pubescens</i>	:	<i>Aeolanthus pubescens</i>
AINS	:	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
<i>C. africana</i>	:	<i>Commiphora africana</i>
<i>C. ambrosioides</i>	:	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
<i>C. giganteus</i>	:	<i>Cymbopogon giganteus</i>
<i>C. nardus</i>	:	<i>Cymbopogon nardus</i>
<i>C. anisata</i>	:	<i>Clausena anisata</i>
CA	:	Composés aromatiques
DA	:	Dérivés aliphatiques
HE	:	huile essentielle
<i>L. multiflora</i>	:	<i>Lippia multiflora</i>
<i>M. myristica</i>	:	<i>Monodora myristica</i>
MTH	:	monoterpènes hydrocarbonés
MTO	:	monoterpènes oxygénés
<i>O. canum</i>	:	<i>Ocimum canum</i>
<i>O. gratissimum</i>	:	<i>Ocimum gratissimum</i>
<i>P. racemosa</i>	:	<i>Pimenta racemosa</i>
<i>P. butyracea</i>	:	<i>Pentadesma butyracea</i>
STH	:	sesquiterpènes hydrocarbonés
STO	:	sesquiterpènes oxygénés
<i>X. aethiopica</i>	:	<i>Xylopiya aethiopica</i>

---

**ANNEXE 2 : LISTE DES FIGURES**

- Figure 1** : Principales voies biosynthétiques des composés volatils naturels (Bruneton 1999)
- Figure 2** : Voie de l'Acide mévalonique
- Figure 3** : Cyclisation des principaux sesquiterpènes
- Figure 4** : Voie de l'Acide Shikimique
- Figure 5** : Répartition des constituants dans les échantillons d'huile essentielle de feuilles d'*Annona muricata* L.
- Figure 6** : Répartition des constituants dans les échantillons d'huile essentielle de feuilles d'*Annona squamosa* L.
- Figure 7** : Répartition des terpénoïdes dans l'huile essentielle des feuilles de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal.
- Figure 8** : Répartition des terpénoïdes dans l'huile essentielle des feuilles de *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich
- Figure 9** : Répartition des terpénoïdes dans l'huile essentielle des feuilles de *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl.
- Figure 10** : Filiation biosynthétique des structures sesquiterpéniques à squelette bisabolane identifiées dans l'huile essentielle de *Commiphora africana*
- Figure 11** : Répartition des composés caractéristiques dans les échantillons d'huiles essentielles et dans l'extrait au pentane de feuilles de *Chenopodium ambrosioides* L.
- Figure 12** : Filiation biogénétique et chimique des composants volatils de *Chenopodium ambrosioides* L.
- Figure 13** : Répartition des différents constituants de l'huile essentielle de l'échantillon 7 de *Chenopodium ambrosioides* L (%FID) comparée à celle obtenue après hydrodistillation fractionnée (% Dist).
- Figure 14** : Transformation chimique probable de l'ascaridole sous l'effet d'une hydrodistillation
- Figure 15** : Répartition des composés majoritaires dans les échantillons d'huiles essentielles de *Pentadesma butyracea* Sabine issues des feuilles et des écorces.
- Figure 16** : Répartition des composés majoritaires dans les échantillons d'huile essentielle d'*Aeolanthus pubescens* Benth (feuilles)
- Figure 17** : Répartition des constituants dans l'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum canum* Sims
- Figure 18** : Répartition des constituants dans les huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* L. (feuilles et sommités fleuries)

- Figure 19 :** Répartition des composés majoritaires dans les différents échantillons d'huile essentielle de *Pimenta racemosa* (feuilles)
- Figure 20 :** Processus biosynthétique proposé pour les constituants de *Cymbopogon giganteus*
- Figure 21 :** Répartition des composés majoritaires dans les échantillons d'huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* Chiov. (feuilles)
- Figure 22 :** Répartition des terpénoides dans l'huile essentielle des feuilles de *Cymbopogon nardus* (Linn) Rendle
- Figure 23 :** Répartition des constituants dans les échantillons d'huile essentielle de feuilles de *Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook ex. Benth.
- Figure 24 :** Répartition des composés majoritaires dans l'huile essentielle de *Lippia multiflora* Moldenke (feuilles)
- Figure 25 :** Réactivité de l'acide gallique vis à vis du DPPH
- Figure 26 :** Réactivité de BHT vis à vis du DPPH
- Figure 27 :** Réactivité de l'eugénol et du BHA vis à vis du DPPH
- Figure 28 :** Réactivité du thymol et du carvacrol vis à vis du DPPH
- Figure 29 :** Répartition des terpénoides dans les échantillons classés « inactifs ».
- Figure 30 :** Réactivité de l'échantillon 1 de *Cymbopogon giganteus* vis à vis du DPPH
- Figure 31 :** Réactivité des échantillons 2 et 3 de *Cymbopogon giganteus* vis à vis du DPPH
- Figure 32 :** Réactivité de l'échantillon 7 de *Chenopodium ambrosioides* vis à vis du DPPH
- Figure 33 :** Réactivité des échantillons 1, 4, 5 et 8 de *Chenopodium ambrosioides* vis à vis du DPPH
- Figure 34 :** Réactivité des échantillons 2, 3 et 4 de *Clausena anisata* vis à vis du DPPH
- Figure 35 :** Réactivité des échantillons 5, 7 et 8 de *Clausena anisata* récoltés à Houin vis à vis du DPPH
- Figure 36 :** Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus*
- Figure 37 :** Réactivité des échantillons 1, 2 et 3 des huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens* et du thymol vis à vis du DPPH
- Figure 38 :** Réactivité de l'huile essentielle de l'échantillon 1 d' *Aeolanthus pubescens* et des fractions obtenues par traitement basique vis à vis du DPPH
- Figure 39 :** Réactivité de l'huile essentielle de l'échantillon 4 d' *Aeolanthus pubescens* et du carvacrol vis à vis du DPPH
- Figure 40 :** Réactivité de l'huile essentielle d'*O. gratissimum* et du thymol vis à vis du DPPH
- Figure 41 :** Réactivité de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* (feuilles), du thymol et des différentes fractions chimiques vis à vis du DPPH
- Figure 42 :** Réactivité des six échantillons d'huiles essentielles de *Pimenta racemosa* vis-à-vis du DPPH

- Figure 43 :** Réactivité des échantillons 2 et 3 d'huiles essentielles de *Pimenta racemosa* de Godomey et de l'eugénol vis à vis du DPPH
- Figure 44 :** Réactivité de l'échantillon 1 de l'huile essentielle de *Pimenta racemosa* de Godomey 1, de l'eugénol et des différentes fractions chimiques vis à vis du DPPH
- Figure 45 :** Réactivité du chavicol vis à vis du DPPH
- Figure 46 :** Réactivité du mélange eugénol /chavicol dans les proportions (80:20) vis à vis du DPPH
- Figure 47 :** Prostaglandines et substances apparentées formées à partir de l'acide arachidonique chez l'animal (Schorderet et Dayer, 1992)
- Figure 48 :** Formation des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique
- Figure 49 :** Réactions biocatalytiques des "notes vertes" à partir de l'acide linoléique et Linoléique
- Figure 50 :** Répartition des constituants dans les échantillons d'huiles essentielles non actives
- Figure 51 :** Activité anti-inflammatoire des échantillons 1 et 2 de *Cymbopogon giganteus*
- Figure 52 :** Activité anti-inflammatoire du NDGA (acide nordihydroguaiarétique)
- Figure 53 :** Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger

### ANNEXE 3 : LISTE DES PLANCHES

- Planche 1** : *Annona muricata* L.  
**Planche 2** : *Annona squamosa* L.  
**Planche 3** : *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal  
**Planche 4** : *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich.  
**Planche 5** : *Commiphora africana* A. Rich. Engl  
**Planche 6** : *Chenopodium ambrosioides* L.  
**Planche 7** : *Pentadesma butyracea* Sabine  
**Planche 8** : *Aeolanthus pubescens* Benth.  
**Planche 9** : *Ocimum canum* Sims.  
**Planche 10** : *Ocimum gratissimum* L.  
**Planche 11** : *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore.  
**Planche 12** : *Cymbopogon giganteus* Chiov.  
**Planche 13** : *Cymbopogon nardus* (Linn) Rendle  
**Planche 14** : *Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook ex. Benth.  
**Planche 15** : *Lippia multiflora* Moldenke

#### ANNEXE 4 : LISTE DES PLANTES ETUDIEES

- 1- *Aeolanthus pubescens*
- 2- *Annona muricata*
- 3- *Annona squamosa*
- 4- *Chenopodium ambrosioides*
- 5- *Clausena anisata*
- 6- *Commiphora africana*
- 7- *Cymbopogon giganteus*
- 8- *Cymbopogon nardus*
- 9- *Lippia multiflora*
- 10- *Monodora myristica*
- 11- *Ocimum canum*
- 12- *Ocimum gratissimum*
- 13- *Pentadesma butyracea*
- 14- *Pimenta racemosa*
- 15- *Xylopia aethiopica*

**ANNEXE 5 : LISTE DES TABLEAUX**

- Tableau 1** : Extraction des huiles essentielles de feuilles d'*Annona muricata* L.
- Tableau 2** : Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles d'*Annona muricata* L.
- Tableau 3** : Etude comparative des composés majoritaires et des principaux groupes de composés des essences de feuilles d'*Annona muricata* L.
- Tableau 4** : Extraction d'huiles essentielles de feuilles d'*Annona squamosa* L.
- Tableau 5** : Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles d'*Annona squamosa* L.
- Tableau 6** : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal récoltées au Bénin
- Tableau 7** : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich du Bénin.
- Tableau 8** : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl.
- Tableau 9** : Extraction d'huiles essentielles de feuilles de *Chenopodium ambrosioides* L.
- Tableau 10** : Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles de *Chenopodium ambrosioides* L. récolté dans deux régions du Bénin.
- Tableau 11** : Composition chimique d'huiles essentielles et d'un extrait au pentane de feuilles de *Chenopodium ambrosioides* L. récolté à Sèhouè en 2006.
- Tableau 12** : Différentes fractions obtenues après hydrodistillation de 1 g d'huile essentielle de l'échantillon 7 de *Chenopodium ambrosioides* L (pH = 4).
- Tableau 13** : Composition chimique de l'huile essentielle de l'échantillon 7 de *Chenopodium ambrosioides* L fractionnée par hydrodistillation.
- Tableau 14** : Extraction des huiles essentielles de *Pentadesma butyracea* Sabine du Bénin (feuilles et écorces).
- Tableau 15** : Composition chimique d'huiles essentielles de *Pentadesma butyracea* Sabine (feuilles, écorces).
- Tableau 16** : Extraction des huiles essentielles de feuilles d'*Aeolanthus pubescens* Benth.

- 
- Tableau 17** : Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles d'*Aeolanthus pubescens* Benth.
- Tableau 18** : Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles d'*Ocimum canum* Sims.
- Tableau 19** : Extraction des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* L.
- Tableau 20** : Composition chimique des échantillons d'huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* L.
- Tableau 21** : Extraction des huiles essentielles de feuilles de *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore.
- Tableau 22** : Composition chimique des huiles essentielles d'échantillons de *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore. récoltées au Bénin.
- Tableau 23** : Obtention d'huiles essentielles de feuilles de *Cymbopogon giganteus* Chiov. du Bénin.
- Tableau 24** : Composition chimique d'huiles essentielles de feuilles de *Cymbopogon giganteus* Chiov.
- Tableau 25** : Composés majoritaires des huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus* Chiov. de différentes origines d'Afrique de l'Ouest.
- Tableau 26** : Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Cymbopogon nardus* (Linn) Rendle.
- Tableau 27** : Extraction des huiles essentielles des feuilles de *Clausena anisata* (Willd). J. D. Hook. ex. Benth.
- Tableau 28** : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Willd). J. D. Hook. ex. Benth. de différentes régions du Bénin
- Tableau 29** : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Willd). J. D. Hook. ex. Benth. récoltées à différentes périodes à Houin.
- Tableau 30** : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Lippia multiflora* Moldenke récoltées à Archérigbé (Zou).
- Tableau 31** : Paramètres antiradicalaires d'inhibiteurs de référence.
- Tableau 32** : Screening des échantillons d'huiles essentielles à 5g/L.
- Tableau 33** : Pouvoir antiradicalaire des huiles essentielles «faiblement actives».
- Tableau 34** : Potentiel antiradicalaire des échantillons d'huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides*.

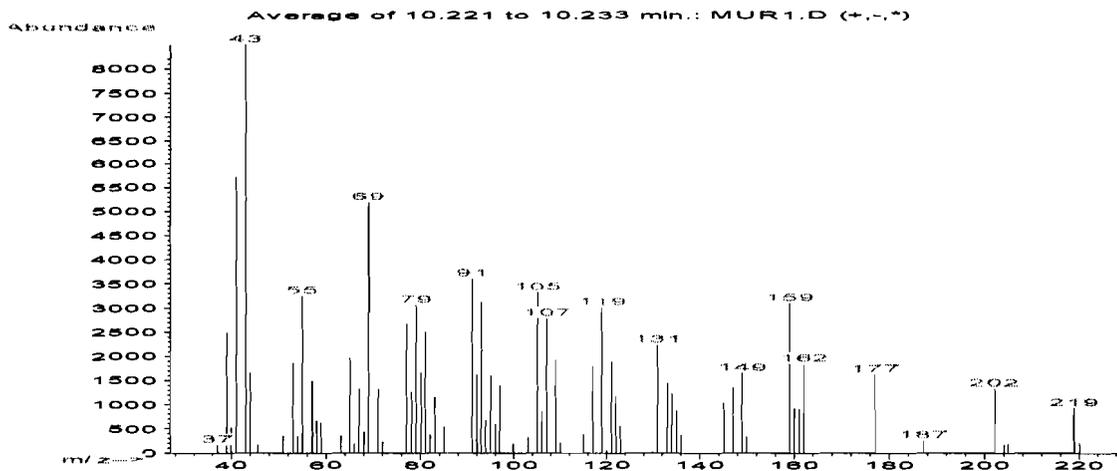
- Tableau 35** : Concentration chimique et activité antiradicalaire de l'huile essentielle de l'échantillon 7 *Chenopodium ambrosioides* fractionnée par hydrodistillation.
- Tableau 36** : Principaux constituants et activités antiradicalaires des huiles essentielles de feuilles de *Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook. ex. Benth. d'origines différentes.
- Tableau 37** : Principaux constituants et activités antiradicalaires des huiles essentielles de feuilles de *Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook ex. Benth. récoltées à différentes périodes à Houin.
- Tableau 38** : Constituants majeurs et activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* (Linn) Rendle.
- Tableau 39** : Pouvoir antiradicalaire des échantillons d'huiles essentielles classées «moyennement actives»
- Tableau 40** : Activité antiradicalaire des huiles essentielles très actives vis-à-vis du DPPH.
- Tableau 41** : Résultats du fractionnement de l'huile essentielle d'*Aeolanthus pubescens* 1 (Togon; Dassa-Zoumé) par extraction en milieu basique.
- Tableau 42** : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de l'échantillon 1. d'*Aeolanthus pubescens* et des fractions obtenues par traitement basique
- Tableau 43** : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* (feuilles) et des 2 fractions obtenues par traitement basique et extraction de l'huile essentielle.
- Tableau 44** : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle (échantillon 1) d'*Ocimum gratissimum* (feuilles) et des différentes fractions chimiques.
- Tableau 45** : Pourcentage relatif et réactivité des deux composés phénoliques des échantillons d'huiles essentielles de *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore. récoltées au Bénin vis-à-vis du DPPH.
- Tableau 46** : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pimenta racemosa* (feuilles) et des fractions obtenues par traitement basique de l'huile essentielle.
- Tableau 47** : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle (échantillon 1) de *Pimenta racemosa* (feuilles) de Godomey de ses différentes fractions chimiques et de ses 2 constituants phénoliques.

- Tableau 48** : Activités anti-inflammatoires des échantillons d'huiles essentielles « non actives ».
- Tableau 49** : Activités anti-inflammatoires des échantillons d'huiles essentielles « moyennement actives ».
- Tableau 50** : Composés majoritaires des échantillons d'huiles essentielles d'*Aeolanthus pubescens*.
- Tableau 51** : Composés majoritaires de l'huile essentielle d' *Ocimum canum* Sims.
- Tableau 52** : Composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* (feuilles).
- Tableau 53** : Composés majoritaires de l'huile essentielle de *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich.
- Tableau 54** : Principaux constituants de l'huile essentielle de *Monodora myristica* (Gaertn.) Dunal.
- Tableau 55** : Principaux constituants des huiles essentielles des feuilles de *Clausena anisata* (Willd). J. D. Hook. ex. Benth. récoltées à différentes périodes à Houin.
- Tableau 56** : Activités anti-inflammatoires des différents échantillons d'huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus*.
- Tableau 57** : Principaux constituants des huiles essentielles de *Cymbopogon Giganteus*.
- Tableau 58** : Fractionnement de 2g de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* de Setto 2 (échantillon 3) sur Florisil + activité anti-inflammatoire.
- Tableau 59** : Composition chimique de l'échantillon 3 d'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. (feuilles) et des fractions obtenues par chromatographie liquide/solide.

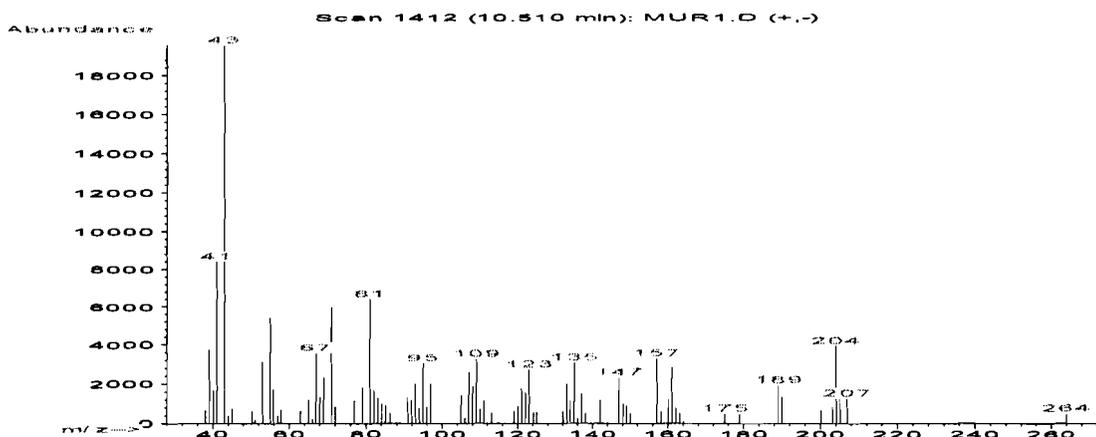
ANNEXE 6 : SPECTRES DE MASSE DES COMPOSES NON IDENTIFIES

*Annona muricata* L.

IR=1632

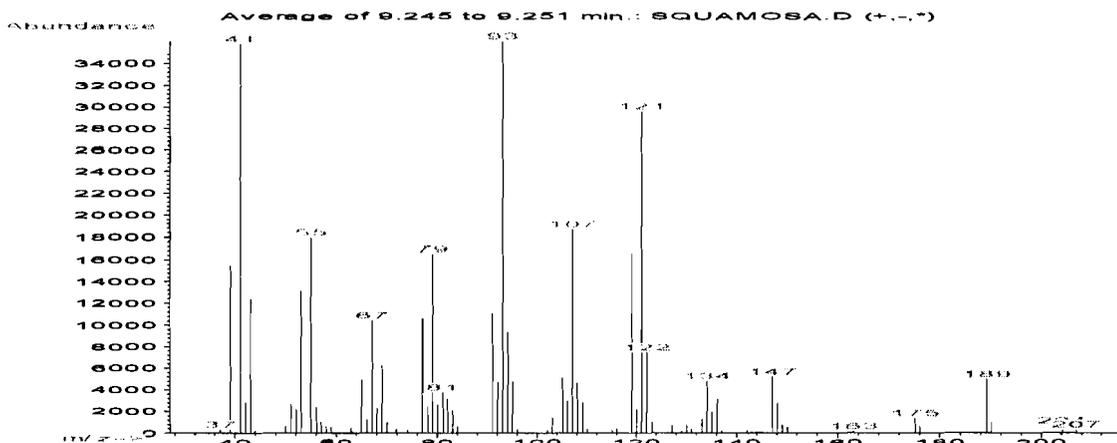


IR= 1658

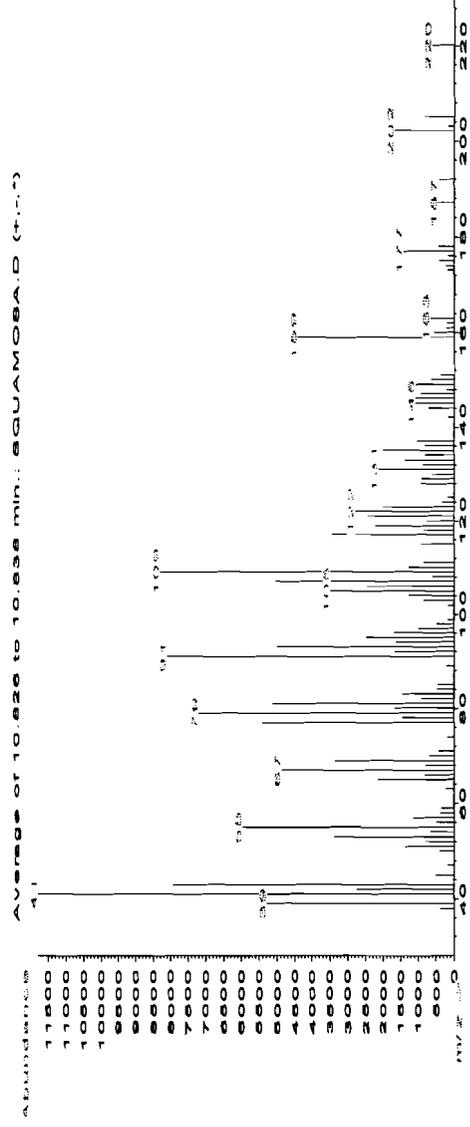


*Annona squamosa* L.

IR=1492

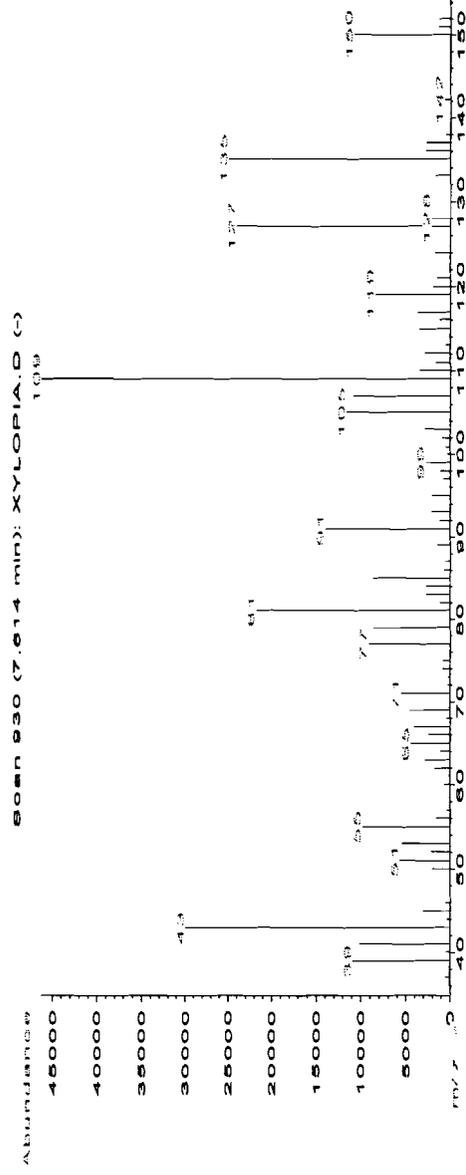


IR=1701

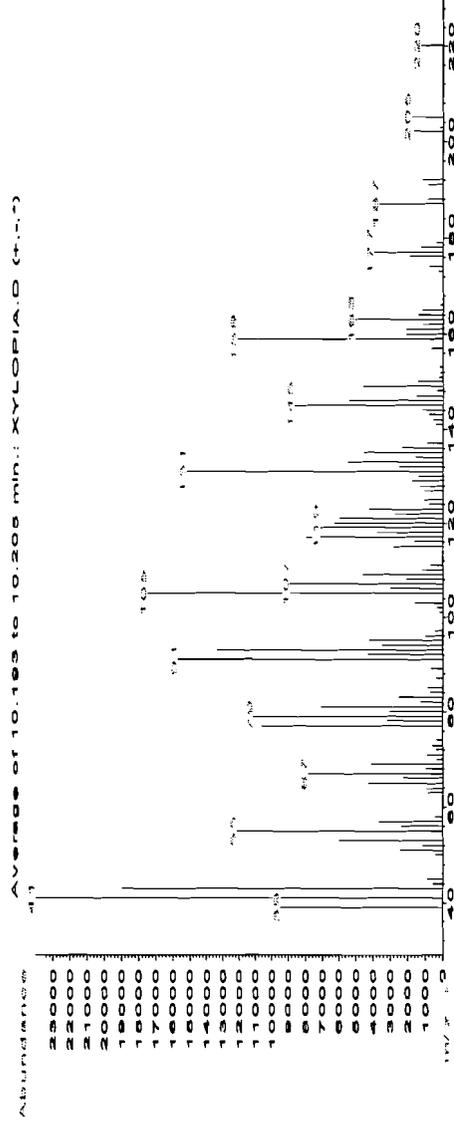


*Xylopiya aethiopica* (Dunal.) A.

IR=1282

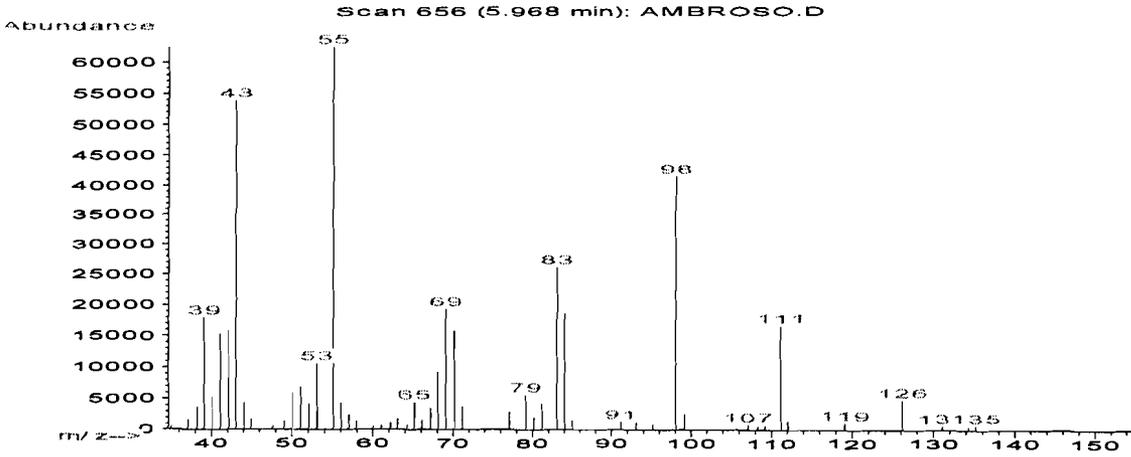


IR=1610

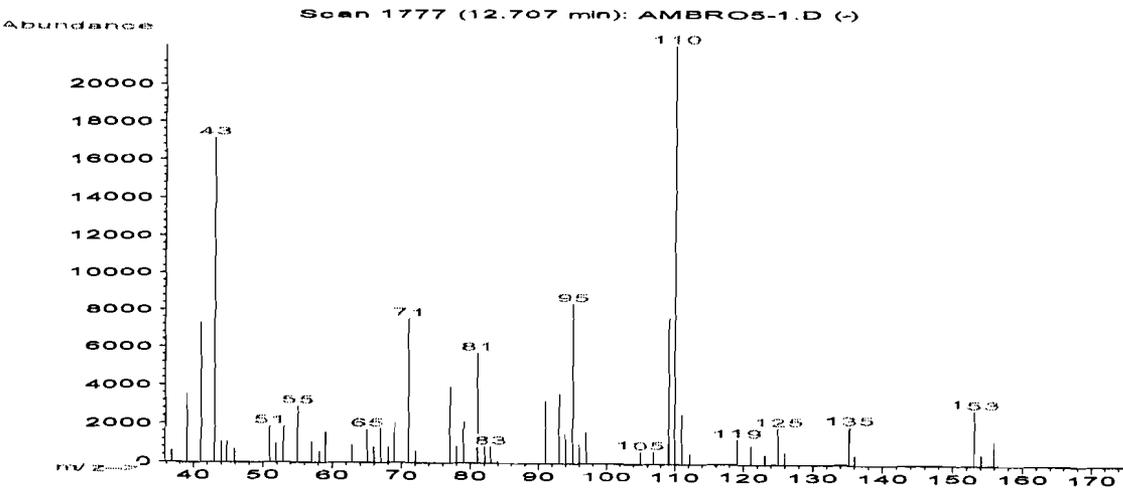


*Chenopodium ambrosioides* L.

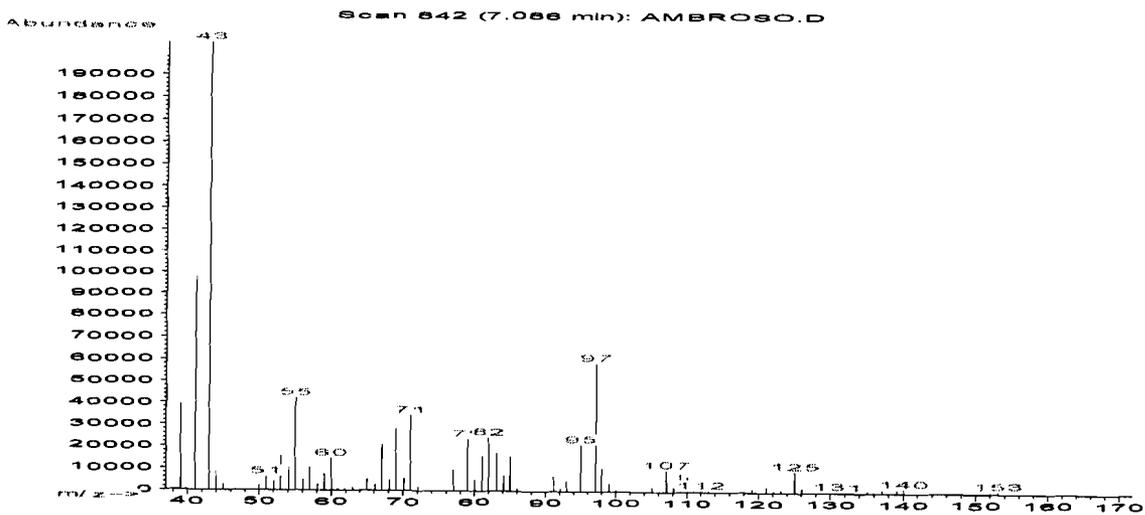
IR=1104



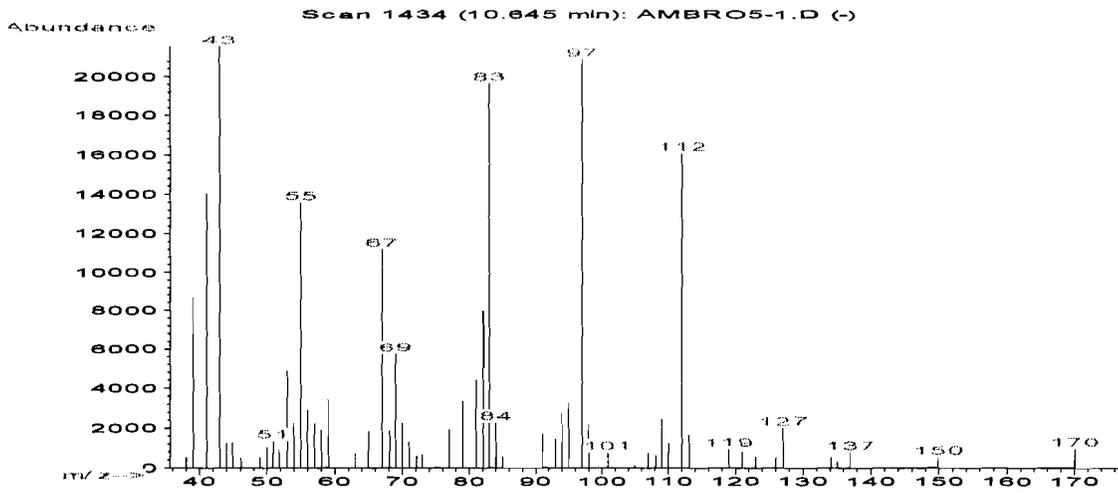
IR=1166



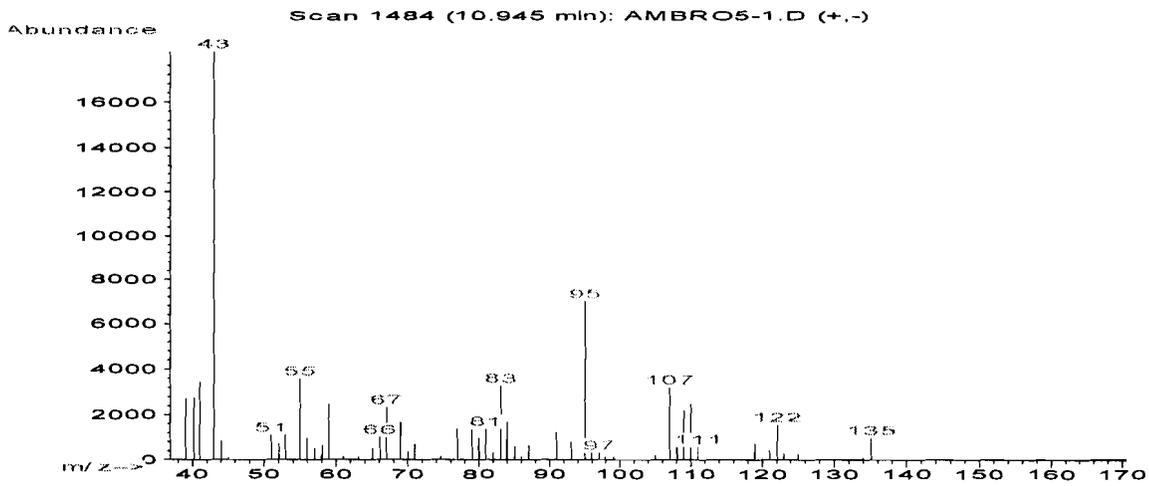
IR=1225



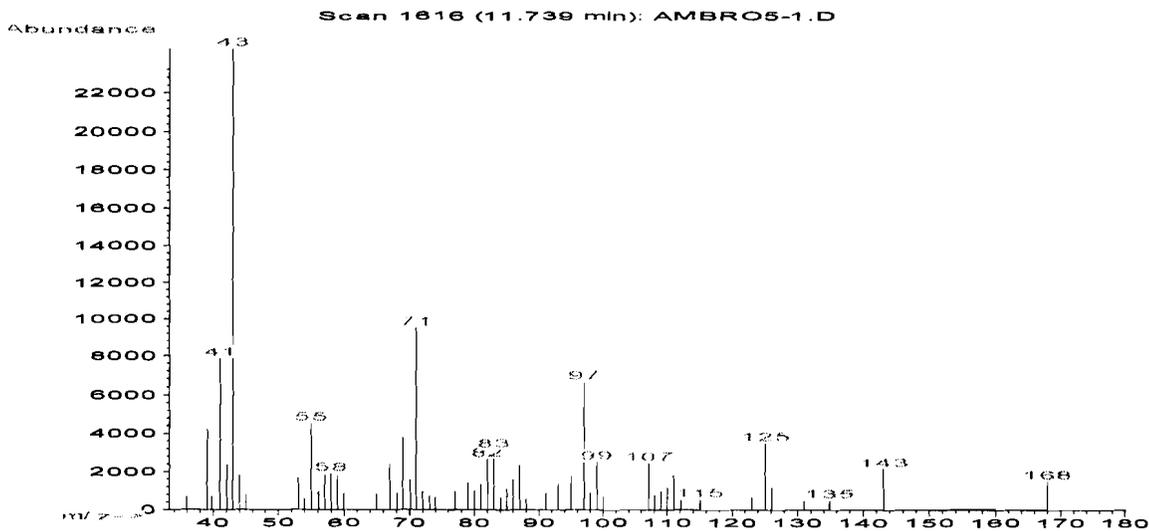
**IR=1305**



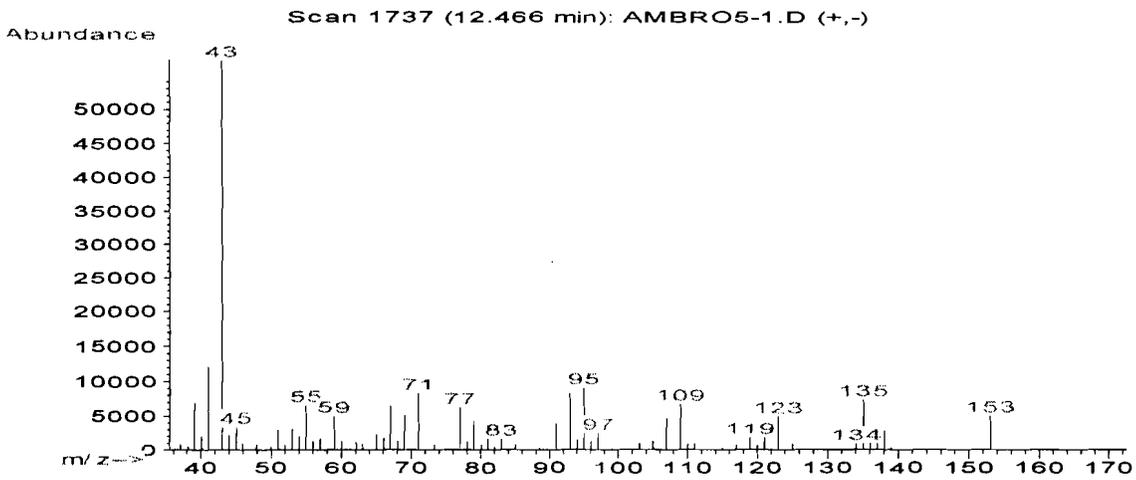
**IR=1329**



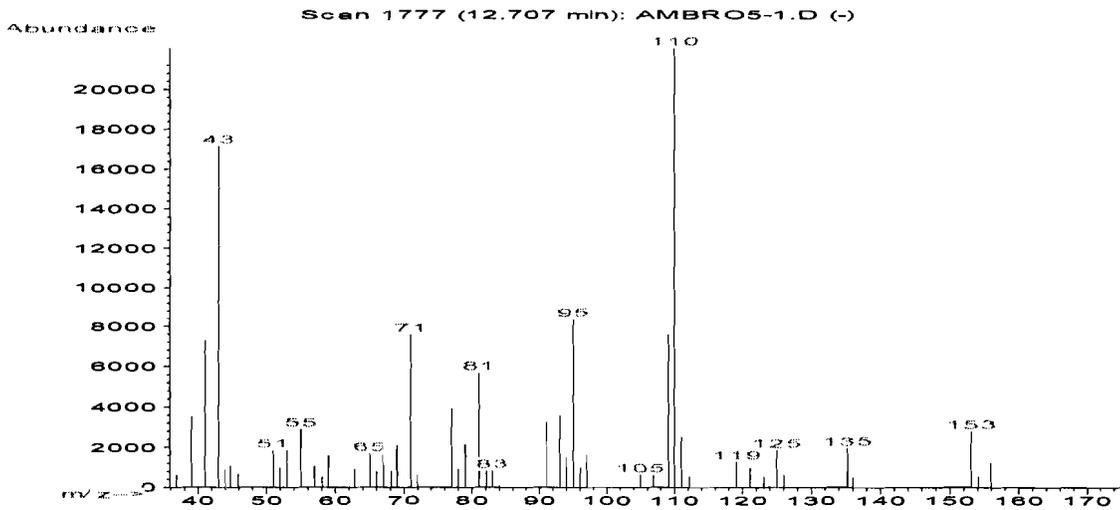
**IR=1375**



**IR=1441**

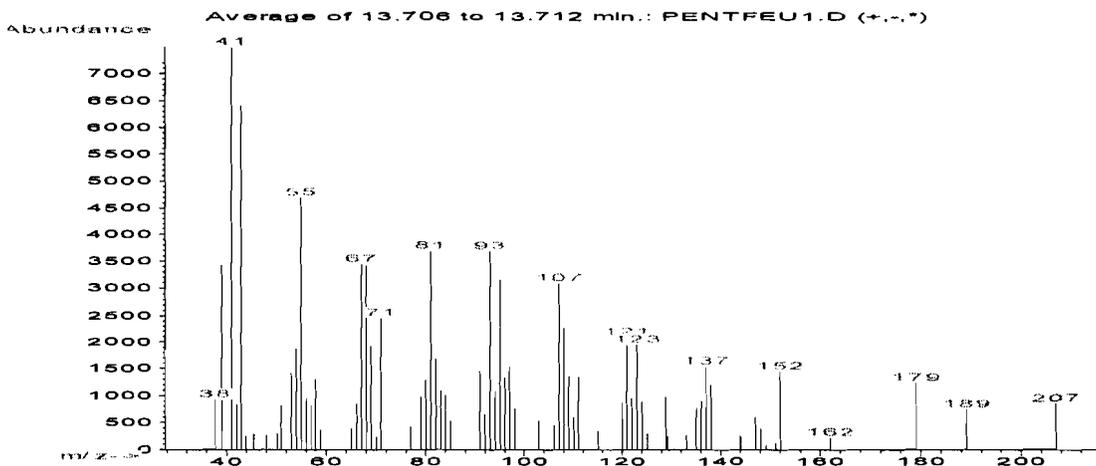


**IR=1473**

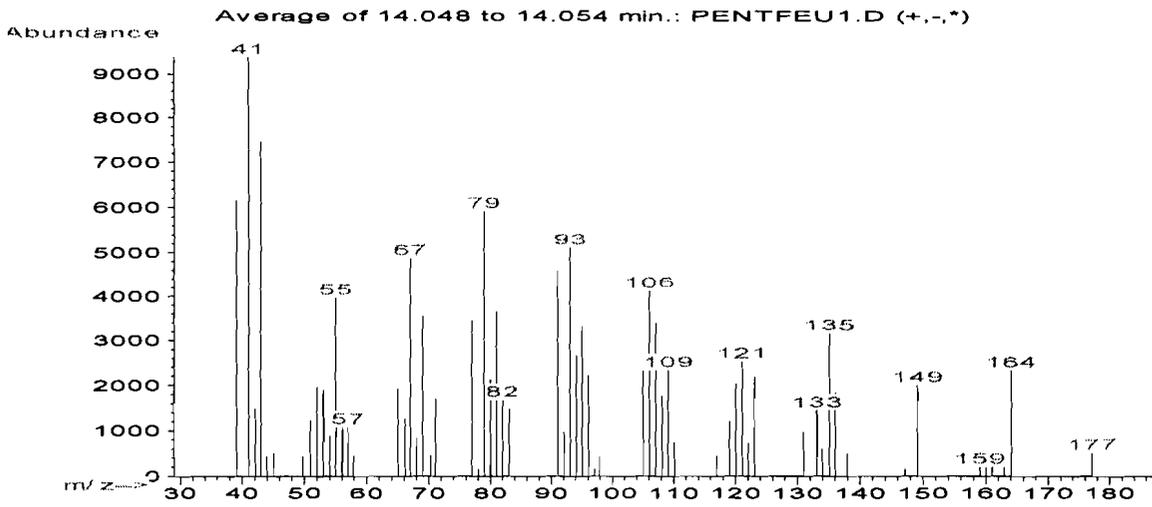


***Pentadesma butyracea* Sabine (feuilles, écorces)**

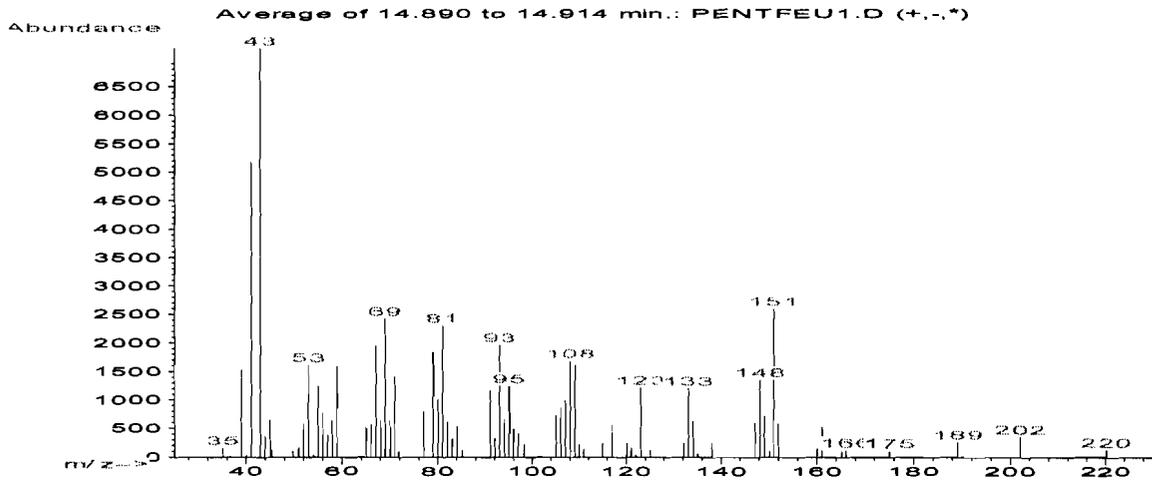
**IR=1549**



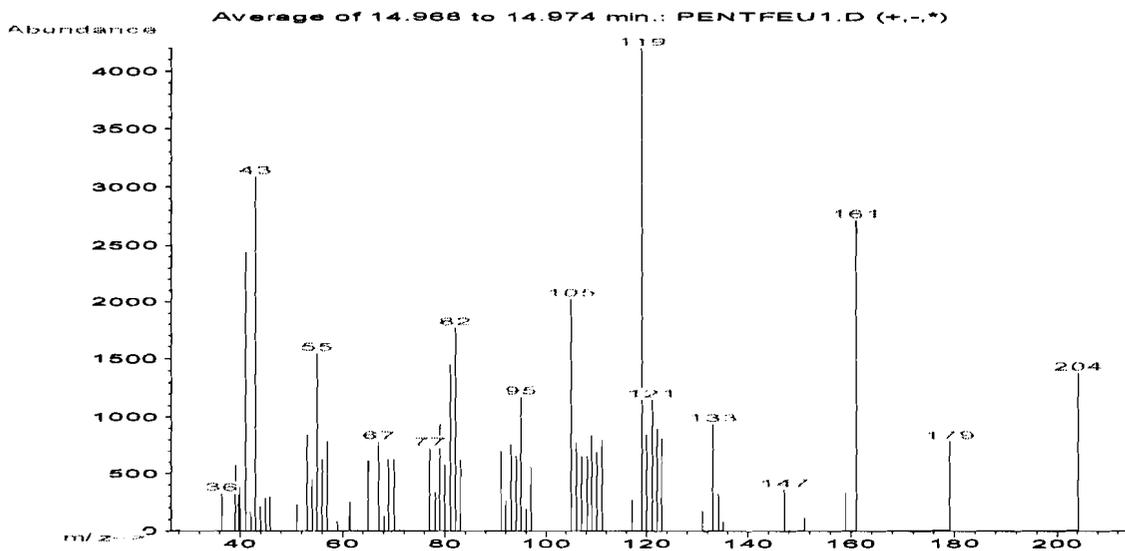
### IR=1564



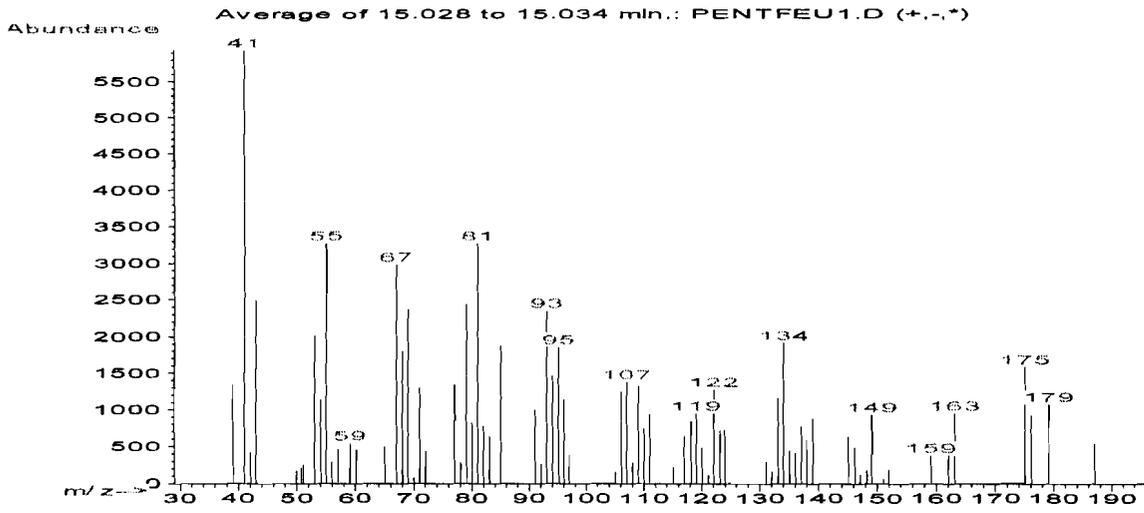
### IR=1621



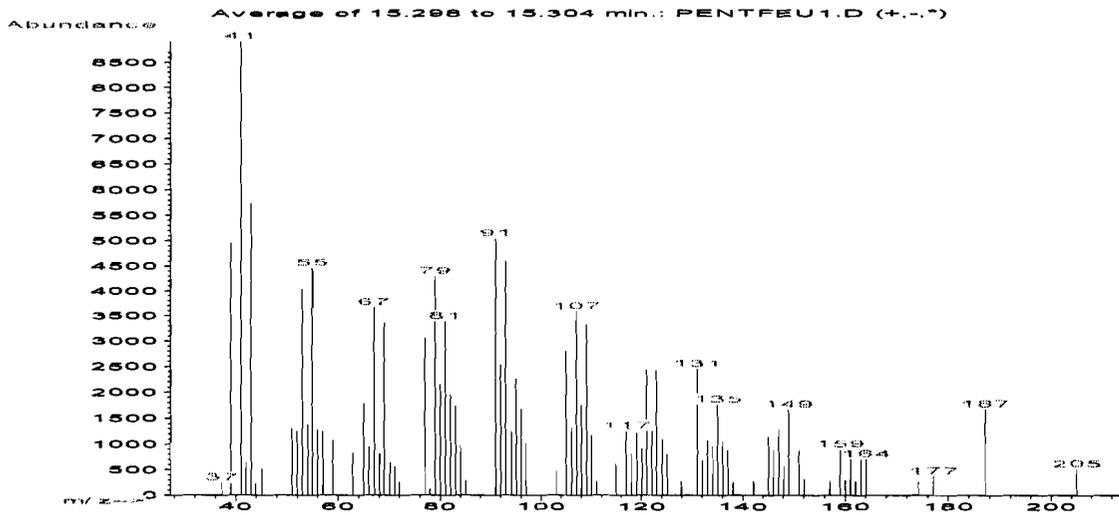
### IR=1632



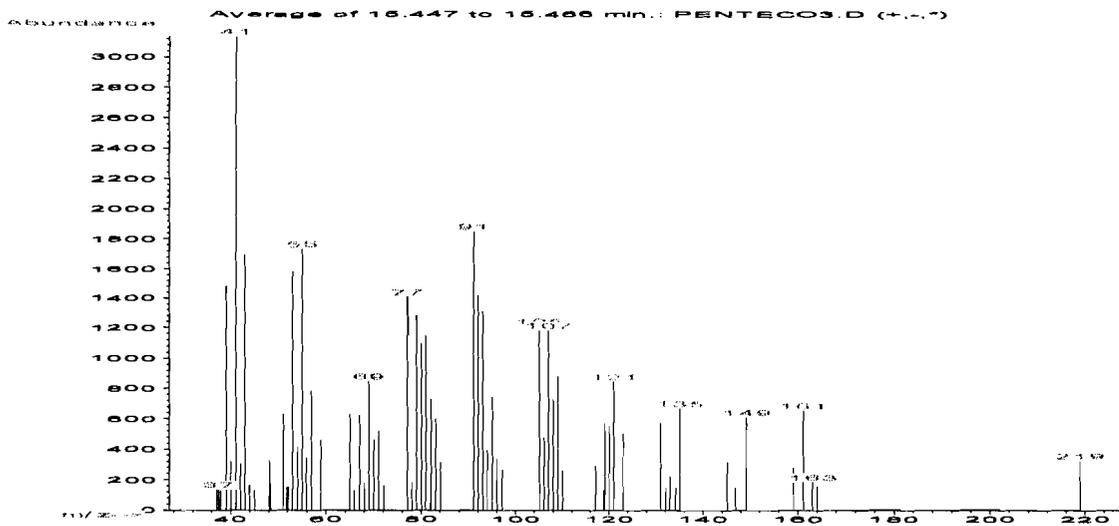
### IR=1643



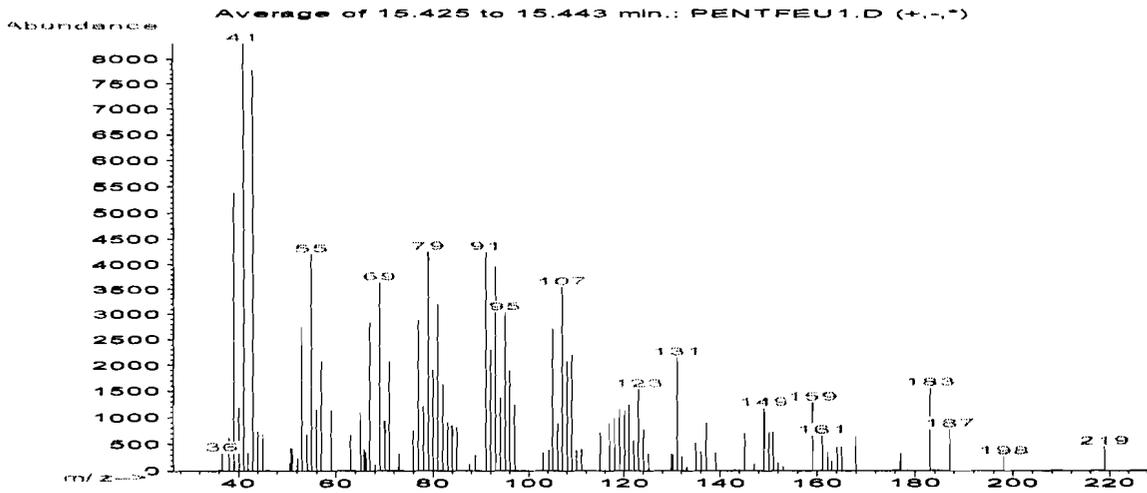
### IR=1661



### IR=1674 (a)



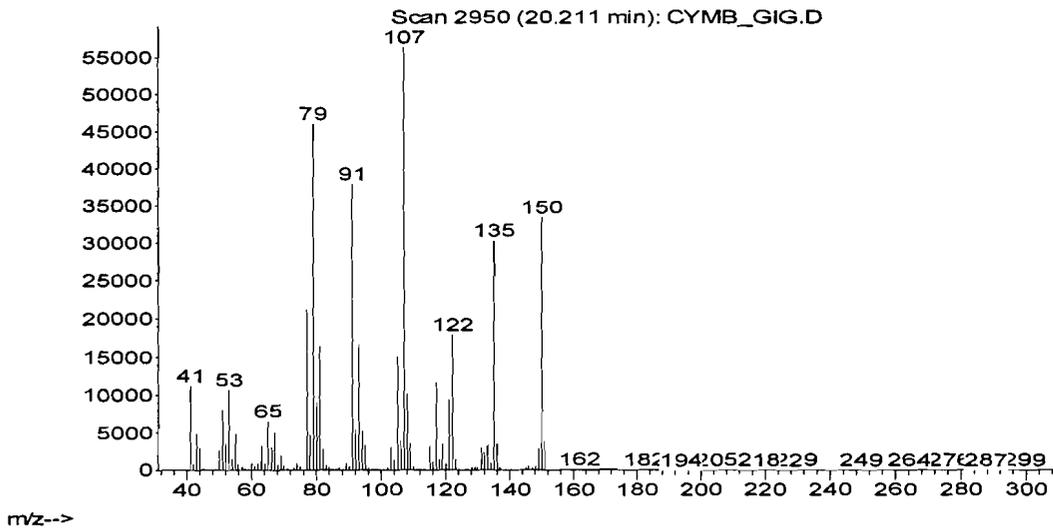
**IR=1674 (b)**



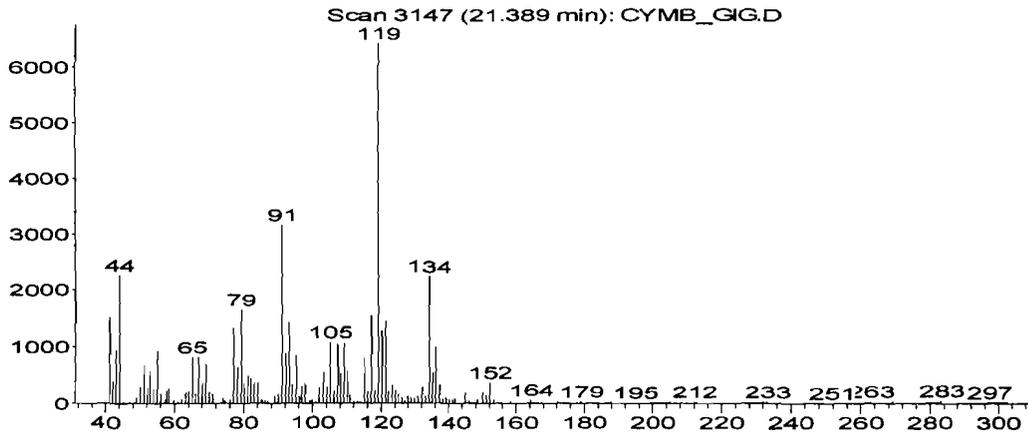
***Cymbopogon giganteus* Chiov.**

**IR=1205**

Abundance



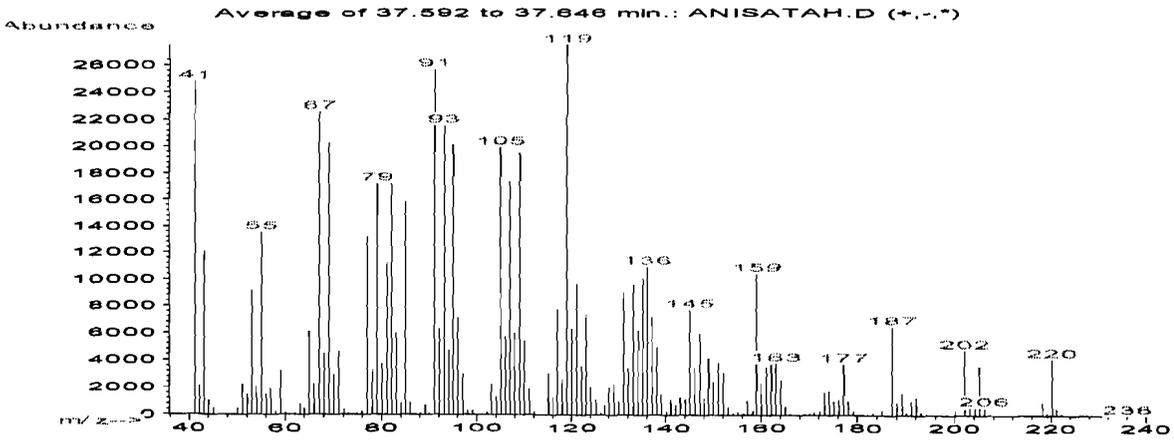
**IR=1242**  
Abundance



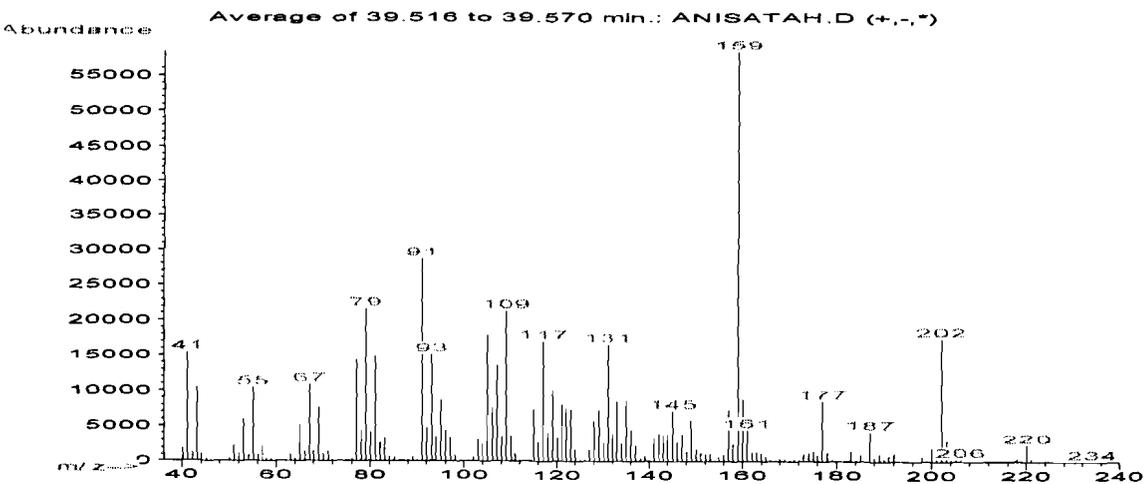
m/z-->

*Clausena anisata* (Willd) J. D. Hook ex. Benth. récoltées à Houin.

**IR=1634**  
Abundance

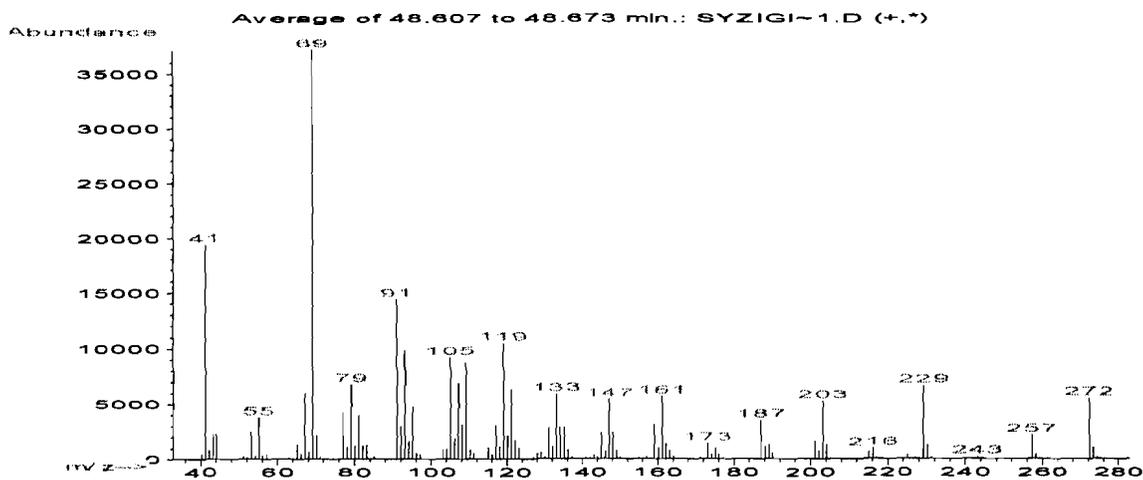


**IR=1703**  
Abundance

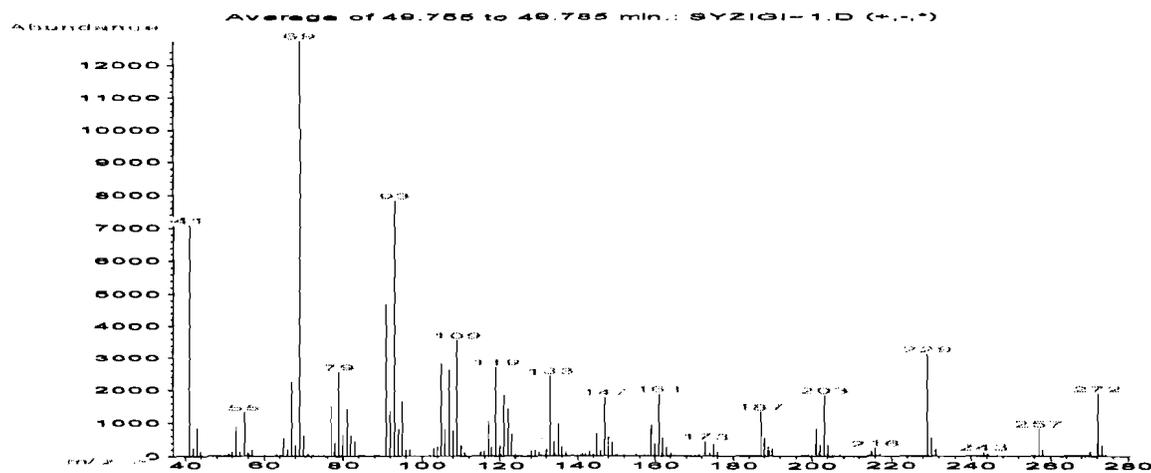


*Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore.

IR=1941



IR=1981



## HUILES ESSENTIELLES EXTRAITES DE PLANTES AROMATIQUES D'ORIGINE BENINOISE : ETUDE CHIMIQUE, EVALUATION BIOLOGIQUE ET APPLICATIONS POTENTIELLES

---

Ce travail rend compte des études chimiques et biologiques des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques d'origine béninoise.

La première partie rappelle quelques généralités sur les huiles essentielles.

La deuxième partie donne les résultats de l'analyse chimique des constituants volatils extraits de 15 espèces aromatiques appartenant à 9 familles botaniques, collectées dans différentes régions du Bénin: les Annonaceae, les Burseraceae, les Chenopodiaceae, les Guttiferae, les Labiatae, les Myrtaceae, les Poaceae, les Rutaceae et les Verbenaceae. Parmi les espèces étudiées, les constituants volatils de *Pentadesma butyracea* (Guttiferae) sont décrits pour la première fois sur le plan chimique. On trouve sur l'ensemble des échantillons examinés, les différentes structures rencontrées dans les huiles essentielles: terpènes, dérivés aromatiques et constituants aliphatiques.

Tous les échantillons ont été testés pour évaluer leurs activités antiradicalaires et anti-inflammatoires. L'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* a montré un potentiel anti-inflammatoire intéressant. Les huiles essentielles de trois autres espèces, *Aeolanthus pubescens*, *Pimenta racemosa* et *Ocimum gratissimum*, riches en composés phénoliques, ont présenté une forte activité antiradicalaire. L'évaluation des fractions chimiques de ces huiles essentielles et de leurs composants majoritaires a permis de mieux cerner la relation structure/activité.

L'ensemble des résultats, tant sur le plan chimique que biologique, met en évidence les potentialités de certaines espèces, pour une exploitation de leur huile essentielle à des fins thérapeutiques ou pour des applications cosmétiques.

---

## ESSENTIAL OILS FROM SOME AROMATIC PLANTS FROM BENIN: CHEMICAL STUDY, BIOLOGICAL ACTIVITY AND POTENTIAL APPLICATIONS.

---

The work relates the chemical and biological valuations of essential oils obtained from some aromatic plants from Benin.

The first part presents generalities on essential oils.

The second part reports the results of chemical analyses of the essential oils obtained from 15 aromatic species belonging to 9 botanical families collected in different localities of Benin: Annonaceae, Burseraceae, Chenopodiaceae, Guttiferae, Labiatae, Myrtaceae, Poaceae, Rutaceae and Verbenaceae. The chemical composition of *Pentadesma butyracea* essential oil is described for the first time. The main structures identified in the examined samples are common essential oil components: terpenes, aromatic derivatives and aliphatic constituents.

All samples were tested to estimate their antiradical and anti-inflammatory activities. The essential oil of *Cymbopogon giganteus* presented an interesting anti-inflammatory potential activity. The essential oils of three other species: *Aeolanthus pubescens*, *Pimenta racemosa* and *Ocimum gratissimum*, characterized by high contents of phenolic compounds, presented a high antiradical activity.

Biological appraisalment of essential oil fractions and of their major components gave some indication about the chemical structures and biological activity relationship.

On the whole, the results both on the chemical and biological plan, show the potentialities of some species for an use of their essential oil in therapeutics or cosmetics.

---

### MOTS - CLES

Plantes aromatiques, Plantes médicinales, huiles essentielles, composition chimique, activités antiradicalaires, activités anti-inflammatoires.

---