

N° d'Enregistrement UNB/DSM/CM/99/05/01

UNIVERSITÉ NATIONALE DU BÉNIN
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

JOACHIM DJIMON GBENOU
Maître ès – Sciences Physiques

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE
DES SUBSTANCES NATURELLES
(Spécialité : SCIENCES DES MATÉRIAUX)

**HUILES ESSENTIELLES DE QUELQUES PLANTES
AROMATIQUES DES GENRES *EUCALYPTUS* ET *MELALEUCA*
(MYRTACEES) ET *CHENOPODIUM* (CHENOPODIACEES) DU
BENIN : VARIATIONS INTER ET INTRASPECIFIQUES DU
RENDEMENT ET DE LA COMPOSITION CHIMIQUE ET
PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES**

Soutenue publiquement le 17 Avril 1999 devant le jury composé de :

Président : M. K. H. KOUMAGLO, Professeur, Université du Bénin, Lomé Togo

Membres : M. J. C. CHALCHAT, Maître de Conférences, Université Blaise Pascal de Clermont, France

M. T. SILOU, Professeur, Université Marien N'Gouabi de Brazzaville, Congo

M. B. S. ADEOTI, Maître de Conférences, Université Nationale du Bénin

M. M. A. AYEDOUN, Maître de Conférences, Université Nationale du Bénin

M. M. MOUDACHIROU, Maître de Conférences, Université Nationale du Bénin

(Directeur de Thèse)

NOM: Joachim Djimon GBENOU

TITRE :

HUILES ESSENTIELLES DE QUELQUES PLANTES AROMATIQUES DES GENRES *EUCALYPTUS* ET *MELALEUCA* (MYRTACÉES) ET *CHENOPODIUM* (CHÉNOPODIACÉES) DU BÉNIN : VARIATIONS INTER ET INTRASPÉCIFIQUES DU RENDEMENT ET DE LA COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIÉTÉS PHARMACODYNAMIQUES

RÉSUMÉ

Le travail porte sur l'optimisation de la production des huiles essentielles à travers l'étude des variations inter et intraspécifiques des rendements et des compositions chimiques de 432 échantillons d'huiles essentielles issues de deux familles (Myrtacées et Chenopodiacees), de trois genres (*Eucalyptus*, *Melaleuca* et *Chenopodium*) et de sept espèces (*camaldulensis*, *citriodora*, *globulus*, *tereticornis*, *torelliana*, *quinquenervia* et *ambrosioides*) botaniquement contrôlées et sur la détermination des effets biologiques de 7 de ces échantillons sur cinq microorganismes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, et *Candida albicans*).

*- Les rendements en huiles extraites dépendent plus du site que de la période de récolte pour *E. citriodora*, alors que pour *E. camaldulensis*, les deux facteurs, lieu et date de récolte doivent être pris en considération.

Pour *M. quinquenervia*, on note qu'il y a une faible influence de la période de récolte sur le rendement, qu'il n'y a pas de perte de volume après 60 jours de stockage et que 6 à 14 jours de séchage à l'ombre du matériel végétal paraît être le temps nécessaire pour un rendement optimal.

*- Du point de vue de la composition chimique, on distingue au sein de *E. camaldulensis* trois types chimiques influencés par la période, le lieu de récolte et l'âge des feuilles : - type à 1,8-cinéole, - type à paracymène, - type à γ -terpinène .

Les essences de *E. citriodora*, ont des taux en citronellal supérieurs à 70%. Leurs compositions chimiques sont plus influencées par le site que par la période de récolte.

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a un taux de 1,8-cinéole supérieur ou égal à 70%.

L'analyse de l'huile essentielle de *E. tereticornis* du Bénin indique l'existence de deux chémotypes : - type à 1,8-cinéole, - type à farnésol (84% tout isomère compris)

L'étude de *M. quinquenervia* révèle l'existence de trois chémotypes :- type à 1,8-cinéole, - type à taux égal de 1,8-cinéole et de viridiflorol, - type à viridiflorol et une homogénéité de la composition chimique tout au long de l'année et ne subissant aucune influence saisonnière.

Quant aux huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides* analysées, le taux en ascaridol varie entre 6,4 et 26,45%. L'oxyde d'ascaridol, un nouveau produit, isolé, est caractérisé avec un pourcentage allant de 14,40 à 50,7%. Un échantillon, riche en α -terpinène (44,4%) et pauvre en ascaridol (8,32%) devient, après vieillissement par autoxydation, très riche en ascaridol (52,28%) et très pauvre en α -terpinène (0,05%).

*- En ce qui concerne l'activité biologique, *Staphylococcus aureus* (Gram+) se révèle être la bactérie la plus sensible et *Klebsiella pneumoniae* (Gram-) la plus résistante. L'activité antifongique observée pour *Candida albicans* varie suivant les lots d'huiles essentielles testées.

L'huile essentielle de *E. citriodora* est la plus active suivie de celle de *M. quinquenervia*. L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* se classe, après autoxydation, en première position devant celle de *E. citriodora*. Le vieillissement des huiles améliore leurs propriétés biologiques.

L'activité d'une essence semble être influencée par la présence de composés comportant une fonction oxygénée.

DÉDICACE

Je dédie cette thèse

À mes parents dont les soutiens ne m'ont jamais fait défaut.

À la mémoire de mon Père comme une première gerbe sur l'anonymat de sa tombe "Au jour le jour, un jour".

À mon Épouse et à mes Enfants, qu'elles trouvent ici le témoignage de toute mon affection et de ma tendresse.

À mes Frères et Sœurs, mes Cousins et Cousines et mes Neveux et Nièces, qu'ils trouvent ici le fruit d'un travail soutenu et bien fait.

À mes Beaux-parents,

À mes Amis, qu'ils reçoivent le témoignage de ma persévérance et de mon courage

À tous ceux qui œuvrent pour l'émergence des valeurs humaines et morales.

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée, au laboratoire de Chimie des Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales de la faculté des Sciences et Techniques de l'Université Nationale du Bénin, sous la direction de Monsieur **M. MOUDACHIROU**, responsable dudit laboratoire.

C'est un grand honneur pour moi, de trouver ici l'occasion, d'exprimer à cet homme qui allie la rigueur scientifique aux qualités humaines ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance pour ses conseils scientifiques, son appui pédagogique et son soutien moral et matériel.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **J. C. CHALCHAT**, Maître de Conférences à l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand. Ses nombreux et précieux conseils dont j'ai toujours bénéficié, sa disponibilité pour l'identification des différents constituants de nos huiles essentielles par couplage Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectre de Masse, son efficacité et dynamisme ont été d'un appui pour la réalisation de ce travail .

Je lui témoigne ma gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de Chimie des Huiles Essentielles et pour avoir accepté de participer à mon jury.

J'exprime toute ma connaissance et mes remerciements au Professeur **K. H. KOUMAGLO**, Responsable du laboratoire des Extraits Végétaux et Arômes Naturelle de la Faculté des Sciences de l'Université du Bénin à Lomé et à Monsieur **B. S. ADEOTI**, Maître de Conférences en Chimie Organique à l'Université Nationale du Bénin pour avoir bien voulu examiner ce travail et accepter d'être les Rapporteurs auprès de l'Université.

Monsieur **M. A. AYEDOUN**, Maître de Conférences en Chimie Organique à l'Université Nationale du Bénin, malgré ses multiples occupations, m'a fait l'honneur de participer à ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Ma reconnaissance va également à Monsieur **T. SILOU**, Professeur de l'Université Marien Ngouabi de Brazzaville qui, malgré les nombreuses difficultés, a accepté de faire le déplacement pour participer à mon jury.

Au professeur **F-X. GARNEAU** du laboratoire d'Analyse et de Séparation des Extraits Végétaux de l'Université de Chicoutimi au Québec qui a accepté d'analyser nos extraits, j'exprime tous mes remerciements.

Que le Professeur **G. LAMATY** de l'Université de Montpellier II trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à le remercier vivement pour ses nombreux et précieux conseils et son soutien dans l'élaboration de ce travail et pour m'avoir reçu en stage d'analyse dans son laboratoire.

J'adresse mes remerciements à Monsieur **G. ACCROMBESSI**, Maître de Conférence en Chimie Organique à l'Université Nationale du Bénin, pour ses conseils et son soutien moral.

J'exprime ma reconnaissance envers Madame **H. CONFOLENT**, Technicienne à la Pharmacie Centrale du Centre Hospitalier Régional de Clermont Ferrand pour m'avoir initié aux techniques de tests antimicrobiens.

Mes remerciements vont à tous les Enseignants qui ont guidé nos pas depuis la Maternelle jusqu'à l'Université.

À tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué d'une manière ou d'une autre à la bonne réalisation de cette œuvre en me prodiguant leurs conseils, leur encouragement et leur affection, j'exprime toute ma gratitude.

TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES D'ORIGINE BENINOISE.....	6
---	----------

Chapitre I : GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES.....	7
--	----------

I - 1 DEFINITION DE L'HUILE ESENTIELLE.....	7
---	----------

I - 2 LOCALISATION DES HUILES ESSENTIELLES DANS LES PLANTES.....	8
--	----------

I - 2- 1 Les cellules sécrétrices.....	8
---	----------

I - 2- 1-1 Les cellules épidermiques.....	8
--	----------

I - 2- 1-2 Les poils sécréteurs.....	9
---	----------

I - 2- 1-3 Les cellules sécrétrices internes.....	9
--	----------

I - 2- 2 Les poches sécrétrices.....	9
---	----------

I - 2- 2- 1 Les poches schizogènes.....	9
--	----------

I - 2- 2- 2 La poche lysigène.....	10
---	-----------

I - 2- 2- 3 La poche schizolysigène.....	10
---	-----------

I - 2- 3 Les canaux sécréteurs.....	10
--	-----------

I - 2- 4 Conséquences.....	10
---------------------------------------	-----------

I - 3 FONCTIONS DES HUILES ESSENTIELLES DANS LA PLANTE.....	11
---	-----------

I - 4 METHODES D'EXTRACTION.....	11
--	-----------

I - 4- 1 L'hydrodistillation.....	11
--	-----------

I - 4- 2 Extraction par expression à froid.....	12
--	-----------

I - 4- 3 Extraction par solvant volatil.....	12
---	-----------

I - 4- 4 Extraction par incision ou exsudation.....	13
--	-----------

I - 4- 5 Extraction par "enfleurage".....	13
--	-----------

I - 4- 6 Extraction assistée par micro-ondes.....	13
--	-----------

I - 4- 7 Extraction par fluides supercritiques.....	14
--	-----------

I - 5	METHODES D'ANALYSE	14
I - 5- 1	Méthodes d'analyses physiques et chimiques	15
I - 5- 2	Méthodes d'analyses chromatographiques et spectrales	15
I - 5- 2- 1	La chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.).....	16
I - 5- 2- 2	Identification par couplage CPG/SM.....	17
I - 5- 2- 3	Le couplage CPG/IRFT.....	18
I - 5- 2- 4	La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone -13.....	19
I - 5- 2- 5	Identification d'un constituant par chromatographie liquide-solide sur gel de silice.....	20
I - 6	COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES	20
I - 6- 1	Les composés terpéniques	20
I - 6- 2	Les composés aromatiques	24
I - 6- 3	Composés d'origines diverses	25
I - 7	STABILITE DES HUILES ESSENTIELLES	26
I - 8	VALORISATION DES HUILES ESSENTIELLES	26
I - 8- 1	Préparation des produits optiquement purs à partir des huiles essentielles	27
I - 8- 2	Fonctionnalisation des terpènes par bioconversion	28
I - 8- 3	Autoxydation et photo-oxydation des terpènes	31
I - 8- 3- 1	Autoxydation.....	31
I - 8- 3- 2	Photo-oxydation.....	32
I - 9	LES CHEMOTYPES	32
I - 10	LES PROPRIETES DES HUILES ESSENTIELLES	33
I - 10- 1	Propriétés physiques des huiles essentielles	33
I - 10- 2	Propriétés biologiques et champs d'action	35
I - 10- 3	Quelques travaux effectués sur les propriétés des huiles essentielles	35
I - 10- 4	Propriétés indésirables et toxicités des composants aromatiques	36
I - 11	USAGE DES HUILES ESSENTIELLES	37
I - 11- 1	Recherche de la qualité	37
I - 11- 2	Industrie pharmaceutique	38

I - 11-3	Industrie cosmétologique et parfumerie	40
I - 11-4	Industrie alimentaire	40
I - 11-5	Industrie minière	41

Chapitre II : ETUDE DE QUELQUES ESPECES D'EUCALYPTUS DU BENIN.....42

INTRODUCTION42

II - 1	GENERALITES SUR LE GENRE EUCALYPTUS	43
II - 1-1	Origine	43
II - 1-2	Botanique	44
II - 1-3	Usages	48
II - 1-4	Huiles essentielles des Eucalyptus	49
II - 1-4-1	Aperçu historique.....	49
II - 1-4-2	Usages des huiles essentielles d'Eucalyptus.....	51
II - 1-4-2-1	Les huiles essentielles médicinales.....	51
II - 1-4-2-2	Les huiles essentielles de parfumerie.....	52
II - 1-4-2-3	Les huiles essentielles industrielles.....	54
II - 1-4-3	Composition chimique des huiles essentielles d'Eucalyptus.....	54
II - 1-4-4	Les causes de variation de la composition chimique et du rendement des huiles essentielles.....	57
II - 1-4-4-1	Les types de feuilles et leur âge.....	57
II - 1-4-4-2	Effet de stockage.....	58
II - 1-4-4-3	Influence de la période de récolte sur le rendement et la composition chimique.....	60
II - 1-4-4-4	Influence de la durée d'extraction.....	62
II - 1-4-4-5	Influence du lieu de récolte.....	62
II - 2	EUCALYPTUS CAMALDULENSIS DEHN , SYN. E. ROSTRATA SCHLECHT.	63
II - 2-1	Description botanique	63
II - 2-2	Emplois	65
II - 2-3	Huiles essentielles de E. camaldulensis : Travaux des auteurs	66
II - 2-3-1	Type à 1,8-cinéole ($\geq 28\%$).....	66
II - 2-3-2	Type à p-cymène.....	70
II - 2-3-3	Type à Spathulénol.....	71

II - 3	HUILES ESSENTIELLES D'EUCALYPTUS CAMALDULENSIS : NOS TRAVAUX	72
II - 3- 1	Teneur en huiles essentielles	72
II - 3- 2	Influence de la période et du lieu de récolte sur le rendement	73
II - 3- 3	Composition chimique de l'huile essentielle de l'Eucalyptus camaldulensis du Bénin	76
II - 3- 3- 1	Matériel végétal.....	76
II - 3- 3- 2	Résultats et discussions.....	76
II - 3- 3- 2-1	Chémotype à 1,8-cinéole.....	81
II - 3- 3- 2-2	Chémotype à p-cymène.....	81
II - 3- 3- 2-3	Chémotype à γ -terpinène.....	82
II - 3- 4	Influence de la période et du lieu de récolte sur la composition chimique	93
II - 3- 5	Influence de l'âge de la plante sur la composition chimique	96
II - 3- 6	Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature	100
II - 3- 7	Conclusion	101
II - 4	EUCALYPTUS CITRIODORA HOOK. SYN. E. MACULATA VAR. CITRIODORA BALEY	103
II - 4- 1	Botanique	103
II - 4- 2	Emplois	103
II - 4- 3	Huile essentielle de E.citriodora : travaux des auteurs	105
II - 4- 3-1	Type à citriodora ($\geq 65\%$).....	106
II - 4- 3-2	Variété intermédiaire.....	109
II - 4- 3-3	Variété "A".....	109
II - 4- 3-4	Type Hydrocarboné.....	110
II - 5-	LES HUILES ESSENTIELLES DE E. CITRIODORA DU BENIN : NOS TRAVAUX	110
II - 5-1	Teneur en huiles essentielles	110
II - 5-2	Composition chimique des huiles essentielles de E. citriodora du Bénin	115
II - 5-2-1	Matériel Végétal.....	115
II - 5-2-2	Résultats et discussions.....	115
II - 5-3	Influence du lieu et de la période de récolte sur la composition chimique	124
II - 5-4	Influence de l'âge de la plante sur la composition Chimique de l'huile essentielle	126

II - 5-5	Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature.....	131
II - 5-6	Conclusion	
II - 6	EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL.....	132
II - 6-1	Aspect botanique.....	132
II - 6-2	Emplois.....	134
II - 6-3	Huiles essentielles de E. globulus : travaux antérieurs.....	135
II - 7	HUILES ESSENTIELLES DE E. GLOBULUS DU BENIN : NOS TRAVAUX.....	136
II - 7-1	Composition chimique des huiles essentielles de E. globulus du Bénin.....	136
II - 7-2	Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature.....	139
II - 7-3	Conclusion.....	139
II - 8	EUCALYPTUS TERETICORNIS SMITH.....	140
II - 8-1	Aspect botanique.....	140
II - 8-2	Emplois.....	140
II - 8-3	Composition chimique de l'huile essentielle : travaux antérieurs.....	142
II - 8-3-1	Chémotype à 1,8-cinéole.....	142
II - 8-3-2	Chémotype à p-cymène.....	143
II - 8-3-3	Chémotype à β - pinène.....	143
II - 9	HUILES ESSENTIELLES DE E. TERETICORNIS DU BENIN : NOS TRAVAUX.....	146
II - 9-1	Teneur en Huile et composition chimique.....	146
II - 9-2	Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature.....	149
II - 9-3	Conclusion.....	149
II - 10	EUCALYPTUS TORELLIANA F. MUELL.....	151
II - 10-1	Aspect botanique.....	151
II - 10-2	Emplois.....	151
II - 10-3	Huile essentielle de E. torelliana : travaux des auteurs.....	153
II - 11	LES HUILES ESSENTIELLES DE E. TORELLIANA DU BENIN : NOS TRAVAUX	154

CHAPITRE III : MELALEUCA QUINQUENERVIA (CAV) S. T.		
	BLAKE	159
	INTRODUCTION.....	159
III - 1	GENERALITES	160
III - 1-1	Origine et botanique	160
III - 1-2	Anatomie et appareils sécréteurs	162
III - 1-3	Usages	164
III - 1-4	Composition chimique des huiles essentielles : travaux des auteurs	164
III - 1-5	Variation de la composition chimique et du rendement	166
III - 1-6	Autres espèces de Melaleuca	166
III - 2	HUILES ESSENTIELLES DE MELALEUCA QUINQUENERVIA	
	DU BENIN : NOS TRAVAUX :	168
III - 2-1	Teneur en huile	168
III - 2-1-1	Influence de la période de récolte sur le rendement :.....	168
III - 2-1-2	Influence du stockage sur le rendement.....	170
III - 2-2	Propriétés physico-chimiques ; des huiles essentielles de Niaouli	
	du Bénin	171
III - 2-3	Composition chimique de l'huile essentielle de Niaouli du Bénin	172
III - 2-3-1	Influence de la période de récolte sur la composition chimique de l'huile essentielle de Niaouli.....	172
III - 2-2-2	Influence du Stokage sur la composition chimique.....	176
III - 2-4	Analyses statistiques multivariées	179
III - 2-4-1	Matériels et Méthodes.....	179
III - 2-4-2	Résultats et Discussions.....	183
III - 2-4-2-1	Composition chimique et variation des pourcentages des composés identifiés.....	183
III - 2-4-2-2	Analyses statistiques multivariées.....	186
III - 2-4-2-3	Influence de la saison sur la composition chimique des trois chémotypes.....	191
III - 2-5	Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature	194
III - 2-6	Conclusion	196
CHAPITRE IV : CHENOPODIUM AMBROSIOIDES LINN		198
IV - 1	GENERALITES	198
IV - 1-1	Origines et Botaniques	198

IV - 1-2	Usages	201
IV - 1-3	Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de Chenopodium ambrosioides VAR. ENTHELMINTICUM	202
IV - 1-4	Composition chimique d'huile essentielle de Chenopodium ambrosioides : Travaux des auteurs	203
IV - 1-5	Activités antimicrobiennes, nematocide et insecticide de l'huile essentielle de Chenopodium ambrosioides	208
IV - 1-6	Autres propriétés de l'huile essentielle de Chenopodium ambrosioides	209
IV - 1-7	L'Ascaridol dans l'huile essentielle de Chenopodium ambrosioides	210
IV - 1-8	Conclusion	211
V - 2	LES HUILES ESSENTIELLES DE CHENOPODIUM AMBROSIODES DU BENIN : NOS TRAVAUX	212
IV - 2-1	Matériel et Méthodes	212
IV - 2-2	Résultats et discussions	212
IV - 2-3	Autoxydation de l'huile essentielle de Chenopodium ambrosioides du Bénin	217
IV - 2-4	Séparation et caractérisation du constituant majeur de l'huile essentielle de Chenopodium ambrosioides du Bénin	221
IV - 2-4-2	La Chromatographie sur couches minces (C.C.M.).....	221
IV - 2-4-2	Chromatographie sur colonne.....	222
IV - 2-4-3	Chromatographie en phase gazeuse.....	223
IV - 2-4-4	Identification par RMN 1- H et 13 - C, IR et SM.	225

DEUXIEME PARTIE

	PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES DE QUELQUES HUILES ESSENTIELLES D'ORIGINE BENINOISE	232
--	--	-----

	INTRODUCTION	233
--	---------------------------	-----

I	GENERALITES : TRAVAUX ANTERIEURS	234
---	---	-----

I - 1	QUELQUES DEFINITIONS	234
-------	-----------------------------------	-----

I - 2	TECHNIQUES D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	237
-------	--	-----

I - 2-1	Techniques d'étude en phase vapeur	237
---------	---	-----

I -2-1-1	Procédé au fil.....	237
I -2-1-2	Techniques des microatmosphères.....	238
I -2-2	Techniques de diffusion.	239
I -2-2-1	Techniques des diffusions en milieux solides.....	240
I -2-2-2	Techniques de diffusion en milieux liquides.....	241
I -2-3	Techniques de dispersion.	243
I -2-1-1	Techniques utilisant les solvants organiques.....	243
I -2-3-2	Techniques utilisant les émulsions.....	244
I -2-3-2-1	Techniques utilisant les émulsions en milieu solide.....	244
I -2-3-2-2	Techniques utilisant les émulsions en milieu liquide.....	246
I -2-3-3-2-1	Méthodes classiques ou macrométhodes.....	246
I -2-3-2-2-2	Microtechnique de dilution en série.....	249
I - 3	TECHNIQUES D'EVALUATION DE L'ACTIVITE FONGICIDE	259
I - 4	SOLUBILISATION DES HUILES ESSENTIELLES : NOTION DE TENSIO - ACTIFS	259
I - 4-1	Structure et classification des tensio-actifs	259
I - 4-2	Choix du meilleur tensio-actif.....	263
I - 5	CONCLUSION	263
II -	TRAVAUX PERSONNELS	265
II - 1	INTRODUCTION	265
II - 2	METHODES EXPERIMENTALES	266
II - 2-3	Matériel.....	266
II - 2-2	Préparation du milieu de culture.	266
II - 2-3	Mise en culture des germes.	268
II - 2-4	Comptage du bouillon de travail et entretien des souches.	268
II - 2-5	Préparation d'émulsions d'huiles essentielles et réalisation d'une recherche des CMI.	269
II -2-6	Comparaison de la microméthode utilisée avec les techniques de déterminaion des CMI récentes	272

II - 3	RESULTATS ET DISCUSSIONS	273
II -3-1	Les microorganismes testés	276
II -3-2	Corrélation entre activité antimicrobienne et composition chimique des huiles essentielles testées	278
II - 4	CONCLUSION	281

TROISIEME PARTIE :

	PARTIE EXPERIMENTALE	282
I	MATERIEL VEGETAL ET EXTRACTION	283
I - 1	MATERIEL VEGETAL	283
I - 1-1	Les plantes étudiées	283
I - 1-2	Echantillons et sites de récoltes	284
I - 1-3	Les récoltes	287
I - 2	EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES	288
II	ANALYSES ET SEPARATION	288
II - 1	LES ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES	288
II - 1-1	Les analyses en CPG.....	291
II - 1-2	Le couplage CPG/SM.....	292
II - 1-3	La RMN H-1 ET C-13.....	293
II - 1-4	Le spectre Infra - Rouge (IR).....	293
II - 2	SEPARATION ET ISOLEMENT	294
II - 2-1	Chromatographie sur couches minces (CCM).....	294
II - 2-2	Chromatographie sur colonne.....	294
	CONCLUSION GENERALE	296
	BIBLIOGRAPHIE	302

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le Bénin, pays de l'Afrique Occidentale, situé dans le Golfe de Guinée entre 6°30' et 12°30' latitude Nord, 1° et 3°40' longitude Est a une superficie de 112622 km² et plus de 5 millions d'habitants.

Il compte deux zones écologiques principales. Dans la partie septentrionale, nous avons un climat de type soudanien avec une grande saison pluvieuse (Mai à Octobre) et une grande saison sèche (Novembre à Avril). La pluviométrie y excède difficilement 1200 mm par an. Dans la partie méridionale, nous avons le climat tropical de type guinéen avec deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches. La grande saison pluvieuse (GSP) dure du 15 Mars au 15 Juillet tandis que la petite saison des pluies (PSP) s'étend du 15 Septembre au 15 Novembre. Elles alternent avec les deux saisons sèches : une grande saison sèche (GSS) de 15 Novembre au 15 Mars et une petite saison sèche (PSS) du 15 Juillet au 15 Septembre. La pluviométrie dépasse souvent 1500 mm par an.

Dans son ensemble, La zone tropicale est caractérisée par une forêt claire et sèche, qui se dégrade progressivement pour faire place à la savane à mesure que l'on se dirige vers le Nord. La zone septentrionale quant à elle est caractérisée par une végétation de savane arborée, de forêt galerie.

Les sols halomorphes, ferralitiques, les vertisols et les sols hydromorphes caractérisent la région méridionale. La région septentrionale est caractérisée par des sols ferrugineux minéraux, caillouteux et hydromorphes.

La population active est constituée à plus de 80% de paysans qui pratiquent une agriculture essentiellement de subsistance et une culture de produits de rentes : le coton et le palmier à huile.

La dégradation continue de la situation économique dans nos pays, accentuée par la dévaluation du franc CFA et la baisse des prix des produits agricoles, exigent une diversification de la production afin de remédier à cette baisse de revenus de nos populations les plus défavorisées.

Il est donc nécessaire de trouver pour ces populations des alternances nouvelles issues de leur milieu naturel. Dans ce contexte, la valorisation des ressources végétales locales, en particulier les plantes aromatiques, pourrait constituer l'élément d'un nouvel essor économique.

En effet, les plantes aromatiques, les épices et les plantes médicinales, considérées par la FAO comme des cultures d'exportation secondaire, présentent de grands avantages pour les paysans pratiquant une agriculture de subsistance. Les plantes à parfums, aromatiques et médicinales constituent alors une richesse naturelle pouvant jouer un rôle important dans le développement socioéconomique de certaines régions économiquement défavorisées comme le Bénin. On assiste, sur les marchés mondiaux, à une augmentation de la demande de produits naturels d'origine végétale issus de plantes aromatiques de régions intertropicales. Certains pays du Tiers Monde comme le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Bolivie et le Brésil ont connu certains succès dans ce domaine. Des recherches pourraient favoriser la diversification des cultures et susciter la création de petites unités de transformation génératrices d'emplois et de revenus.

Le Bénin dispose d'une flore riche et variée. Il est possible d'entreprendre sa mise en valeur avec des moyens relativement limités et une technologie simple, utilisable par les populations paysannes. L'accès des paysans à cette technologie nouvelle amorcerait de petites industries nationales de parfumeries, de savonneries de cosmétiques...etc. Ils distilleront des huiles essentielles (H E) de meilleures qualités pour la commercialisation. Les plantes aromatiques constituent ainsi pour les paysans une source de revenus non négligeables et la création locale de valeurs ajoutées empêchant ainsi l'exode rural.

Pour y arriver, il est nécessaire de connaître cette richesse et les conditions optimales de sa mise en valeur. C'est cette tâche que nous voulons accomplir en choisissant comme thème de recherche répondant aux préoccupations nationales : l'étude et la valorisation des huiles essentielles de Myrtacées et de Chenopodiacées du Bénin.

Grande famille botanique, les Myrtacées sont représentés au Bénin par plusieurs espèces d'*Eucalyptus* et de *Melaleuca*.

Il existe au Bénin plusieurs plantations d'*Eucalyptus* (comportant les espèces *camaldulensis*, *citriodora*, *globulus*, *tereticornis* et *torelliana*) dans le projet dit "plantation bois de feu" occupées principalement par l'espèce *camaldulensis* dont la plus importante couvre une superficie de plus de 16034 ha.

Pour le *Melaleuca*, il existe une vieille plantation qui, constituée exclusivement de l'espèce *quinquenervia*, couvrait plus de 20 ha. Ces arbres qui font actuellement l'objet de

destruction massive sont essentiellement utilisés comme bois de chauffe et aucune autre utilisation n'est faite de ces plantes à part la pharmacopée qui les connaît sous le nom "d'arbre contre la toux".

Chenopodium ambrosioides est le Chénopodiacée qui a fait l'objet de notre étude. Au Bénin, on le rencontre dans les concessions et dans les jardins.

Dans un travail antérieur, nous avons cherché à optimiser les paramètres qualités d'extraction (séchage, stockage, durée de distillation) des espèces *camaldulensis* et *citriodora* afin d'apprécier leur influence sur les rendements en huiles essentielles et sur leur composition chimique et obtenir ainsi le meilleur compromis possible qualité / rentabilité.

Dans le présent travail, nous dressons un inventaire des espèces étudiées et les sites les plus importants pour déterminer leur homogénéité et sélectionner les plus intéressants et les plus performants. Nous avons cherché également à optimiser les conditions d'extraction de *Melaleuca quinquenervia* et à tester les propriétés pharmacodynamiques de certaines huiles essentielles.

Pour ce fait, le travail compte trois grandes parties.

La première partie, intitulée: Étude des huiles essentielles d'origine béninoise, est divisée en cinq chapitres.

Le premier chapitre traite des généralités sur les huiles essentielles.

Les huiles essentielles d'*Eucalyptus* d'origine béninoise font l'objet du second chapitre. Dans le troisième chapitre, *Melaleuca quinquenervia* a été étudié.

Le quatrième chapitre de cette première partie traite du *Chenopodium ambrosioides* beaucoup utilisé dans le milieu rural béninois.

Des activités antimicrobiennes de sept échantillons d'huile essentielle testées sur cinq microorganismes ont fait l'objet de la deuxième partie.

La troisième partie est consacrée à l'expérimentation. Elle fait état, d'une part, du matériel végétal et de l'extraction et d'autre part, de l'analyse chimique et spectrale

Notons que pour chaque espèce et pour chaque thème étudiés, tout en essayant de classer rationnellement les différents types rencontrés dans la littérature, une analyse des travaux antérieurs est décrite.

Enfin, une conclusion générale, comprenant quelques suggestions pour des recherches futures suivies d'une liste de références bibliographiques clôturent le travail.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DES HUILES

ESSENTIELLES D'ORIGINE

BÉNINOISE

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES

I-1- DÉFINITION DE L'HUILE ESSENTIELLE

Il est bien difficile de donner une définition standard.

Selon P. DUQUENOIS, (1) *"La notion d'huile essentielle peut varier avec le point de vue auquel se placent des personnes de formations professionnelles aussi dissemblables que des botanistes, des physico-chimistes, des industriels, des parfumeurs ou des pharmacologues"*.

Des organismes de Normalisation : l'A. F. NOR. (Association Française de Normalisation) et l'I.S.O. (International Standard Organisation) ont donné une définition qui s'applique au mode d'obtention des huiles essentielles (2) :

Ce sont des mélanges huileux, généralement odorants et volatils obtenus soit par entraînement à la vapeur d'eau de végétaux ou de parties de ceux-ci, soit par expression du péricarpe frais de certains citrus.

Pour G. LEGRAND (3), si les définitions des huiles essentielles sont nombreuses, la terminologie qui les désigne ne l'est pas moins.

On rencontre les termes : essence de plante, essence aromatique, huile essentielle, oléat, oléule (4).

En un moment donné, les huiles essentielles ont été appelées « esprits » puis "essences" (codex 1965). La dénomination "essence" a été abandonnée pour un souci de normalisation ; actuellement seul le terme huile essentielle est utilisé (codex 1972)(4).

En somme, retenons que l'huile essentielle est l'ensemble des composés volatils, odorants, contenus dans les végétaux et extraits selon des techniques appropriées.

Les huiles essentielles se retrouvent dans plusieurs organes de la plante et dans divers appareils sécréteurs.

I-2- LOCALISATION DES HUILES ESSENTIELLES DANS LES PLANTES

Les huiles essentielles se rencontrent presque exclusivement dans l'embranchement des spermatophytes. Tous les organes peuvent en renfermer : les sommités fleuries, les fruits, les graines, les feuilles, les tiges, les racines, les rhizomes, les résines, les bois et les écorces.

L'huile essentielle est contenue dans divers types d'appareils producteurs, variables selon la partie de la plante considérée.

Pour P. MAIHEBIAU (5) et G. DEYSSON (6) on distingue : les cellules sécrétrices, les poches sécrétrices et les canaux sécréteurs.

I-2-1- LES CELLULES SÉCRÉTRICES

Dans ces cellules on rencontre :

I-2-1-1- LES CELLULES ÉPIDERMIQUES

Certaines d'entre elles sont productrices d'huiles essentielles ou de résines. Ces cellules diffèrent des autres par leur taille plus petite et plus fine. Leur paroi externe peut être dépourvue de cuticules ou bien ces cellules font saillie en forme de papilles.

I-2-1-2- LES POILS SÉCRÉTEURS

Ils sont situés à la périphérie de divers organes tels que les calices, les feuilles et les tiges. Ce sont des émergences de l'épiderme dont les cellules terminales sécrètent essences ou résines. Leurs formes sont variables et souvent caractéristiques d'une famille.

I-2-1-3- LES CELLULES SÉCRÉTRICES

Elles se localisent au sein des tissus végétaux comme les tiges, les écorces, les racines, les graines et les feuilles, plus précisément au niveau des tissus internes : parenchyme cortical, phloème, xylème. Ces cellules se distinguent des cellules voisines par le contenu, une taille plus grande et une paroi plus épaisse. Leur présence constante dans certains tissus végétaux est souvent caractéristique d'une famille.

I-2-2- LES POCHE SÉCRÉTRICES

Modifiées en poches sécrétrices, certaines cellules se présentent comme :

I-2-2-1- LES POCHE SCHIZOGÈNES

Elles proviennent d'une cellule parenchymateuse (juste sous l'épiderme foliaire) qui se divise en quatre cellules par deux cloisonnements successifs perpendiculaires l'un à l'autre. Le méat central, limité par ces cellules néoformées, constituera la poche. Il s'agrandit tandis que les quatre cellules qui le bordent se divisent par des cloisons radiales, le méat devient ainsi une poche limitée par une rangée de cellules "de bordure" qui sécrètent l'essence. On en rencontre dans les Myrtacées.

I-2-2-2- LA POCHE LYSIGÈNE

Plusieurs cellules groupées forment une poche par lyse de leur paroi.

I-2-2-3- LA POCHE SCHIZOLYSIGÈNE

Cette poche est formée de l'association des caractéristiques des poches schizogènes et lysigènes. Le début de sa formation est identique au mode de formation des poches schizogènes. Mais lorsque la poche schizogène est ainsi formée, les cellules de bordure se divisent par cloisons tangentielles, le méat collecteur est bordé par plusieurs assises de cellules superposées. Les plus internes de ces cellules se lysent, ce qui explique la présence de débris de paroi mêlés aux produits sécrétés.

I-2-3- LES CANNAUX SÉCRÉTEURS

Ce sont des poches sécrétrices très allongées qui se forment par le mode schizogène, on les appelle encore des bandelettes sécrétrices.

En coupe transversale, le canal apparaît comme une poche de faible diamètre.

En coupe longitudinale, on reconnaît deux files de cellules de bordures (ou cellules bordantes) limitant la cavité centrale.

I-2-4- CONSÉQUENCES

De tout ce qui précède, il apparaît alors nécessaire et important, du point de vue pratique, de connaître la nature et la localisation des éléments producteurs d'huiles essentielles car elles déterminent les conditions et les méthodes d'extraction.

Ainsi, les méthodes varient suivant la localisation et la nature des cellules ou poches qui les renferment :

On procède par entraînement à la vapeur d'eau, si elles sont localisées dans les éléments superficiels facilement accessibles.

On les extrait par expression, si elles sont contenues dans les poches sécrétrices superficielles comme les essences de fruits de citrus.

I-3- FONCTION DES HUILES ESSENTIELLES DANS LA PLANTE

Le rôle des huiles essentielles dans la plante est mal connu, il pourrait s'agir de produits de déchets du métabolisme. Certains auteurs comme P. MAIHEBIAU (5) et M. PARIS (7) pensent qu'elles auraient un rôle :

- attractif, vis à vis des insectes afin de favoriser la pollinisation,
- de barrière contre l'évaporation,
- de protecteur par action antiseptique vis à vis de certains micro-organismes comme les champignons.

I-4- MÉTHODES D'EXTRACTION

Plusieurs méthodes sont utilisées dans l'extraction des huiles essentielles en fonction du matériel à traiter. Chaque méthode peut avoir diverses variantes.

I-4-1- L'HYDRODISTILLATION

Méthode la plus ancienne et la plus répandue, simple dans son principe, L'hydrodistillation est efficace et ne nécessite pas d'appareillage coûteux, ni de produits chimiques dangereux à manipuler.

L'hydrodistillation connaît trois techniques qui lui confèrent plusieurs variantes :

- la distillation à la vapeur (le végétal en contact direct avec l'eau bouillante)
- la distillation à la vapeur saturée (le végétal en contact avec la vapeur d'eau saturée, mais pas avec l'eau bouillante qui est en dessous dans l'alambic)
- la distillation à la vapeur directe saturée ou surchauffée (entraînement à la vapeur), sans eau dans le fond de l'alambic, la vapeur étant introduite au-dessous de la charge végétale (hydrodistillation) ou en dessus (hydrodiffusion). Cette troisième variante est la plus utilisée actuellement, car elle évite le contact prolongé d'un végétal avec l'eau en ébullition et la formation de certains artéfacts.

I-4-2- EXTRACTION PAR EXPRESSION À FROID

Elle consiste à presser le matériel végétal à froid manuellement ou à l'aide d'une machine, ce qui permet d'obtenir du jus de fruits à partir de la pulpe et l'huile essentielle à partir des zestes. Ce procédé est utilisé pour obtenir les huiles essentielles d'agrumes (citron, orange, etc.) qui, facilement peroxydables, ne supporteraient pas une extraction à chaud. Il permet l'obtention de substances sans modification chimique.

C'est une technique simple, pratique, peu coûteuse mais d'emploi limité.

Parmi les différents procédés utilisés pour extraire les huiles essentielles, la pharmacopée n'en retient que deux : l'entraînement à la vapeur d'eau et l'expression qui permettent de conserver toutes les propriétés physiques, chimiques et organoleptiques des huiles essentielles (8).

D'autres techniques existent mais ne conduisent pas aux huiles essentielles ; nous avons :

I-4-3- EXTRACTION PAR SOLVANT VOLATIL

C'est un procédé qui consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition (pentane, dichlorométhane, hexane,...) qui sera ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite. On n'obtient pas une huile essentielle mais une **concrète**, mélange odorant de consistance pâteuse ou solide due à la présence de cires extraites par le solvant.

Après extraction à froid à l'alcool (95°), et filtration des cires précipitées, la concrète devient l'**absolue**.

Cette méthode, plus élaborée que l'hydrodistillation, est plus coûteuse mais moins "brutal". En effet, la température de travail est moins élevée et les réactions d'hydrolyse sont évitées, l'extrait volatil obtenu est en général très représentatif des caractéristiques de la plante.

I-4-4- EXTRACTION PAR INCISION OU EXSUDATION

Le végétal est incisé et le liquide s'écoulant de l'incision est recueilli. Cet extrait obtenu est, en général, soumis à un entraînement à la vapeur pour en extraire l'huile essentielle.

I-4-5- EXTRACTION PAR ENFLEURAGE

Ce procédé est utilisé dans le cas d'organes végétaux fragiles comme les fleurs aromatiques. Ces fleurs sont mises au contact de corps gras (axonges) qui se saturent d'huiles essentielles. Le corps gras est ensuite épuisé par un solvant puis évaporé sous vide. Cette méthode délicate et coûteuse est remplacée par l'extraction aux solvants.

On a récemment mis au point de nouvelles méthodes d'extraction plus élaborées de produits naturels conduisant en général à des extraits de ``meilleure qualité``. On peut citer :

I-4-6- EXTRACTION ASSISTÉE PAR MICRO- ONDES (9)

Le procédé assisté par micro-ondes est utilisé pour l'extraction de produits naturels en présence de solvant. L'obtention d'huile essentielle ou d'extrait par micro-ondes est effectuée en soumettant la matière végétale à une irradiation par micro-ondes en l'absence ou en présence de solvant aqueux ou organique.

Ce procédé présente l'avantage d'être bien plus rapide que tous les autres connus à ce jour.

I-4-7- EXTRACTION PAR FLUIDES SUPER CRITIQUES

L'extraction par fluides supercritiques connaît depuis quelques années un grand intérêt compte tenu de son potentiel à remplacer les méthodes d'extraction conventionnelles (exemple : soxhlet, ultrasons...). C'est une méthode d'extraction utilisant comme solvant d'extraction un fluide porté à l'état supercritique et ceci par un contrôle adéquat de la température et de la pression. La région supercritique sur un diagramme de phase est donc définie au-delà d'un point appelé point critique, auquel correspond une température et une pression critiques (T_c et P_c).

Le fluide le plus fréquemment utilisé en extraction supercritique est le dioxyde de carbone car :

- il présente une facilité de manipulation compte tenu de ses paramètres critiques ($T_c = 31\text{ °C}$ et $P_c = 73,8\text{ bars}$).
- il est non toxique, ininflammable et sans odeur.
- il est bon marché et disponible avec une très grande pureté.

La pression et la température imposées au fluide supercritique vont générer une certaine masse volumique caractéristique du pouvoir solvant du fluide.

L'extraction par fluide supercritique est une méthode très rapide de préparation d'échantillon. Elle permet, par simple changement des conditions de pression et de température, d'optimiser l'obtention d'extraits de grande qualité (10).

I-5- MÉTHODES D'ANALYSE

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes, constituées de plusieurs dizaines, voire d'une centaine de composés, principalement des mono et des sesquiterpènes. Parfois on rencontre également des composés aliphatiques ou possédant un noyau benzénique.

L'identification et la quantification des différents constituants d'une huile essentielle sont des opérations extrêmement importantes, tant d'un point de vue économique qu'académique, et délicates d'un point de vue technique.

Les analyses des huiles essentielles peuvent être regroupées en deux grands types :

I-5-1- MÉTHODES D'ANALYSES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Ces méthodes permettent de définir les caractéristiques physiques et chimiques propres à chaque huile essentielle. Il s'agit de la densité, du pouvoir rotatoire, de l'indice de réfraction, de la solubilité dans l'éthanol et de l'indice d'acide, d'ester et de carbonyle (11).

De nos jours, ces indices physico-chimiques commencent à être abandonnés au profit des caractéristiques chromatographiques beaucoup plus précises. Même sur le marché des huiles essentielles, le profil chromatographique est devenu une notion nouvelle qui permet d'obtenir une véritable carte d'identité de l'huile essentielle pour une assurance de sa qualité.

I-5-2- MÉTHODES D'ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES

Elles ont pour but d'identifier la structure et la qualité des différents constituants de l'huile essentielle afin d'en connaître la composition chimique. Dans ce type d'analyse, on distingue les techniques de chromatographie en phase gazeuse (CPG), de couplage de la CPG à la Spectrométrie de Masse (CPG / SM), du couplage du CGP à la spectrométrie Infra Rouge à Transformée de Fourier (CPG / IRTF), de la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN-¹³C), de Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC), et de l'Infra-Rouge (IR).

I-5-2-1- LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)

La CPG étant la méthode d'analyse utilisée dans ce travail pour déterminer la composition chimique des huiles essentielles, il nous a paru important de rappeler quelques notions concernant cette technique analytique.

La CPG est une méthode qui permet de séparer les constituants de mélanges complexes vaporisés par chauffage par une suite continue d'équilibres s'établissant entre une phase stationnaire qui peut être liquide (chromatographie gaz-liquide) ou solide (chromatographie gaz-solide) (12).

Les différents constituants d'un mélange, préalablement vaporisés au niveau de l'injecteur, sont élués dans la colonne par un gaz vecteur à des vitesses différentes selon leur solubilité dans la phase stationnaire et leur volatilité. L'enregistreur signale une succession de pics caractérisés chacun par un temps de rétention et une aire, et correspondant aux différents composés présents dans l'huile essentielle. La CPG permet à la fois une analyse qualitative et quantitative.

***- Identification par les indices de rétention**

Pour identifier chaque pic, donc chaque composé, il faut calculer l'indice de rétention correspondant. Or, pour un même composé, l'indice de rétention qui est une grandeur caractéristique du composé est différent suivant le type de colonne. En effet, dans une colonne polaire, les composés sont retenus plus longtemps sur la phase stationnaire, ils auront donc un temps de rétention beaucoup plus grand ; tandis que dans une colonne apolaire, l'éluion est approximativement fonction de la température d'ébullition du composé.

Les renseignements sur les deux colonnes sont complémentaires parce qu'il peut arriver que sur une même colonne deux composés différents aient le même indice de rétention.

Les indices de rétention des différents constituants sont calculés après coinjection de l'huile essentielle avec un mélange d'alcane linéaires sur les deux colonnes.

Dans le cas d'une analyse en programmation de température, l'indice de rétention linéaire ou indice de Van Den Doole (dérivé de l'indice de Kovats défini pour une analyse réalisée dans les conditions isothermes) est donné par la formule :

$$I.K = 100n + \frac{TR(X)-TR(C_n)}{TR(C_{n+1})-TR(C_n)} \times 100$$

TR(X) est le temps de rétention du composé inconnu,

TR(C_n) est le temps de rétention de l'hydrocarbure à n atomes de carbone,

TR(C_{n+1}) est le temps de rétention de l'hydrocarbure à n + 1 atomes de carbone,

X est le composé inconnu étant élué entre C_n et C_{n+1}.

Les indices expérimentaux sont comparés à ceux de la littérature : ouvrages de JENNINGS (13) et ADAMS (14), monographies d'huiles essentielles diverses (15-22) ainsi qu'à ceux de la banque de données du laboratoire.

L'analyse chromatographique donne d'excellents résultats au niveau de l'individualisation des composés dans un mélange, mais certaines difficultés peuvent apparaître en ce qui concerne l'identification. C'est pourquoi la CPG est généralement associée à une autre technique, telle que la spectrométrie de masse et la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier. De tels couplages permettent d'individualiser chacun des constituants et de comparer leurs données spectrales avec celles de composés de référence. Il est par conséquent nécessaire de pouvoir disposer d'une banque de spectres riche et adaptée.

Ces couplages donnent d'excellents résultats, même les composés en très faibles proportions peuvent être détectés et identifiés.

I-5-2-2- IDENTIFICATION PAR COUPLAGE CPG / SM

La spectrométrie de masse (SM) permet de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces présentes dans l'échantillon. Elle est devenue progressivement un moyen d'investigation irremplaçable des composés organiques.

Elle est aussi utilisée pour l'étude des mélanges moléculaires, à condition de placer en amont du spectromètre de masse un chromatographe pour séparer les composés. Dans ce cas, le couplage en ligne CPG / SM constitue l'une des meilleures méthodes d'analyse des mélanges au départ d'infimes quantités.

Les spectres de masse sont obtenus pour chaque composé, dépouillés et comparés aux données de la littérature (14,16,18,19).

I-5-2-3- LE COUPLAGE CPG / IRFT

La spectrométrie infrarouge permet de provoquer et d'observer des transitions entre différents niveaux de vibration dans les molécules. Elle permet en conséquence de mettre en évidence la présence ou l'absence des groupements fonctionnels.

Si le principe d'identification reste le même, à savoir que le spectre de chaque composé est comparé aux spectres d'une banque de données, les informations obtenues par IRFT sont de nature différente.

L'apport de l'IRFT est surtout manifesté quand les molécules sont fonctionnalisées. Ainsi les quatre menthols ou les quatre farnésols isomères peuvent être identifiés sur la base de leurs spectres IR.

Toutefois le couplage CPG / IRFT, appliqué à la séparation de composés volatils d'un mélange comme l'huile essentielle, a ses limites avec le risque couru pour les composés thermosensibles et les réarrangements thermiques possibles. Pour remédier à cet inconvénient, on assiste de plus en plus à l'utilisation du couplage de la chromatographie en phase dioxyde de carbone supercritique (CPS) avec l'IRFT pour l'analyse des composés thermosensibles ou peu volatils comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et certains hydrocarbures sesquiterpéniques.

L'efficacité de la complémentarité des deux méthodes de couplage décrites plus haut, conduira certainement dans les années à venir à une technique conjointe et en ligne des deux techniques (CPG / SM / IRFT), mais elle pourra se heurter pendant longtemps encore au coût élevé de l'appareillage.

I-5-2-4- LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DU CARBONE-13

La RMN est une technique d'analyse qui donne des informations extrêmement précieuses quant à la structure des molécules, mais la quantité de produit nécessaire pour une analyse est importante, comparée à celle qui est nécessaire pour les méthodes précédentes.

Cette technique consiste à provoquer la transition de certains noyaux ayant un spin non nul, entre deux niveaux énergétiques sur lesquels ces noyaux sont répartis. Les informations obtenues sont multiples et permettent d'identifier le nombre de noyaux magnétiquement non équivalents, leur proportion relative, leur environnement magnétique et parfois même le nombre et la nature des noyaux environnants. La RMN est très sensible aux moindres modifications structurales. Si la RMN est une technique généralement utilisée pour analyser un composé isolé et purifié, aujourd'hui elle permet d'analyser un mélange de composés en l'occurrence les huiles essentielles.

La méthode d'analyse d'une huile essentielle par RMN du carbone-13 est basée sur l'identification, dans le spectre du mélange, des différentes raies de résonance d'un composé en les comparant avec celles de spectres des produits purs contenus dans une banque de données. Pour identifier avec certitude un composé présent dans une huile essentielle on prend en compte :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque composé,
- le nombre de superpositions de pics,
- les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre de l'huile essentielle par rapport aux valeurs de référence ($\Delta\delta < 0,05$ ppm).

Les informations données par le spectre unique du mélange sont traitées par un logiciel spécial d'aide à l'identification.

Cette méthode d'analyse des huiles essentielles permet d'identifier les constituants présents jusqu'à une teneur de 0,5-1,0 %.

Complémentaire aux précédentes, la technique de RMN du carbone-13, appliquée à l'analyse des huiles essentielles, est particulièrement bien adaptée à l'étude du polymorphisme chimique, à l'identification des stéréoisomères ou des composés difficilement séparables par CPG et/ou ayant des spectres de masse semblables.

Si tous les échantillons d'huiles essentielles étudiés au cours de notre travail ont été analysés par les méthodes de CPG et de couplage CPG/SM, certains ont été également soumis à l'analyse par RMN du carbone-13.

I-5-2- IDENTIFICATION D'UN CONSTITUANT PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-SOLIDE SUR GEL

Lorsque les techniques précédentes ne permettent pas l'identification d'un constituant d'une huile essentielle, on peut être amené à l'isoler par chromatographie liquide-solide puis à le soumettre à d'autres techniques d'analyses spectroscopiques telles que la RMN et l'infrarouge.

I-6- COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles contiennent des constituants qui peuvent avoir des propriétés physico-chimiques et des structures très différentes : il s'agit des composés terpéniques, aromatiques, aliphatiques, etc...

I-6-1- LES COMPOSÉS TERPÉNIQUES

La formation des carbures terpéniques obéit à une règle structurale isoprénique (règle de Ruzicha) bien que l'isoprène n'ait pu être isolé à l'état libre. Le tableau 1 donne une classification des terpènes suivant leur nombre d'unités isopréniques.



Unité isoprénique C_5H_8

Tableau 1 :
Classification des terpènes

Unité isoprène	Atomes de carbone	Classification
1	5	Hémiterpènes
2	10	Monoterpènes
3	15	Sesquiterpènes
4	20	Diterpènes
5	25	Sesterpènes
6	30	Triterpènes
8	40	Tétraterpènes
<8	<40	Polyterpènes

Les terpènes peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques. Le tableau 2 présente quelques molécules terpéniques de différentes structures.

Les dérivés fonctionnalisés des terpènes sont désignés sous le terme de "terpénoïdes", les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes oxygénés constituent souvent les principes odoriférants des huiles essentielles (23) et sont utilisés comme produits de base en parfumerie et en aromatisation alimentaire. On peut citer :

- les alcools, les aldéhydes, les cétones et les esters (ils sont acycliques, monocycliques, et bicycliques)
- les éthers, les peroxydes
- les phénols.

Le tableau 3 donne quelques monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes oxygénés qui représentent en général les constituants principaux des huiles essentielles et qui permettent leur classification (24).

Tableau 2 : Molécules terpéniques

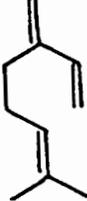
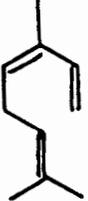
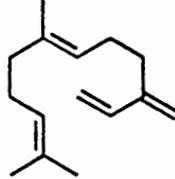
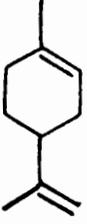
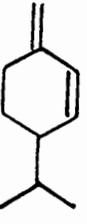
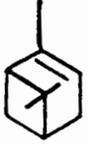
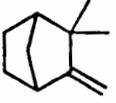
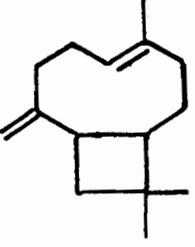
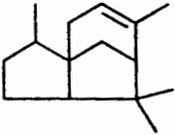
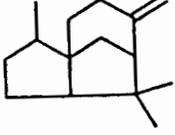
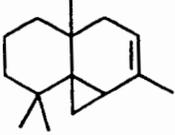
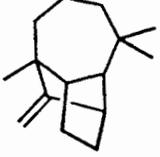
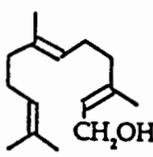
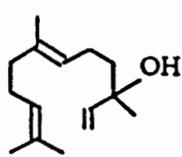
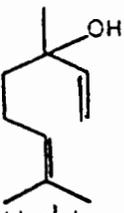
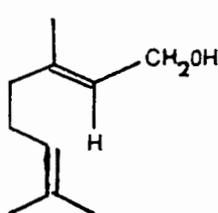
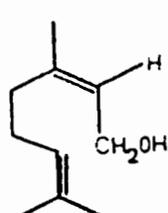
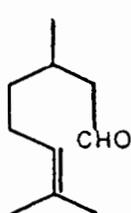
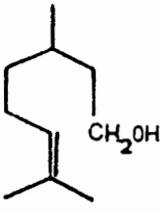
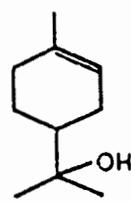
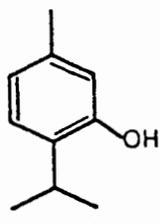
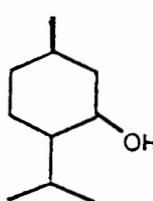
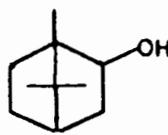
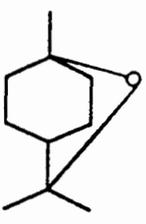
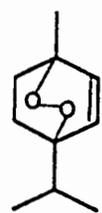
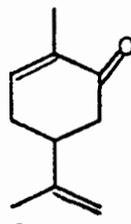
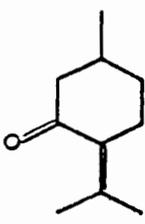
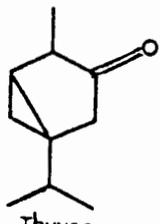
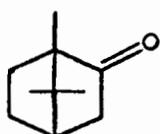
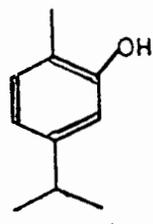
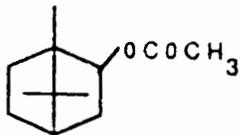
<u>TERPENES Acycliques</u>				
				
MYRCENE	OCIMENE	CITRONELLENE	farnésène	
<u>TERPENES Monocycliques</u>				
				
LIMONENE	α -TERPINENE	p-CYMENE	TERPINOLENE	β -PHELLANDRENE
<u>TERPENES Bicycliques</u>				
				
α -PINENE	β -PINENE	camphène	Δ 3-CARENE	β -CARYOPHYLLENE
<u>TERPENES Tricycliques</u>				
				
α -cédrene	β -cédrene	thujopsène	longifolène	

Tableau 3 : Monoterpénoides oxygénés

<u>Acycliques</u>			
	trans-trans-farnésol		
	trans-nérolidol		
	Linalol (Lavandes, Verveine, Bergamote Coriandre)		Geraniol (Rose, Géranium roset)
	Nerol (Oranger, Rose)		Citronellal (Mélisse, Citron, , Verveine)
	Citronellool (Mélisse)		
<u>Cycliques</u>			
	α-Terpinéol (Cajepout, Cumin)		
	Thymol (Thym, Serpolet, Origan, Sarriette)		
	Menthol (Menthe poivrée)		
	bornéol (aspic, romarin, muscade)		
	1,8 cinéole (eucalyptus, Niouli, lavandin, romarin)		
	Ascaridol (chenopode vermifuge)		
	Carvone (Menthe douce, Carvi)		
	Pulégone (menthe pouliot)		
	Thuyone (Absinthe, sauge, , thuya)		
	Camphre (camphrier, lavandin, romarin)		
	Carvacrol (Thym, Serpolet, , Origan, Sarriette)		
	Acétate de bornyle (sapin)		

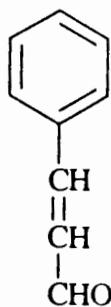
I-6-2- LES COMPOSÉS AROMATIQUES

On peut avoir des composés dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) qui sont beaucoup moins fréquents que les précédents. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C_6-C_1 .

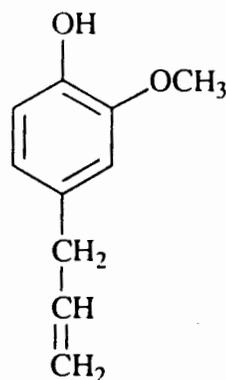
Généralement, ces composés sont responsables des caractères organoleptiques traditionnels des huiles essentielles.

Figure 1 :

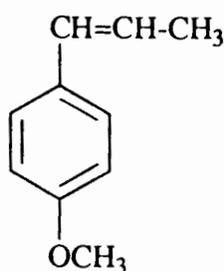
Exemple de composés aromatiques dérivés du phénylpropane.



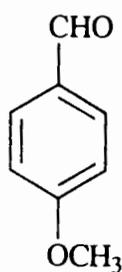
Aldéhyde cinnamique



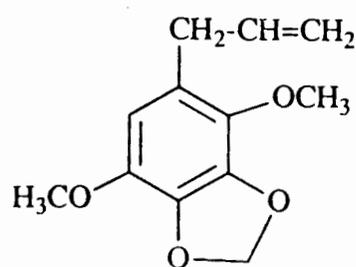
Eugénol



Anéthole



Aldéhyde anisique



Safrole

I-6-3- LES COMPOSÉS D'ORIGINES DIVERSES

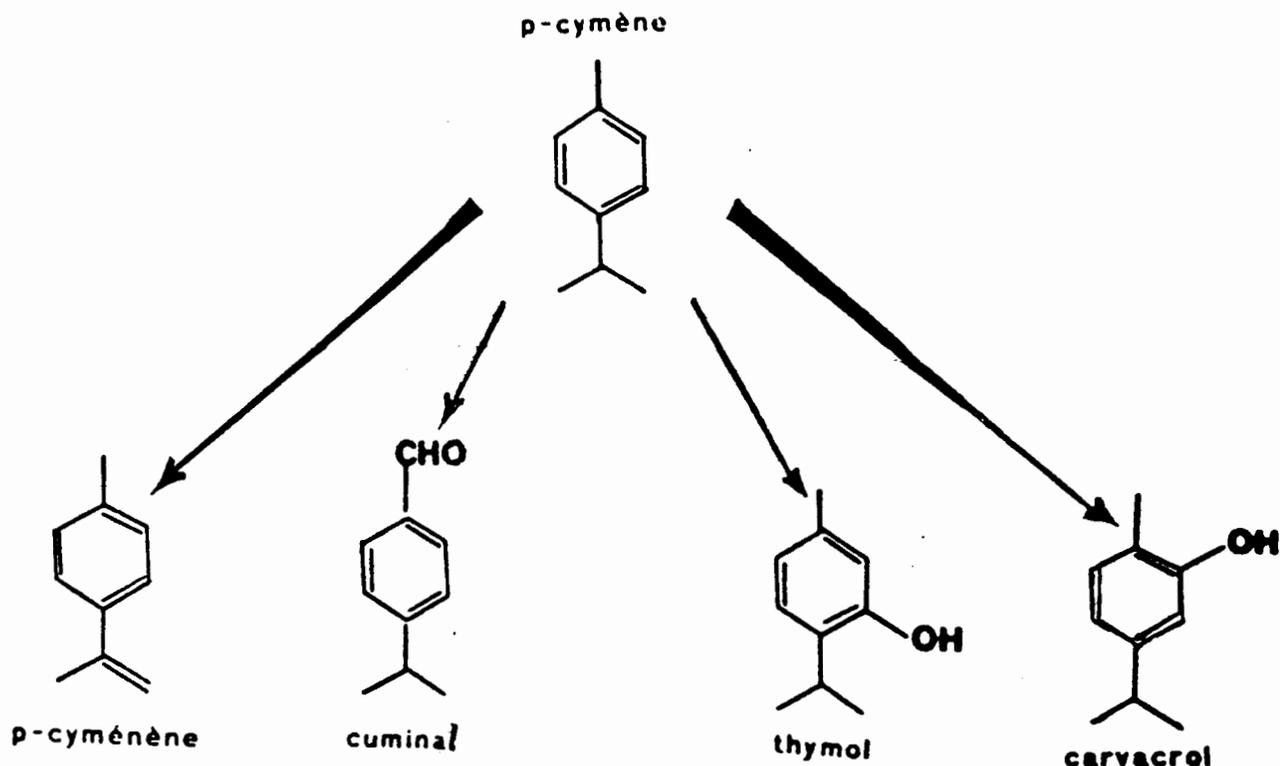
Compte tenu de leur mode de préparation, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation : carbures (linéaires et ramifiés, saturés ou non, rarement spécifiques), acides (C_3 à C_{10}), alcools (exemple : cis-hex-3-èn-1-ol de *Robinia pseudacacia*, 1-octèn-3-ol de l'huile essentielle de lavande, etc...), aldéhydes (octanal, décanal des citrus, trans-2-hexénal, etc...) esters acycliques (principalement dans les fruits), lactones (γ -déalactone...).

Dans les concrètes, il n'est pas rare de trouver des produits de masse moléculaire plus importante, non entraînés à la vapeur d'eau : homologues des phénylpropanes, diterpènes, coumarines (mais certaines d'entre elles sont également entraînés à la vapeur d'eau).

On a constaté une certaine réactivité de ces molécules. Elles se transforment plus ou moins rapidement dans le temps, ce qui présente un inconvénient pour la stabilité de l'huile essentielle. Exemple : figure 2.

Figure 2:

Oxydation du paracymène.



I-7- STABILITÉ DES HUILES ESSENTIELLES

Il faut différencier les huiles essentielles des huiles fixes et des graisses contenues dans les végétaux. Les huiles essentielles sont volatiles et généralement très sensibles au phénomène d'oxydation ; elles sont souvent associées à d'autres substances, telles que les gommes et les résines et tendent même à se résinifier par exposition à l'air. Ces phénomènes d'altération modifient fortement la composition chimique des huiles essentielles mais améliorent l'activité antimicrobienne de certaines d'entre elles.

Les procédés conduisant à l'altération naturelle sont en général activés par la chaleur et l'oxygène de l'air et sont catalysés par la lumière et la présence de certains métaux. Ils conduisent à une multitude de produits oxygénés souvent très différents.

Ces processus sont d'ailleurs utilisés pour la valorisation des huiles essentielles.

I-8- VALORISATION DES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles, surtout celles qui sont riches en composés terpéniques sont particulièrement défavorisées sur le marché international. Plusieurs solutions ont été proposées pour pallier cette situation :

- extraction des molécules optiquement pures
- fonctionnalisation des terpènes par bioconversion
- autoxydation et photo-oxydation des terpènes

I-8-1- PRÉPARATION DES PRODUITS OPTIQUEMENT PURES A PARTIR DES HUILES ESSENTIELLES

Les produits optiquement purs sont classés parmi les substances biologiquement actives et sont les plus recherchés pour cette raison. Par exemple, les (+) et (-) limonènes présentent en fonction de leur stéréochimie des odeurs orangée ou citronnée (25). Dans le même ordre d'idée le (-) menthol possède seul les propriétés rafraîchissantes utilisées dans les cigarettes, les produits cosmétiques, les chewingums, les dentifrices et les médicaments.

Les huiles essentielles constituent une véritable source de ces molécules. Deux techniques ont été développées pour leur obtention :

I-8-1-1- DÉCOLORATION ET FRACTIONNEMENT DE L'HUILE ESSENTIELLE

Les huiles essentielles utilisées pour la préparation du d-bornéol et du l-camphre sont très colorées. Leur décoloration est réalisée par entraînement à la vapeur.

I-8-1-2- CRISTALLISATION

L'huile essentielle décolorée est ensuite placée dans une chambre froide (-18°C) afin de faire cristalliser le bornéol ou le camphre, qui ensuite, sont séparés par filtration sous vide.

Les huiles essentielles de thym (*Thymus salarioides*) et d'armoise blanche (*Artemisia herba alba Asso*) sont ainsi séparées respectivement du d-bornéol l-camphre avec une pureté chromatographique de 99% (26).

I-8-2- FONCTIONNALISATION DES TERPÈNES PAR BIOCONVERSION

Les terpènes et les terpénoïdes, composés dérivés des terpènes ont fait l'objet de nombreux travaux de bioconversion par des souches variées. De nombreuses substances monoterpéniques conduisent à des produits fonctionnalisés, notamment des alcools, des diols, des époxydes, etc... Ce mode de transformation a l'avantage de donner lieu à l'attaque de positions non activées conduisant à un degré élevé de sélectivité.

Les bioconversions peuvent permettre d'obtenir des molécules aromatisantes et parfumantes de stéréochimie bien déterminée.

De telles transformations ont été réalisées à partir des pinènes, du myrcène, des terpinènes, du terpinolène et du limonène.

Par exemple à partir du R-(+)-limonène, quatre voies principales de dégradations microbiennes ont été proposées par DHAVALIKAR (27), KRAIDMAN (28) et KIESLICH (29).

Ainsi sous l'action de divers micro-organismes, il a été possible d'orienter la réaction, stéréospécifique, selon la voie 1, vers le trans carvéol et par une double oxydation vers la (+)-carvone. Dans ces conditions, le S-(-)-limonène peut donner la (-)-carvone à l'arôme de menthe verte.

La 2^{ème} voie donne, avec des rendements très faibles, des alcools et des acides périlliques (figure 3).

La 3^{ème} voie a été découverte par KRAIDMAN (28) qui, utilisant l'espèce *cladosporium* a obtenu le (+)- α -terpinéol avec une excellente pureté à partir du R-(+)-limonène et sans sous produit

La dernière voie se fait via l'époxyde-1,2 du limonène. Elle permet d'obtenir le diol-1,2 correspondant (27, 30-32) à l'aide de divers champignons. Toujours selon cette voie, une hydrolyse stéréosélective du mélange racémique des époxydes du limonène a été réalisée par *Diplodia gossypina* ou *Penicillium digitatum* ; elle conduit sélectivement à un seul diol de configuration (1S, 2S) (figure 4) (29) .

Figure 3 :

Bioconversion du limonène.

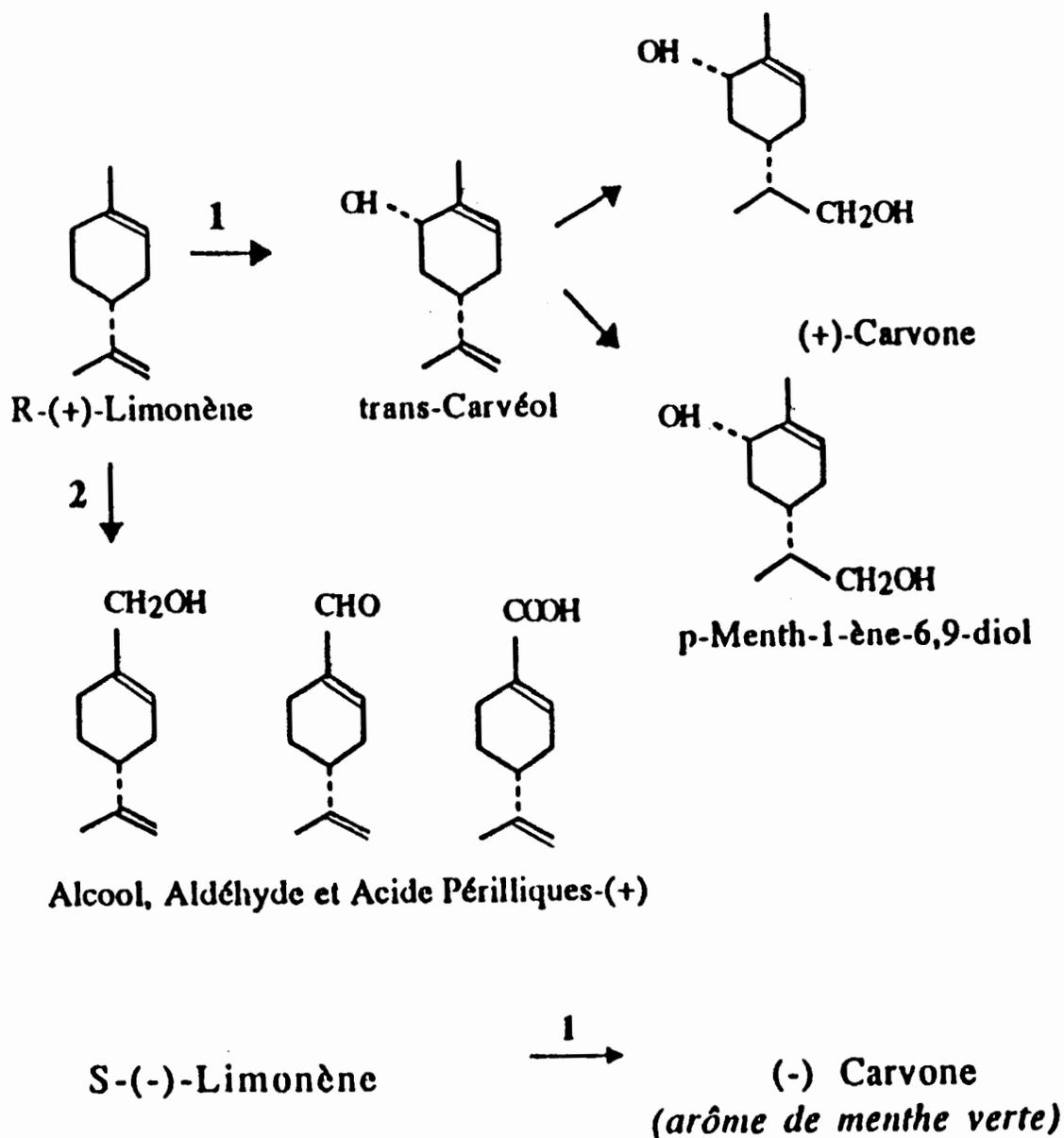
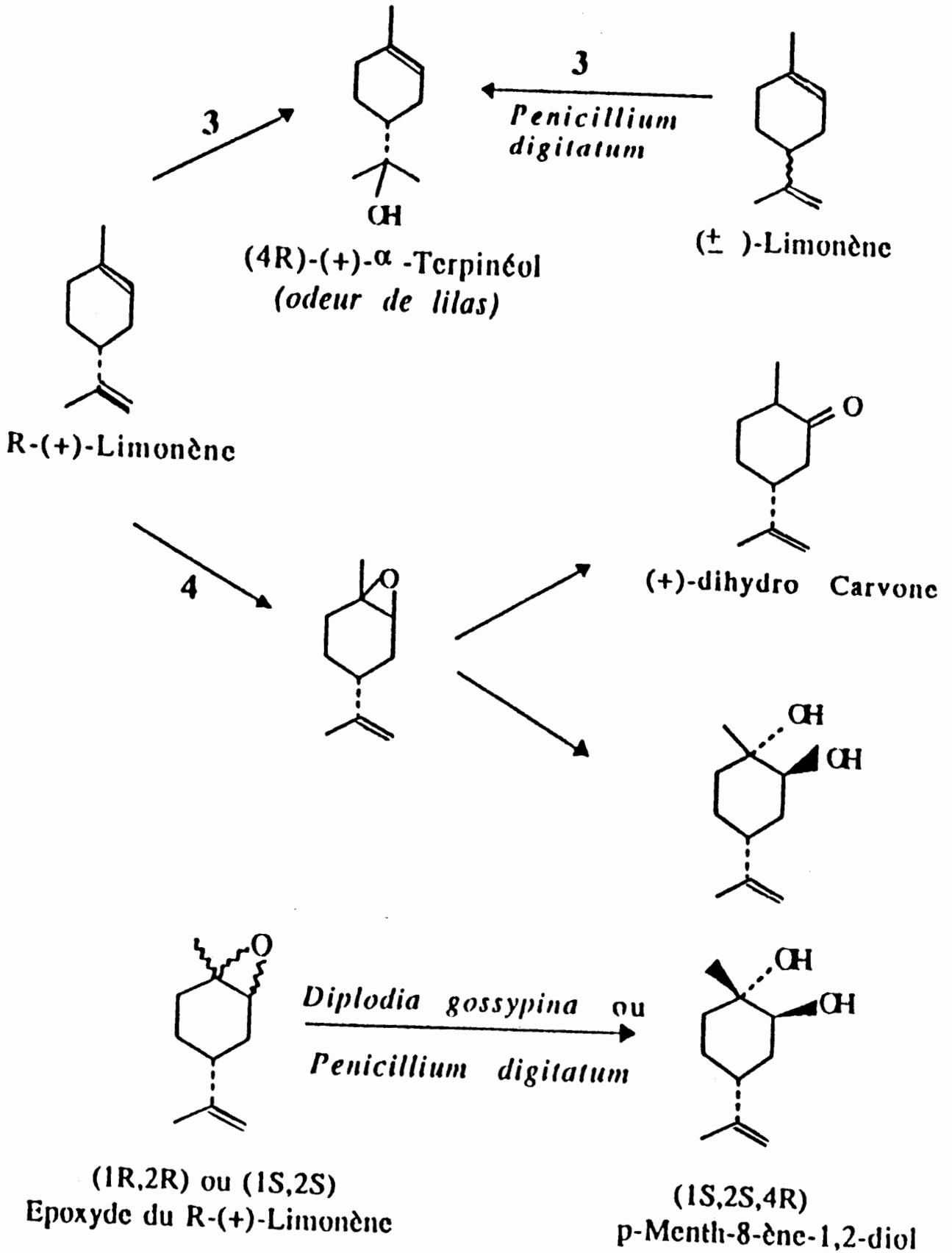


Figure 4 :
Schéma réactionnel



I-8-3- AUTOXYDATION ET PHOTO-OXYDATION DES TERPÈNES

I-8-3-1- AUTOXYDATION

L'autoxydation (33) est une oxydation spontanée dont sont l'objet certains solides ou liquides par l'oxygène moléculaire dans son état fondamental triplet, à la température ambiante ou à son voisinage et à la pression atmosphérique.

Le mécanisme de la réaction est de type radicalaire, sensible aux effets stériques et stéréoélectroniques, souvent accompagnés d'une racémisation partielle ou totale et résultant de la superposition de trois groupes de réaction :

- formation de peroxydes et d'hydroperoxydes par des réactions en chaînes,
- évolution de ces composés vers des produits d'oxydation stables,
- décomposition de ces composés en radicaux libres qui initient d'autres chaînes d'oxydation et des chaînes de polymérisation.

Il a été montré (34) que les corps ne sont pas auto-oxydables à l'état gazeux mais en phase liquide homogène par l'oxygène dissout dans le substrat ou à la surface de séparation oxygène / substrat. La réaction peut se faire avec ou sans amorçeurs.

Dans le premier cas, les amorçeurs sont naturellement ceux qui subissent facilement la dissociation thermique ou photochimique comme les peroxydes, les hydroperoxydes et les composés azo (35).

Dans le deuxième cas la réaction est lente mais est accélérée par la lumière et surtout par la température.

Le limonène, autoxydé à 70°C pendant 10 heures (36) conduit seulement à la formation de carvéol et de carvone. Mais à des températures moins élevées (37,38), des produits d'oxydations peu stables ont été obtenus.

Le Δ^3 -carène (39) conduit bien à deux alcools principaux dont le rapport de concentration dépend de la méthode utilisée.

I-8-3-2- PHOTOOXYDATION

La photo-oxydation est une action conjuguée de l'oxygène et de la lumière en présence de sensibilisateurs efficaces, qui sont soit colorés (bleu de méthylène, rose de bengale), soit pauvres en électrons (dicyanoanthracène, oxyde de titane).

De nombreux travaux de photooxydation ont été réalisés sur les monoterpènes.

Citons PFAU (40) qui admet la formation d'un peroxyde intermédiaire dans la formation de l'hydroperoxyde de pinocarvényle à partir de α -pinène. Plus tard, JEFFORD, BOSHUNG et MORIARTY (41) démontrent l'existence d'un mécanisme de concertation allylique en solvant protique et l'influence des effets stériques et stéréoélectroniques favorisant l'attaque exoectoclinal de l' α -pinène pour former majoritairement le transpinocarvényle. Une réduction des hydroperoxydes permet d'obtenir des alcools optiquement actifs.

La photooxydation conserve l'activité optique alors qu'en autoxydation il y a racémisation par passage à un intermédiaire radical symétrique. C'est la conclusion de nombreux travaux en particulier ceux de SCHENCK (42) sur la photooxydation du (+)-limonène lorsqu'il compare ses résultats à ceux des autoxydations.

I-9- LES CHÉMOTYPES

En effet, les composantes aromatiques d'une plante varient en fonction des divers facteurs comme l'ensoleillement, la nature et la composition du sol, la situation géographique (altitude et latitude) et les saisons etc. Une même plante issue de deux sites différents peut sécréter des essences dont les différences sont plus ou moins importantes. Le terme de chémotype est alors utilisé pour différencier les huiles essentielles extraites (43).

Par exemple les chémotypes suivants ont été signalés, suite à l'analyse des huiles essentielles du *Lippia multiflora* : le camphre comme produit majeur au Ghana (44), le carvone et le linalol en Ethiopie (45), le linalol (>80%) au Nigéria (46) et deux types au Congo, paracymène-thymol et les tagétones (47). Selon les travaux effectués récemment

dans notre Laboratoire et à l'Université du Bénin au Togo, la même plante donne des huiles essentielles avec comme produits majeurs le 1,8- cinéole ou le myrténol ou encore le couple géraniol-limonène (48) etc....

En qui concerne l'influence de la luminosité, il a été montré que le basilic cultivé à Madagascar en pleine lumière conduit à un taux de chavicol de 57% alors que la même plante cultivée à l'abri en contient jusqu'à 74% (47).

Ces différences qui peuvent être extrêmement importantes influent sur les propriétés (biologiques) de l'huile essentielle.

Il est nécessaire de connaître le chémotype avant son utilisation afin d'éviter les échecs thérapeutiques, voire des accidents graves.

I-10- PROPRIÉTÉS DES HUILES ESSENTIELLES

I-10-1- PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

I-10-1-1- DENSITÉ

Les huiles essentielles sont généralement plus légères que l'eau et non miscibles, ce qui permet leur séparation dans l'essencier couplé à l'alambic. Cependant, quelques unes ont une densité supérieure ou voisine de celle de l'eau (Sassafras, clous de girofle etc...).

I-10-1-2- POUVOIR ROTATOIRE ($[\alpha]^{20}_D$)

Les huiles essentielles sont actives à la lumière polarisée. Quelques exemples du *Melaleuca quinquénervia* du Bénin : -0,35 à -6,11° ; +0,69 à +5,01° à 22°C.

I-10-1-3- INDICE DE RÉFRACTION

Il est souvent élevé ; par exemple, on observe pour l'huile essentielle des feuilles de *Clausena* un indice de réfraction (49) $n^{30}_D = 1,5613$ et de $n^{20}_D = 1,4563$ pour l'*Eucalyptus citriodora* de Kansounpka Bénin.

I-10-1-4- SOLUBILITÉ

Les huiles essentielles sont naturellement non ou très peu solubles dans l'eau ; certains composants sont néanmoins plus solubles que d'autres.

Quelques unes ont des constituants particulièrement solubles, qui entraînent l'obtention d'émulsions pendant les distillations.

Par contre, elles sont totalement solubles dans les huiles grasses, les alcools à titre élevé et les solvants organiques.

I-10-1-5- VOLATILITÉ

Cette propriété les oppose aux huiles grasses (huiles fixes). Elle est à l'origine de leur caractère odorant et permet leur entraînement à la vapeur d'eau.

Elles sont à la température ambiante, liquides rarement visqueuses ou cristallines. Rares sont celles qui se solidifient à froid (*Tanacetum annuum-chamazultène*).

I-10-1-6- COLORATION

Les huiles essentielles sont diversement colorées. Tout l'arc-en-ciel est représenté

Exemples : le rouge de certaines sarriettes, le jaune claire du *Clausena anisata* de Kétou Ewé Bénin et du *Melaleuca quinquenervia* et le jaune fort de l'*Eucalyptus camalduleus* de Banikoara Bénin.

L'analyse chromatographique permet d'apprécier leurs compositions.

I-10-2- PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES ET CHAMPS D'ACTION (50,51)

Enumérons les propriétés des huiles essentielles en général. On distingue :

- Les propriétés anti-infectueuse, insectifuge et insecticide, anti-inflammatoire et antihistaminique et les propriétés immunorégulatrices.
- Les propriétés anticatarrhale, neurotrope, endocrinorégulatrice, vasculotrope et hémotrope.
- Enfin, les propriétés antitumorale et antileucémique, digestive, cicatrisante et antihématome, analeptique, et thermorégulatrice.

I-10-3- QUELQUES TRAVAUX EFFECTUÉS SUR LES PROPRIÉTÉS DES HUILES ESSENTIELLES

Beaucoup de travaux ont été effectués par de nombreux chercheurs quant aux propriétés des huiles essentielles en vue de leurs usages.

En effet, les mélanges d'huiles essentielles se sont révélés très bactéricides et fongicides (52). Par contre leurs propriétés antivirales ont été peu étudiées (53).

Des effets thérapeutiques intéressants sont obtenus par inhalation sur des souris infectées par *pneumococcus* (54).

Certains auteurs recommandèrent l'huile de *Cochlearia armoracia* pour le traitement des infections du tractus urinaire par les bactéries gram positif et gram négatif (55)

En 1962 il a été remarqué que le plus souvent, les essences végétales ont un plus grand pouvoir germicide que leurs vapeurs (56).

D'autres auteurs ont suggéré leurs applications pratiques dans la cosmétique, la fabrication des désinfectants et dans la guérison des maladies microbiennes (57).

Les huiles essentielles de Romarin Sariette, Thym et Lavande ont des propriétés antibactériennes et antifongiques (58).

Par ailleurs, des huiles essentielles notamment celles extraites de l'ail, de l'oignon, de l'origan et du thym ont des effets inhibiteurs sur treize types de levures (59).

La plupart des huiles essentielles de quarante plantes aromatiques Egyptiennes sont fongicides et faiblement bactéricides (60).

Il existe un seuil d'efficacité des huiles essentielles en fonction des doses administrées. Ce seuil dépend à la fois de la molécule et du but dans lequel elle est employée.

Outre le seuil d'efficacité, la loi d'inversion des effets, bien connue en physiologie, s'applique à l'ensemble des composants des huiles essentielles.

I-10-4- PROPRIÉTÉS INDÉSIRABLES ET TOXICITÉ DES COMPOSÉS AROMATIQUES

Les huiles essentielles sont des substances très actives. Pour cela, l'usage doit être fait avec vigilance et sur la base des connaissances fiables et suffisantes. On reconnaît plusieurs types de toxicité :

- la toxicité aiguë,
- la toxicité à court terme,
- la toxicité à long terme.

D'une manière générale, la toxicité des molécules aromatiques est liée à la présence de certains sites fonctionnels oxygénés. Quelques unes des propriétés indésirables sont :

- Propriétés vésicantes et nécrosantes, allergisantes.
- Propriétés photosensibilisantes, neurotoxiques, néphrotoxiques.
- Propriétés hépatotoxiques et carcinogéniques.

I-11- USAGES DES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles sont utilisées depuis l'antiquité. Les progrès de la chimie ont permis d'en déterminer la composition chimique et d'ouvrir une nouvelle voie de recherche vers l'étude de leurs principaux constituants, les molécules terpéniques.

Avant l'utilisation à des fins préventives, curatives ou de bien être, la qualité des huiles essentielles est à rechercher et ses propriétés biologiques sont à déterminer.

I-11-1- RECHERCHE DE LA QUALITÉ (43)

En effet, pour un bon usage, l'utilisateur doit avoir :

- des garanties sur la plante elle-même, son mode de culture, sa zone de récolte, à savoir : espèce botanique certifiée, race chimique définie, le choix des plantes (de culture écologique), la récolte des plantes aromatiques.
- des garanties sur l'huile essentielle elle-même : bonnes conditions de stockage. Elle doit être 100 % naturelle, 100 % pure et 100 % totale.
- des garanties sur l'extraction : mode d'extraction, température et pression d'extraction, durée d'extraction, solvant utilisé.

Le contrôle de la qualité des huiles essentielles se fait au laboratoire par l'échantillonthèque, les contrôles organoleptiques, l'étude des constantes physiques et les analyses chromatographiques.

Ainsi, elles présentent à cause de leurs diverses propriétés un intérêt pour les industries pharmaceutiques cosmétologiques, chimiques, minières, etc.

I-11-2- INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

L'homme a toujours recherché la plante, non seulement à des fins domestiques et alimentaires, mais encore dans un but thérapeutique évident.

Confronté à la maladie, c'est dans son environnement immédiat et le plus accessible que l'homme a cherché le remède à ses maux. C'est alors qu'est née la phytothérapie au XIX^{ème} siècle.

Etymologiquement, la phytothérapie est la thérapeutique par les plantes considérées comme possédant une activité pharmacologique (61).

Deux définitions de la phytothérapie sont maintenant distinguées :

au sens strict, c'est l'emploi des plantes médicinales naturelles ou sous formes de préparations galéniques élémentaires (poudres, nébulisants, teintures...).

au sens large, elle regroupe toutes les thérapeutiques à base végétale, cependant réservées au seul usage allopathique.

Les utilisations des plantes médicinales et les recherches dont elles sont l'objet n'ont pourtant jamais cessé ; actuellement, plus de 50% des spécialités pharmaceutiques commercialisées comportent une ou plusieurs fractions directement issues du règne végétal (62).

Les huiles essentielles jadis utilisées dans le traitement des affections d'origine bactérienne, ont fait l'objet de nombreuses études.

La thérapeutique par les huiles essentielles est l'aromathérapie ; partie intégrante de la phytothérapie, elle est au départ définie comme l'emploi des arômes et aromates dans la thérapeutique (1).

En déclin depuis 1948, l'aromathérapie a suscité un sursaut d'intérêt en 1964 et connaît à l'heure actuelle un succès grandissant grâce aux travaux modernes qui ont suivi ceux du "Père de l'aromathérapie" le Lyonnais GATTEFOSSE (63) qui, dès 1936, à la lumière de trente années d'expérimentation, affirmait :

" Médecins et chimistes seront surpris de la multitude de corps odorants utilisables en médecine et de la grande variété de leurs fonctions chimiques. En dehors des propriétés microbicides et antiseptiques, les huiles essentielle, des aromates et des épices possèdent des propriétés antitoxiques, antivirales, une action énergétique puissante et un pouvoir cicatrisant incontesté. L'avenir leur réserve un rôle encore beaucoup plus important".

Selon S. INOUYE et al (64) les huiles essentielles sont utilisées avec succès, grâce à leur caractère volatil, pour lutter contre les contaminations des surfaces et de l'air. Le "paragerm", solution volatile à activité bactéricide et fongistatique, fabriqué à base d'huiles essentielles naturelles (citron, lilas) (65), s'est révélée sans aucune toxicité pour l'homme aux doses utilisées. Les huiles essentielles entrent ainsi dans la fabrication des produits de nettoyage et des désinfectants.

Sur le plan antimicrobien, les huiles essentielles sont des sources possibles de principes actifs d'origine naturelle susceptibles d'entrer dans la grande classe thérapeutique des antiseptiques. Dans l'âpre lutte contre les germes pathogènes, les huiles essentielles représenteraient peut-être un moyen d'éviter les problèmes de résistance trop souvent observés avec les sulfamides et les antibiotiques (66). Ce constat est issu de l'étude systématique des huiles essentielles, tant sur le plan chimique qu'au point de vue de leurs activités, effectuée par de nombreux auteurs (66-72).

Ainsi, J. VALNET et coll. (66) montraient en 1978 que les huiles essentielles sont efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques, qu'elles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des levures et moisissures. Outre leur composition complexe, le principal inconvénient de ces produits demeure leur instabilité.

En effet, il est connu et rapporté par tous les auteurs que les huiles essentielles vieillissent (73-77) mais peu de travaux ont été menés sur leur évolution en fonction du temps.

C'est donc un nouvel axe de recherche sur les huiles essentielles.

I-11-3- INDUSTRIE COSMÉTOLOGIQUE ET PARFUMUMERIE

Un grand nombre d'huiles essentielles est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums, des produits de toilette et dermatologiques. Elles servent à préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique tout en leur assurant leur odeur agréable (78).

De même, certains constituants chimiques isolés par fractionnement des huiles essentielles ont de bonnes qualités olfactives et interviennent comme fixateurs (79, 80). Ils peuvent faire l'objet de transformations chimiques donnant naissance à de nouvelles odeurs. Ainsi, à partir de l'eugénol tiré de l'huile essentielle de girofle, on aboutit à l' isoeugénol qui a une odeur d'œillet (81).

I-11-4- INDUSTRIE ALIMENTAIRE

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles sont beaucoup utilisées dans la conservation des denrées alimentaires. Elles y sont rajoutées pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (82-84).

La thérapeutique par les huiles essentielles ou aromathérapie était définie au départ comme l'emploi des arômes et des aromates dans la thérapeutique (1), deux termes qui prêtent souvent à confusion.

Les aromates sont des substances végétales qui répandent une odeur suave ou pénétrante et qui peuvent également avoir une saveur agréable ; ajoutés aux aliments, les aromates constituent alors les épices.

Les arômes sont des principes odorants qui émanent de certaines substances naturelles ou de matières engendrées par un processus chimique ou enzymatique.

I-11-5- INDUSTRIE MINIÈRE

Peu d'huiles sont utilisées dans ce domaine.

Certaines huiles essentielles sont utilisées comme tensio-actifs dans la séparation de sulfure métallique (Zn, Pb) et dans la technique de flottation (85-87).

D'autres le sont comme dégraissants de résines de caoutchouc et de pièces métalliques dans l'industrie de vernis (88, 89).

CHAPITRE II

ÉTUDES DE QUELQUES ESPÈCES D'*EUCALYPTUS* DU BÉNIN

INTRODUCTION

Introduits au Bénin vers les années 1960, les Eucalyptus ont été plantés à des fins économiques mais aussi pour la conservation des sols et en particulier pour la production de bois de feu et de charbon de bois pour les villes.

Leurs feuilles qui n'ont pas fait l'objet d'étude exhaustive ne sont destinées à aucune exploitation industrielle. Seule une partie de la population indigène les connaît, dans la pharmacopée, sous le nom «d'arbre contre la toux» (Kpen tin en langues nationales goun et fon).

Parmi la dizaine d'espèces environ implantées au Bénin, cinq ont fait l'objet de notre étude ; il s'agit des espèces

1- *camaldulensis*,

2- *citriodora*,

3- *globulus*,

4- *tereticornis*

5- et *torelliana*.

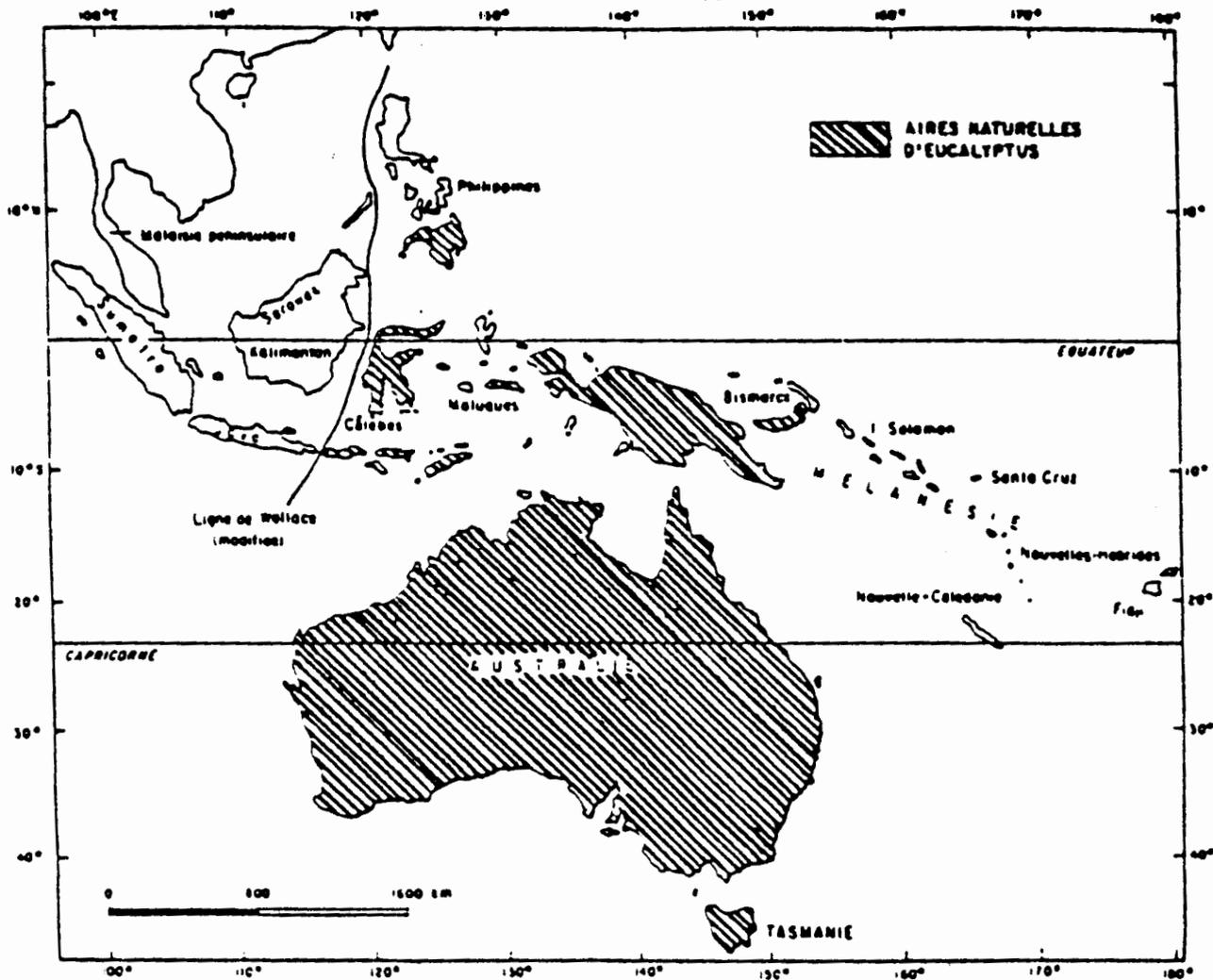
II-1- GÉNÉRALITÉS SUR LE GENRE *EUCALYPTUS*

II-1-1- ORIGINE

Originaire d'Australie, de la Tasmanie, de la Malaisie, de la Nouvelle Zélande et des Iles de la Sonde (90), les Eucalyptus poussent, du point de vue du milieu naturel, dans divers types de sols et sont résistants au froid. Les espèces spontanées se trouvent presque toujours à l'est de la ligne de Wallace (figure 5)

Figure 5 :

Le milieu naturel des Eucalyptus



II-1-2- BOTANIQUE

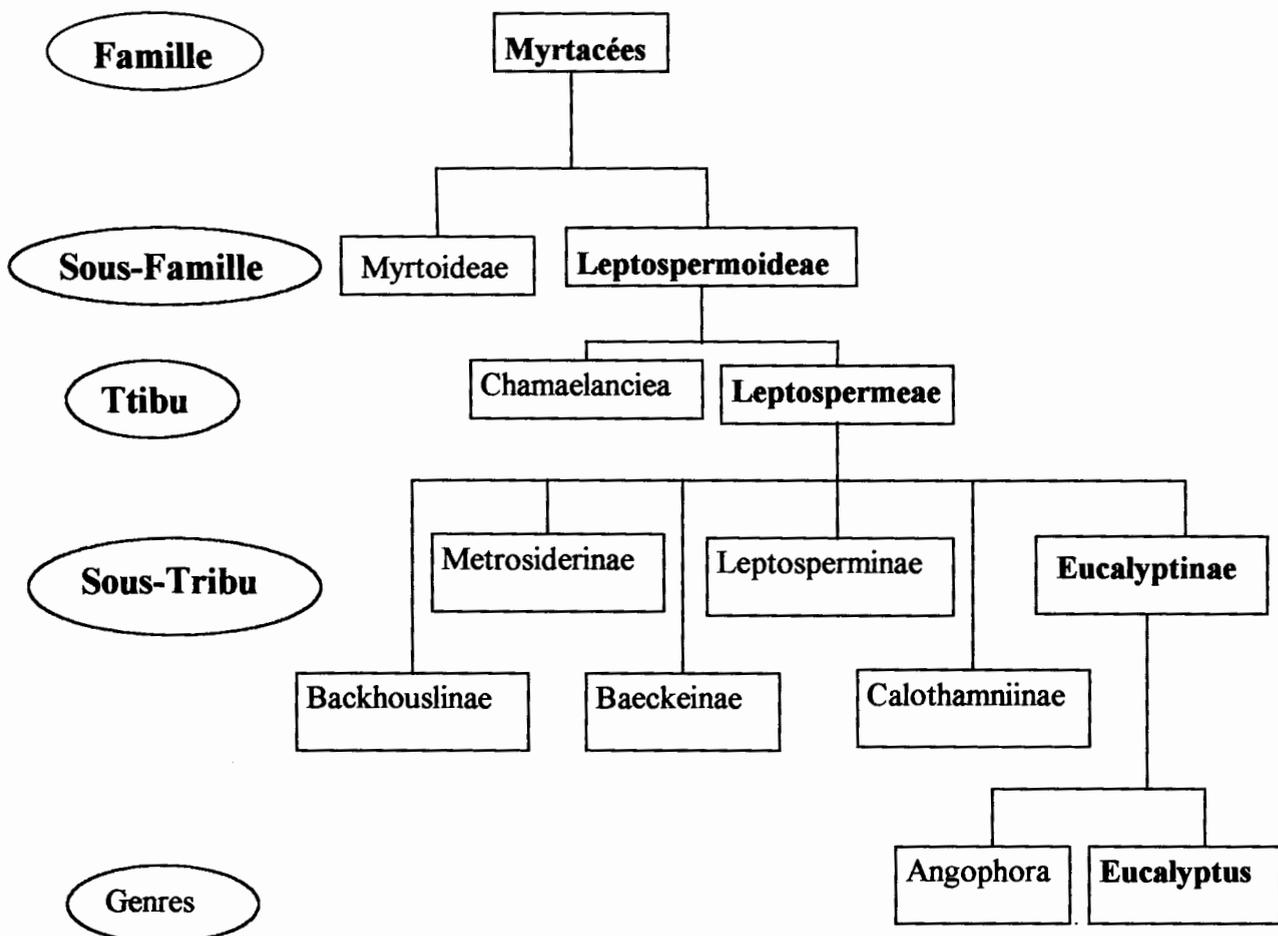
Le genre *Eucalyptus* appartient à la famille des Myrtacées, à l'ordre des Mytrales dans la tribu ou section des Leptospermeae (91) (figure 6).

La famille des Myrtacées regroupe environ 90 genres avec plus de 600 espèces et variétés (92).

Certains *Eucalyptus* sont des arbres géants faisant partie du règne végétal et peuvent atteindre 100 mètres, d'autres sont des arbustes. Ce sont des plantes ligneuses de toutes tailles.

Figure 6 :

Classement du genre *Eucalyptus* dans la famille des Myrtacées



La distinction entre les diverses espèces d'*Eucalyptus* est difficile à cause de la variation de leurs caractères végétatifs en fonction de l'âge (88).

Les *Eucalyptus* ont souvent une écorce gris-blanc qui, avec le temps s'exfolie en grandes lames brunes.

Excepté quelques espèces, tous les *Eucalyptus* développent cinq différents types morphologiques de feuilles : les cotylédons, les feuilles de semis, les feuilles de jeunesse, les feuilles intermédiaires et les feuilles adultes. Elles sont associées à certaines phases de la vie de l'arbre. Leurs formes et leurs longueurs varient au sein d'une même espèce et également pour un individu donné. L'âge morphologique approximatif des types de feuilles varie entre 1 et 18 mois. (PENFOLD et WILLIS 1961) (88).

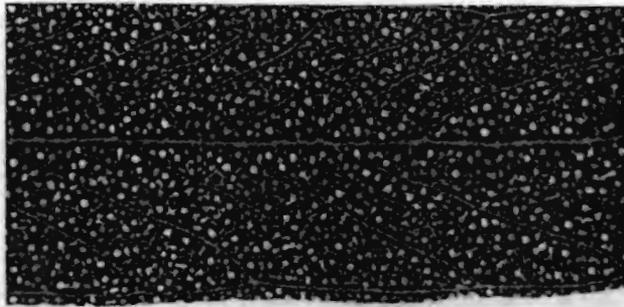
- Feuilles Jeunes	1 mois
- Feuilles Mâtures	6 mois
- Feuilles Agées	12 à 18 mois

La durée de vie des Feuilles est en moyenne de 18 mois (93).

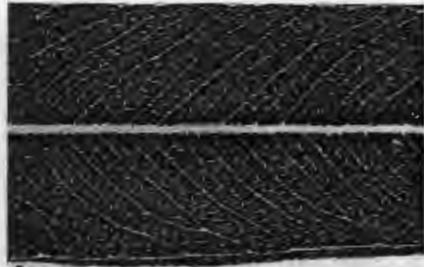
Les feuilles sont souvent persistantes. Les feuilles jeunes sont opposées, ovales, cireuses et horizontales. Les feuilles adultes sont alternées, pétiolées et lancéolées, coriaces ; elles sont souvent épaisses, raides fortement actimisées riches en sclérenchyme, parfois elles sont pendantes en forme de faux. Les feuilles jeunes et les feuilles âgées sont les deux principaux types de feuilles des *Eucalyptus*.

Il existe chez la plupart des espèces d'*Eucalyptus*, des glandes de sécrétions à huiles essentielles. Ce sont des poches schizogènes sécrétrices d'huiles essentielles localisées sous épiderme foliaire dans le parenchyme chlorophyllien pallisadique (94) leur nombre est variable et se répartit différemment dans les feuilles selon les espèces. On note une corrélation étroite entre la densité des glandes sécrétrices et le rendement en huiles essentielles (95).

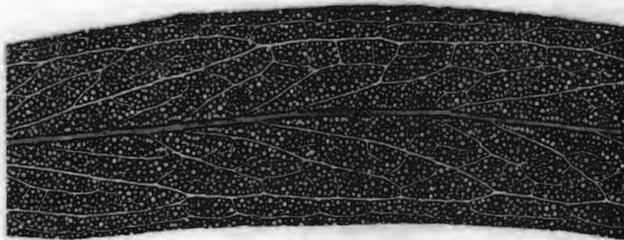
Des coupes histologiques réalisées dans les feuilles de diverses espèces d'*Eucalyptus* montrent la distribution des glandes de sécrétion à huiles essentielles (planches 1, 2,).

Planche 1 :

a



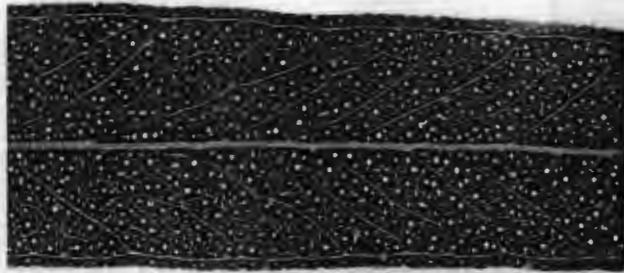
b



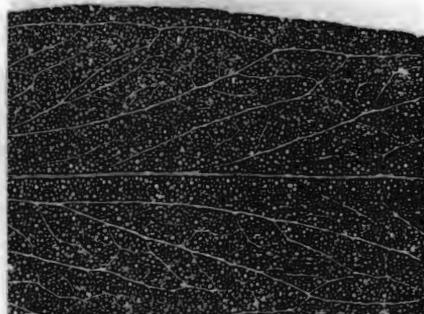
c



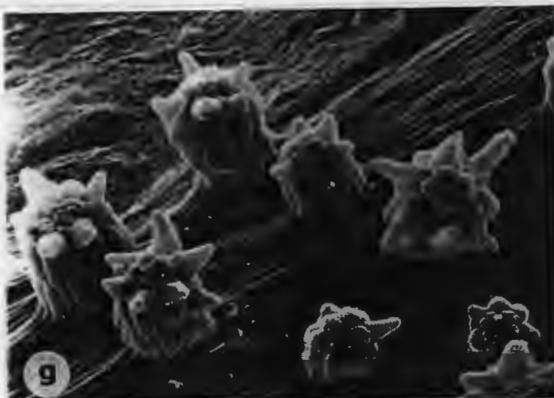
d



e



f

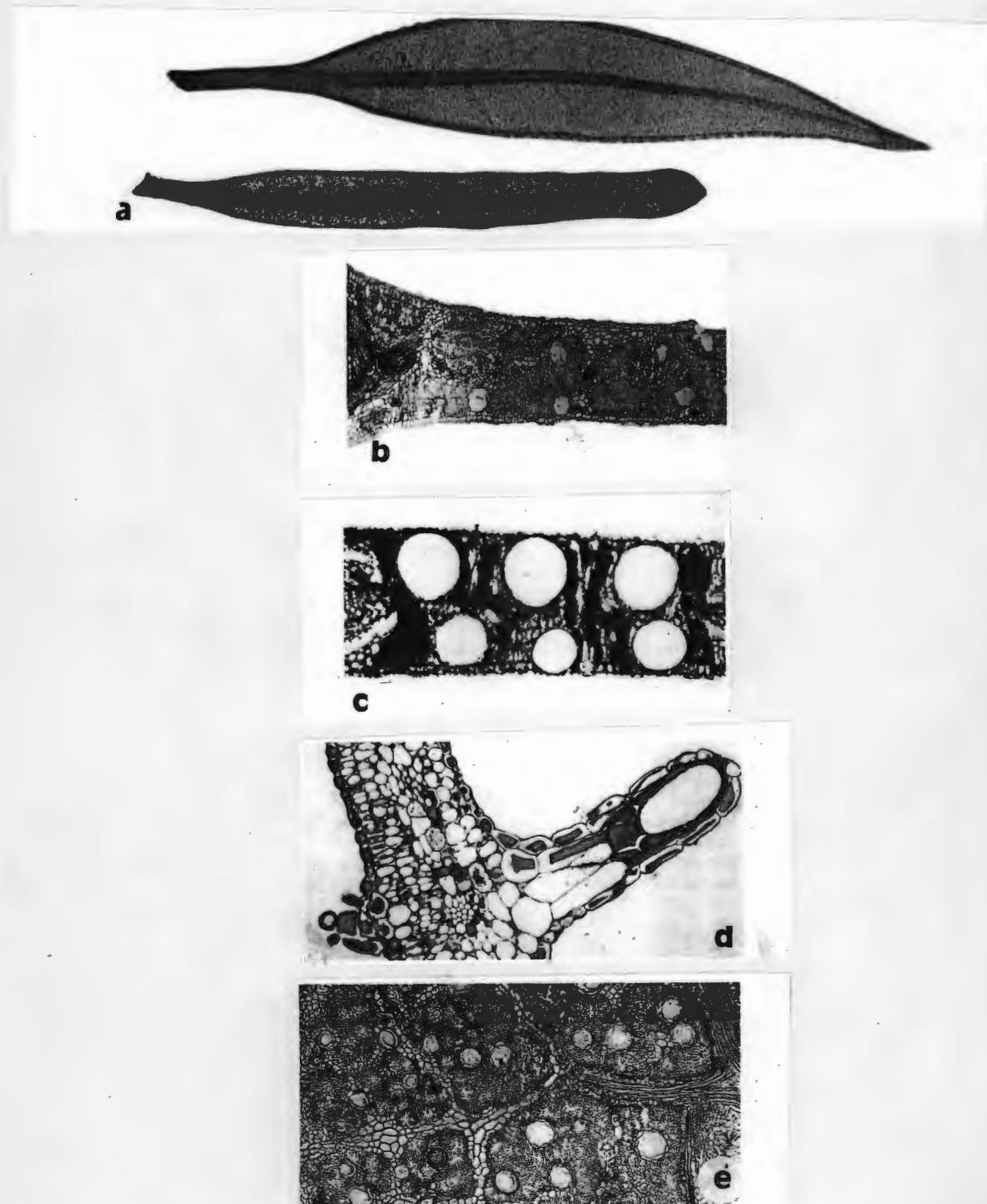


g



h

Sélection de feuilles d'*Eucalyptus* montrant la distribution des glandes de sécrétion à huiles essentielles ; a- *E. polybractea*, b- *E. citiodora*, c- *E. radiata*, d- *E. globulus*, e- *E. badjensis*, f- *E. dives*. g et h- photographie électronique de la surface des feuilles montrant les poils sécréteurs associés aux glandes à huiles et cellules sécrétrices ; g- *E. abbreviata*, h- *E. olseii*.

Planche 2 :

Coupes transversales des feuilles d'Eucalyptus montrant les Glandes à huiles. a- feuilles jeunes (10 jours) d'*E. camaldulensis*, b- *E. camaldulensis*, c- *E. kochii*, d- *E. citriodora*, e- coupe longitudinale de la feuille d'*E. camaldulensis*

Les arbres possèdent des fruits en forme de capsule.

Les fleurs très spécifiques, rarement solitaires, sont formées d'un réceptacle floral ligneux, dur, d'aspect variable surmonté d'un opercule. Elles sont complètes, rarement unisexuées nectarifères et pollinisées par les oiseaux. La partie voyante de la fleur est représentée par la corolle, le calice ou les étamines.

Chaque fleur possède 4-5 pétales, 4-5 sépales tous imbriqués ; souvent n étamines centripètes libres ou en 4 – 5 faisceaux, elles ont un connectif avec une glande apicale. Le pollen est binucléé ou polycolpé. L'ovaire est formé de 2 à 5 carpelles et composé d'autant de loges. Il y a 2 à n ovules.

Au moment de l'anthèse, la multitude d'étamines contenues dans le réceptacle floral se dressent et éjectent le couvercle.

Les Leptospermoïdeae à l'ovaire 2-5n loculaire sont surtout d'Australie (96).

La multiplication des Eucalyptus se pratique soit à partir des graines, soit après un abattage à partir des rejets des souches.

II-1-3- USAGES

Les Eucalyptus présentent un intérêt économique et scientifique. Ils sont des sources de bois de chauffe et de charbon de bois, de pâte à papier : les espèces *camaldulensis*, *grandis*, *botryoides*, *viminalis*, et *saligna* sont les plus intéressantes pour une exploitation dans ce domaine et dans celui de pâte à dissoudre qui peut être transformée en viscosité et en fibre d'acétate (97).

Les *Eucalyptus* permettent d'assainir les terres trop humides, grâce à leur grande capacité d'absorption d'eau ou de pompage d'eau en profondeur et à l'intense évaporation s'opérant au niveau des feuilles. De ce fait, ils permettent de lutter contre le paludisme.

Certaines variétés d'*Eucalyptus* contribuent au reboisement des sols dans le cadre de la lutte contre la désertification ou servent d'ornement au voisinage des maisons ou au bord des routes ; d'autres sont utilisés dans la fabrication de poteaux électriques.

Toutes les espèces d'Eucalyptus ne sont pas aromatiques ; les espèces aromatiques contiennent de l'huile essentielle surtout au niveau des feuilles, et sont exploitées pour en extraire l'huile essentielle.

II-1-4- HUILES ESSENTIELLES DES EUCALYPTUS

Les huiles essentielles des Eucalyptus extraites des feuilles ont fait l'objet de nombreuses études. En général, elles sont utilisées directement. Certaines feuilles peuvent contenir des composés non volatils comme les tanins et les flavonoïdes (98).

II-1-4-1- APERÇU HISTORIQUE

Avec le développement de l'autossuffisance, un effort a été fait en 1788 en Australie dans l'exploration des plantes pour leur valeur médicinale. Ainsi le premier échantillon d'huile essentielle d'Eucalyptus (1/4 de gallon distillé par entraînement à la vapeur d'eau) a été collecté et distribué en Angleterre en 1789 (McKern 1968 ; SMALL 1977) (99, 100). Cette huile avait l'odeur de menthe poivrée et avait été utilisée sans aucun doute pour le traitement de l'indigestion. Les investigations ont montré que cette huile provenait de l'*Eucalyptus piperita* (McKern 1968) (99).

Malgré l'énorme potentiel dont disposait l'Australie l'essor industriel pour l'exploitation de l'huile d'Eucalyptus n'a réellement pris qu'entre 1852-1854, grâce au pharmacien Joseph BOSISTO par la construction de sa première distillerie (McKern 1968 ; SHIEL 1985) (99, 101). Le premier Eucalyptus duquel BOSISTO avait extrait l'huile était l'*Eucalyptus amygdalina*.

L'huile de BOSISTO avait un faible taux en 1,8-cinéole et un pourcentage moyen de phellandrène (SHIEL 1985) (101).

Il vulgarisa sa technique et d'autres lui ont emboîté le pas. Ainsi, en 1870, à partir de leurs travaux sur l'huile d'*Eucalyptus globulus*, cette huile a été internationalement acceptée comme huile médicinale.

Progressivement l'huile d'*Eucalyptus amygdalina* perdait son importance médicinale et était seulement utilisée comme solvant vers la fin du 19^{ème} siècle.

En 1920, elle a été remplacée par l'huile provenant d'*Eucalyptus radiata* et d'*Eucalyptus polybractea* et en 1930 par l'internationale huile médicinale d'*Eucalyptus globulus*.

L'Australie connut son essor industriel au cours de la première guerre mondiale. La mévente est survenue dans les années 1930-1935 à cause de la production des plantations étrangères.

A partir de 1970, avec le développement des plantations étrangères, la production des huiles essentielles et la technique de rectification, la production de l'Australie s'est notablement réduite. Les *Eucalyptus amithii*, *divers* et *radiata* ont été sélectionnés pour la production d'huiles essentielles en Afrique du sud et au Zwaziland. Au Zimbabwe ce sont les espèces *cinerea* et *smithii*.

Les grands producteurs d'huiles essentielles à 1, 8- cinéole sont la Chine, le Portugal, l'Espagne, le Chili, l'Afrique du sud et la Zwaziland (ABBOTT 1989) (102). Le Brésil et le Congo ont emprunté la même voie avec le développement de la technique du clonage.

Du point de vue chimique, l'identification des constituants de chacune des huiles et leur classification suivant leur utilisation en médecine, en industrie et en parfumerie a commencé avec CLOEZ en 1870. Il nomma le constituant principal de l'huile d'*Eucalyptus globulus*, Eucalyptol. Plus tard en 1884, JAHNS isola ce composé et l'identifia correctement comme le 1,8- cinéole (92).

Les deux grands premiers chercheurs sur la composition chimique des huiles essentielles des *Eucalyptus* furent : R. T. BAKER et H. G. SMITH (McKern 1968) (99).

Après leur retraite en 1920, plusieurs chercheurs australiens les ont suivis surtout dans les années 1945.

II-1-4-2- USAGE DES HUILES ESSENTIELLES D'EUCALYPTUS

Des 600 espèces d'Eucalyptus, environ une vingtaine seulement sont commercialement exploitées. Elles sont regroupées dans trois grandes catégories selon l'usage de leurs huiles essentielles : en médecine, en parfumerie et cosmétique et en industrie. Le tableau 4 (LASSAK 1988) (103) nous en donne une idée.

Beaucoup de travaux ont été effectués sur l'usage des huiles essentielles y compris ceux de BAKER et SMITH (1920) (104) et ceux de PENFOLD et WILLIS (1961) (88).

II-1-4-2-1- LES HUILES ESSENTIELLES MÉDICINALES

L'agent thérapeutique actif et le principal constituant des huiles médicinales est le 1,8-cinéole. Selon les normes AFNOR, les huiles essentielles d'Eucalyptus à usage médical doivent contenir au moins 70% de 1,8-cinéole, le phellandrène ne devant être qu'à l'état de trace ($\leq 0,3$) (105).

En effet, le 1,8-cinéole intervient dans les médicaments utilisés pour le traitement des infections pulmonaires et la décongestion des voies respiratoires (106-108).

Une des applications majeures de 1,8-cinéole dans le futur pourrait être un agent d'homogénéisation du mélange combustible pétrole-éthanol (AMMON et all. 1986) (109).

Comme autres applications (85,86) citons les embrocations, les savons et les antiseptiques.

S. DARLET (51) a constaté que l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* montre une inhibition de l'effet cytopathogène des polyvirus type 3 à un taux de protection de 91,6%.

A la dose de 25%, l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* peut être associée à l'huile de ricin et le chloroforme pour détruire les vers intestinaux (87).

D'après V. LASSAK (110) seules les espèces *viridis*, *smithii* et *globulus* seraient directement exploitables.

L'essence d'*Eucalyptus camaldulensis* est, avant utilisation, rectifiée pour élever le taux en 1,8-cinéole de même que celle d'*Eucalyptus tereticornis*, et pour les débarrasser de certains produits irritants comme l'aldéhyde isovalérique et le cuminal (110)

II-1-4-2-2- LES HUILES ESSENTIELLES DE PARFUMERIE

On utilise surtout l'*Eucalyptus citriodora* riche en citronellal (65-85%), l'*Eucalyptus macarthurii*, riche en eudesmol et en acétate de géranyle (60-70%). D'autres espèces, l'*Eucalyptus staigeriana* et l'*Eucalyptus olida* riches en cinnamate de méthyle (95%) et en citral (géranyal et néral) (10-40%), sont aussi utilisées.

Chacun de ces composés présente un intérêt particulier dans la parfumerie. Ils ont de bonnes qualités olfactives et interviennent comme fixateurs (79, 80). Ils entrent dans la fabrication des produits de nettoyage et de désinfectants : savons de toilette, dentifrices, lotions, déodorants domestiques (111-113).

Le citral permet d'obtenir le citronellal, un produit de base pour la synthèse du citronellol et surtout de l'hydroxy citronellal, produits très recherchés en parfumerie (16, 17).

Tableau 4 :

Les espèces d'Eucalyptus aux huiles commerciales (103)

ESPECES	Composé principal et pourcentage	Rendement en huile (%)
Huiles médicales		
<i>E. camaldulensis</i>	cinéole, 10-90	0,3-2,0
<i>E. cineorifolia</i>	cinéole, 40-90	ca.2,0
<i>E. dives</i> (cinéole variant)	cinéole, 60-75	3,0-6,0
<i>E. dumosa</i>	cinéole, 33-70	1,0-2,0
<i>E. elacophora</i> (<i>goniocalyx</i>)	cinéole, 60-80	1,5-2,5
<i>E. globulus</i>	cinéole, 60-85	0,7-2,4
<i>E. leucoxylon</i>	cinéole, 65-75	0,8-2,5
<i>E. oleosa</i>	cinéole, 45-52	1,0-2,1
<i>E. polybractea</i>	cinéole, 60-93	0,7-5,0
<i>E. radiata subsp radiata</i> (cinéole variant)	cinéole, 65-75	2,5-3,5
<i>E. sideroxylon</i>	cinéole, 60-75	0,5-2,5
<i>E. smithii</i>	cinéole, 70-80	1,0-2,2
<i>E. tereticornis</i>	cinéole, 45	0,9-1,0
<i>E. viridis</i>	cinéole, 70-80	1,0-1,5
Parfumerie et cosmétique		
<i>E. citriodora</i>	citronellal, 65-80	0,5-2,0
<i>E. macarthurii</i> (feuilles)	acétate de géranyle, 60-70	0,2-1,0
<i>E. macarthurii</i> (racines)	acétate de géranyle, 60-68	0,1-0,4
<i>E. staigeriana</i>	citral (a+b), 16-40	1,2-1,5
<i>E. olida</i> (syn. <i>E. aff. Campanulata</i>)	E menthyl cinamate, 95	1,6-6,1
Huiles industrielles		
<i>E. dives</i> (phellandrène variant)	phellandrène, 60-80	1,5-5,0
<i>E. dives</i> (pipéritone variant)	pipéritone, 40-56	3,0-6,5
<i>E. elata</i> (pipéritone variant)	pipéritone, 40-55	2,5-5,0
<i>E. radiata subsp. Radiata</i> (phellandrène variant)	-	-

II-1-4-2-3- LES HUILES ESSENTIELLES INDUSTRIELLES

Peu d'espèces sont utilisées ; ce sont les espèces à phellandène 35-40 % et 60-80 %, à pipéritone 40-50 %. Il s'agit d'*Eucalyptus dives*, d'*Eucalyptus elata* et d'*Eucalyptus radiata* ssp *radiata*.

Les huiles essentielles riches à α -phellandène sont utilisées comme tensioactifs dans la séparation de sulfure métallique (Zn, Pb) et dans la technique de flottation (85-87). Elles le sont également comme dégraissants de résines de caoutchouc et de pièces métalliques dans l'industrie des vernis (88, 89).

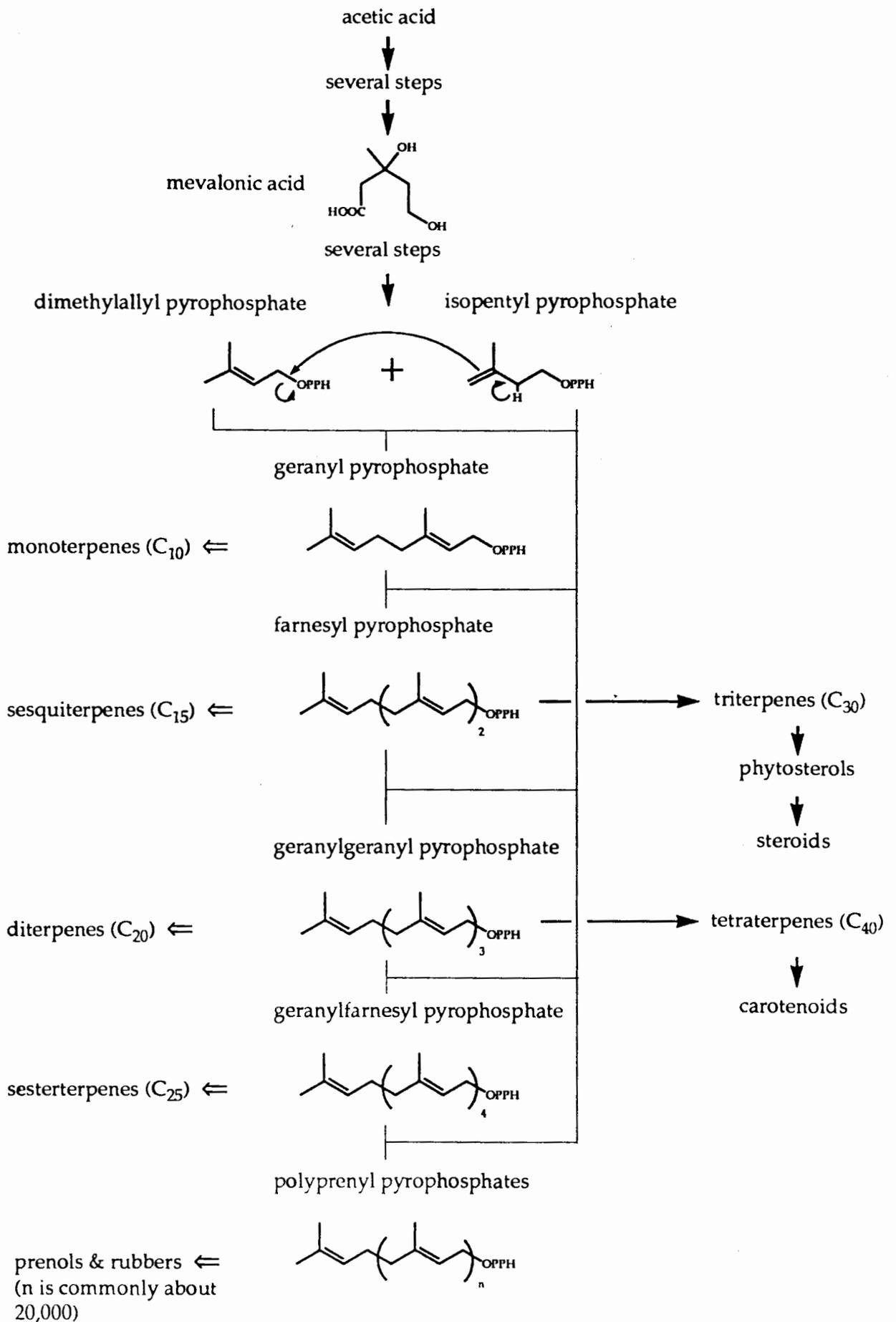
La pipéritone a été beaucoup utilisée pour la préparation du thymol et du menthol et comme additif dans les préparations médicinales (LASSAK 1988) (110).

II-1-4-3- COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'EUCALYPTUS

Les huiles essentielles d'*Eucalyptus* sont constituées de mélanges complexes de composés organiques volatils dont le nombre peut atteindre cinquante ou parfois cent ou plus. Ces composés chimiques appartiennent à différentes classes hydrocarbonées et/ou fonctionnalisées comme les hydrocarbures, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les acides et esters.

Les huiles essentielles des *Eucalyptus* sont principalement composées de mono et de sesquiterpènes. Le terme générique, terpènes, doit son origine à la classe du premier produit naturel isolé de l'huile de "Turpentine". Ce sont des composés constitués d'une séquence de deux ou plusieurs unités isopréniques (C_5H_8) condensées tête à queue ou tête à tête. Ils sont tous biosynthétisés à partir de l'acide mévalonique.

Le schéma général de la biosynthèse des terpènes est représenté sur la figure 7 (ERMAN 1985) (92). La figure 8, quant à elle, montre les terpènes communément retrouvés dans les huiles essentielles des *Eucalyptus* et regroupés suivant le type chimique et leur nom.

Figure 7 : Schéma général de la biosynthèse des terpènes (92)

II-1-4-4- CAUSES DE VARIATION DE LA COMPOSITION ET DU RENDEMENT DES HUILES ESSENTIELLES D'EUCALYPTUS

La chromatographie en phase gazeuse sur colonne(s) capillaire(s) permet une analyse plus fine des huiles essentielles.

Leurs rendements et leurs compositions chimiques dépendent de plusieurs facteurs naturels tels que l'âge des feuilles, la durée de stockage, la saison, le mode et la durée de l'extraction.

II-1-4-4-1- LES TYPES DE FEUILLES ET LEUR ÂGE

Les rendements et les compositions chimiques des huiles essentielles sont influencés par le type de feuille et leur âge.

Des études ont montré que les compositions chimiques des huiles essentielles des *Eucalyptus citriodora* de Kenya et de l'Australie varient en fonction de l'âge des feuilles (114, 115).

Au sein d'une même espèce le rendement varie selon l'âge de l'arbre (116). Plus l'âge est élevé plus le rendement est important.

Des travaux ont prouvé qu'il n'y a pas (PENFORD et WILLIS 1961) (88) de variation qualitative ou simplement insignifiante (WESTON 1984) (117) entre les stades adulte et jeune.

BOLAND et al. (1982) ont montré que le rendement en huile des feuilles de semis est beaucoup plus faible que celui des autres stades (118).

Pour BROOKE et al. (1988), un rendement élevé pour les feuilles âgées et sans différence qualitative est souvent fréquent pour les mêmes arbres d'*Eucalyptus polybracta* (119).

On a constaté (88) que les feuilles mûres d'un jeune arbre d'*Eucalyptus dives* donnent des rendements similaires aux feuilles mûres d'un arbre adulte (PENFOLD et WILLIS 1961) (88).

Le pourcentage en 1,8-cinéole croît nettement pour atteindre sa valeur maximale à 3 ans (TJANDRA 1986) (120). Un résultat similaire est obtenu en citronellal pour l'*Eucalyptus citrodora* par MASCARENHAS et al. (1987) (121).

Le contraste dans les rendements en huile essentielle entre feuilles jeunes et feuilles mûres est souvent marqué. Quoi qu'il en soit, les rendements apparaissent comme le facteur déterminant de la variabilité non seulement entre espèces, mais encore entre individus d'une même espèce au sein d'un même peuplement. En cela, BRYANT, depuis 1950 (122), attira notre attention sur l'inévitable mais possible influence de la position de la feuille sur l'arbre et celle de l'intensité lumineuse sur la composition de l'huile essentielle.

Le rendement en huile essentielle à différents âges apparaît déterminant pour la complexité des échantillons dans le changement quantitatif individuel ou collectif des composés. Certains restent constants, d'autres croissent ou décroissent avec âge. Les échantillons peuvent varier entre individus d'une même espèce sur un même site, ceci dépend de la constitution génétique de chaque arbre (SIMMONS et PARSONS 1987) (123).

D'autres travaux ont montré que la composition de l'huile essentielle peut changer avec l'âge de la feuille. Ceci peut être une importante source d'erreur dans l'étude de l'échantillonnage (LEACH et WHIFFIN 1989) (124).

Peu de travaux ont été effectués sur l'influence de l'âge des feuilles, sur la composition chimique des huiles essentielles d'Eucalyptus.

La comparaison entre phases de jeunesse, intermédiaire et adulte n'est pas (aussi) évidente et dépend des espèces (92).

II-1-4-4-2- EFFET DE STOCKAGE

Ainsi dans le cas d'*Eucalyptus citriodora* (125), le rendement en huiles essentielles et son contenu en citronellal sont affectés, de façon importante, par l'exposition des feuilles au soleil. On note, quant aux feuilles séchées à l'ombre ou stockées dans des conditions adéquates, qu'il se produit une diminution marquée après un délai de cinq mois.

D'autre part, il a été constaté que le séchage préalable à l'ombre des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* du Maroc améliore le rendement et que la teneur en 1,8-cinéole de l'huile essentielle obtenue varie (126).

Une étude réalisée sur des feuilles d'*Eucalyptus citriodora* acclimaté aux Seychelles montre, qu'au delà de 16 jours de conservation des feuilles, il y a une diminution progressive du rendement en huiles essentielles (127).

Le tableau 5 montre l'effet du stockage sur la quantité des huiles essentielles des feuilles d'un *Eucalyptus* hybride (128).

Après une amélioration du rendement par rapport aux feuilles fraîches, pour un stockage de cinq jours, la teneur en huile essentielle diminue régulièrement pour chuter de façon importante après 55 jours de stockage.

Tableau 5 :

Effet de stockage sur la quantité d'huiles essentielle des feuilles d'un *Eucalyptus* hybride.

Date de Distillation	Période de stockage des feuilles (jours)	Teneur en huile % (v/m)
-15.6.83	Frais	0.86
16.6.83-20.6.83	1-5	1.24
21.6.83-25.6.83	6-10	1.12
26.6.83-30.6.83	11-15	1.02
1.7.83-5.7.83	16-20	1.05
6.7.83-10.7.83	21-25	1.00
1.7.83-15.7.83	26-30	1.03
16.7.83-20.7.83	31-35	0.96
21.7.83-25.7.83	36-40	0.95
6.7.83-30.7.83	41-45	0.82
31.7.83-4.8.83	46-50	0.81
5.8.83-9.8.83	51-55	0.44
10.8.83-14.8.83	56-60	0.43
15.8.83-		0.31

II-1-4-4-3- INFLUENCE DE LA PÉRIODE DE RÉCOLTE SUR LE RENDEMENT ET LA COMPOSITION CHIMIQUE

De nombreuses études ont été réalisées par plusieurs auteurs sur la variation de la composition et du rendement en fonction de la période de récolte.

Des observations (129) ont montré, après une étude sur l'*Eucalyptus citriodora* de Cuba que, d'une part, le rendement en huiles essentielles environ de 2% en avril et juillet atteint en mai et novembre un taux maximum de 3,5%, parallèlement, suivant la période de récolte le taux de citronellal varie entre 50 et 80%.

ABOU-DAHAB et coll. en 1976 (130) observent pour l'*Eucalyptus camaldulensis* et l'*Eucalyptus polyanthenios* cultivés en Egypte que, le rendement en huiles essentielles décroît pendant l'hiver et commence à croître au printemps pour atteindre son maximum en été.

Par contre F. G. SANDRET (105) remarque que l'époque de la récolte n'influence ni le rendement en huile essentielle ni la teneur en 1,8-cinéole dans l'huile essentielle des feuilles adultes d'*Eucalyptus globulus* du Maroc.

Des travaux réalisés sur les variétés de Madagascar permettent d'observer deux maxima pour les rendements en huiles essentielles des *Eucalyptus eugenoides* et *obtusiflora* décalés de six mois, le premier entre janvier et février correspond à l'été austral ; le second, se situe en août, à la fin de l'hiver austral (131).

Pour les espèces, *Eucalyptus elata*, *Eucalyptus maculata* et *Eucalyptus rudis*, un seul maximum a été observé entre les mois de novembre et janvier. Cette période correspond à la fin du printemps et au début de l'été austral.

En outre, il a été démontré, en utilisant la méthode de GAUSSEN (132), que le rendement de ces espèces était davantage lié à la pluviométrie qu'à la température

I. P. TEMOFEEV a constaté que le rendement en huiles essentielles d'une vingtaine d'*Eucalyptus* du Caucase augmente pendant les mois d'été et diminue en Hiver, la teneur en 1,8-cinéole évoluant en sens inverse (133).

Les mêmes variations ont été observées par BERRY et coll. (134) sur les feuilles jeunes d'*Eucalyptus cineorifolia* cultivé au Caucase

Les travaux de V. N. VASHIST et C. K. ATAL (135) réalisés sur *Eucalyptus citriodora* de l'Inde résument l'ensemble des influences (maturité des feuilles, période de récolte) précédemment décrites sur les rendements et compositions des huiles essentielles. Ils

ont étudié la variation du rendement en huiles essentielles et du taux de citronellal à divers stades de maturité du matériel végétal en fonction de la saison sur cinq arbres différents.

Les résultats montrent que, d'une part, les optimums des rendements sont atteints quand les feuilles ont 6 mois d'âge et d'autre part, les rendements minima sont atteints pendant les mois d'Eté (juin, juillet), et les valeurs maximales, en saisons plus froides (décembre-février).

Le tableau 6 résume les travaux de certains auteurs dans ce domaine.

Tableau 6 :

Evolution du rendement en fonction de la saison de 13 espèces d'Eucalyptus.

Auteurs et références	Espèces	Pays d'origine	Hiver Eté	
E. GUENTHER (49)	<i>E. globulus</i>	Australie	-	+
BERRY et coll. (134)	<i>E. cineorifolia</i>	Caucase	-	+
I.P. TINMOFEEV et coll. (133)	Vingtaine d' <i>Eucalyptus</i>	Caucase	-	+
M. MIRANDA et coll. (129)	<i>E. citriodora</i>	Cuba	+	-
ABOU- DAHAB (130)	<i>E. camaldulensis</i>	Egypte	-	+
	<i>E. polyanthemes</i>		-	+
K. K. KAPUR, V. N. VACHIT et coll. (135)	<i>E. citriodora</i>	Inde	+	-
B.S. RAZAFINDRAKOTO (131)	<i>E. eugenioïdes</i>	Madagascar	+	+(-)
	<i>E. obtusiflora</i>		+	+(-)
	<i>E. elata</i>		-	+
	<i>E. crebra</i>		-	+
	<i>E. rudis</i>		-	+
	<i>E. maculata</i>		-	+
	<i>E. ABS. 22</i>		-	+
SANDRET (105)	<i>E. globulus</i>	Maroc	+ -	+ -
SQUIB	<i>E. citriodora</i>	Seychelles	+	-

* Les pays sont classés par ordre alphabétique.

Lexique : + = croît, - = décroît, +(-) = croît légèrement et +- = constant

II-1-4-4-4- INFLUENCE DE LA DURÉE D'EXTRACTION

Au cours d'une extraction de longue durée des feuilles d'*Eucalyptus globulus*, la variation du rendement et de la composition chimique tout au long d'une distillation prolongée a été étudiée. On a constaté que la variation du volume en huile essentielle est maximale à 20 min et qu'après 55 min, le pourcentage en 1,8-cinéole diminue rapidement, ce qui correspond à la chute de rendement observée au bout de ce temps et rend possible une distillation industrielle (136).

II-1-4-4-5- INFLUENCE DU LIEU DE RÉCOLTE

Pour BRYANT (1950) (122), avec un même arbre à différents moments et entre arbres de différentes conditions écologiques, il est important de savoir que plusieurs facteurs environnementaux peuvent affecter le rendement et la composition chimique des huiles essentielles.

Des comparaisons doivent être faites entre les arbres et peuplements poussant sous différentes conditions.

Ces différents résultats nous apportent un nouvel éclairage pour aborder l'étude des *Eucalyptus* acclimatés au Bénin.

II-2- *EUCALYPTUS CAMALDULENSIS* DEHN

SYN. *EUCALYPTUS ROSTRATA* SCHLECHT

II-2-1- DESCRIPTION BOTANIQUE

Eucalyptus camaldulensis est un arbre de 15 à 20 m de haut, à fût généralement trapu, branchu près de la base, cylindrique et élevé avec seulement de petites ramilles à faible hauteur. Il possède beaucoup de branches aux extrémités retombantes formant une large couronne ouverte.

Les feuilles alternes sont lancéolées, falciformes, vert glauque et glabres. Les inflorescences en nombreuses petites ombelles de fleurs blanches d'environ 1 cm de diamètre avec des boutons très apiculés au sommet. Les capsules d'environ 5 mm de diamètre s'ouvrant par quatre fentes à la partie supérieure.

Eucalyptus camaldulensis se distingue de l'espèce voisine, *tereticornis*, par l'opercule de ses boutons, le pédicelle de ses fruits généralement plus fin et son feuillage terne.

De tous les *Eucalyptus* expérimentés, l'*Eucalyptus camaldulensis* est l'espèce la mieux adaptée au Bénin. Cet arbre fait partie des espèces qui prospèrent sur les sols médiocres et supportent plusieurs mois de sécheresse (8 mois environ) mais aussi de courtes inondations.

Il existe plusieurs variétés d'*Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Ces variétés ont été distinguées surtout d'après les caractères des boutons : *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. var. *acuminata* (Hook), var. *brevirostris* (F. Muell. ex Mid), var. *obtusa* Blakely, var. *pendula*, var. *subcinera*, var. *camaldulensis* (138).

Planche 3 :



Eucalyptus camaldulensis du Bénin

II-2-2- EMPLOIS

Le premier but des plantations d'*Eucalyptus camaldulensis* est la production de bois de feu et de charbon de bois. Il est également utilisé comme bois d'œuvre sous forme de perches pour les maisons, pour des outils, etc... (138).

A coté de la production de bois, l'*Eucalyptus camaldulensis* joue un rôle protecteur contre le vent. Il a, de plus, une fonction ornementale et on le trouve souvent le long des routes et des artères.

A cause de la forte concurrence racinaire, il est contre indiqué pour les jardins et les champs. La plante consomme beaucoup d'éléments nutritifs et ne convient pas pour la réhabilitation des sols dégradés. Il a un effet allélopathique sur l'inhibition de la germination et de la croissance (DEL MORAL 1969 et AL NAIB 1975) (139, 140).

Les extraits étherés de feuilles sont utilisés dans la parfumerie et la médecine.

Les plantations d'Eucalyptus sont également très prisées des abeilles.

Les feuilles de *camaldulensis* sont aussi utilisées en décocté sucré pour les maux de ventre, la toux et les dysménorrhées.

Les huiles essentielles extraites des feuilles sont utilisées (141) en pneumologie pour traiter la bronchite (catarrhale bactérienne) et en O.R.L. pour les pharyngites, les rhinites, les rhinopharyngites et les toux. Elles sont administrées, seules ou combinées à d'autres huiles, par voie respiratoire ou orale pour la toux. L'huile essentielle de *camaldulensis* est souvent rectifiée avant usage.

II-2-3- HUILE ESSENTIELLE D'*EUCALYPTUS* *CAMALDULENSIS* : TRAVAUX ANTÉRIEURS

Les différents travaux réalisés sur les huiles essentielles ont permis de les regrouper par chémotypes. On distingue 3 types suivants :

II-2-3-1- TYPE À 1,8-CINÉOLE ($\geq 28\%$)

Certaines huiles sont très riches en 1,8-cinéole ($>60\%$), d'autres ont des taux intermédiaires en 1,8-cinéole (40 à 60%) et enfin des taux moyens en 1,8-cinéole (28 à 39%).

Ce type est accompagné d' α -pinène (1 à 15%) sauf pour l'huile marocaine (142a), le limonène inférieur à 7% (exceptée l'huile burundaise 24%) et le p-cymène souvent inférieur à 13% [mis à part quelques unes (143a) 34%, (143b) 35% et (144) 20,5%].

En 1983, SENANAYAKE et coll. (145) ont mis en évidence le 1,8-cinéole (28,6%) comme constituant majoritaire à taux moyen dans l'huile de Sri Lanka accompagné d' α -pinène (14,4%), du limonène (6%) et du p-cymène (13%).

En 1991, dans l'espèce *camaldulensis* de Népal, S. R. ADHIKARY et al. (146) isolent le 1,8-cinéole à un taux élevé variant de 60 à 65%

Dans la même année (1991), BOLAND et al. (92) indiquent, quant à eux, que le 1,8-cinéole est à un taux élevé de 83,75% suivi de globulol (4,40%) et du limonène (3,63%).

Egalement en 1991, S.S. ZRIRA et coll. (143), en étudiant les huiles de l'espèce *camaldulensis* cultivé au Maroc, trouvent selon l'état des feuilles les résultats suivants : feuilles fraîches (143a), 1,8-cinéole (45,0%), p-cymène (33,90%), limonène (3,2%) et l' α -pinène (1,3%) ; feuilles sèches (143b), 1,8-cinéole (49,90%), p-cymène (34,80%) et le limonène (3,20%).

Un an plus tard, en 1992, toujours dans trois échantillons (142a, 142b, 142c) du Maroc, S.S. ZRIRA et coll. (142) trouvent deux composés majeurs, le 1,8-cinéole (52,4 et 72,4%) et l' α -pinène (5,7 ; 7,8 et 25,7%). Un seul échantillon (142b) contient l' α -terpinéol à un taux de 8,40%.

Deux ans après, M. DETHIER et coll. (147) signalent, en 1994, la présence de 1,8-cinéole (43,3%), de limonène (24,2%), de p-cymène (12,8%) et l' α -pinène (10,1%) comme composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* poussant au Burundi.

Toujours en 1994, M. MOUDACHIROU et coll. (148) trouvent dans 2 échantillons d'*Eucalyptus camaldulensis* du Bénin, le 1,8-cinéole (47 à 71%), le limonène (5 à 11%), l' α -pinène (5 à 8%) et le β -pinène (2 à 8%) comme produits principaux.

M. A. AYEDOUN (149) montre, dans un échantillon du Bénin, la présence de 1,8-cinéole avec un taux de 82,5% suivi de limonène 4,5%, le β -pinène étant faible (1,1%).

AZCAN et coll. (144) indiquent de leur côté, en 1995, que le 1,8-cinéole (47%), le p-cymène (20,53%), l' α -pinène (6,9%) et le limonène (3,71%) sont les composés majeurs de l'espèce *camaldulensis* acclimatée en Turquie.

En 1996, BIGNEL et al. (150) ont montré qu'un échantillon d'Australie est composé en majeure partie de 1,8-cinéole (61,9%), d' α -pinène (14,72%) et de limonène (3,64%)

Toujours dans la même année de 1996, BIGNEL et son équipe (151) ont, sur quatre clones cultivés en Australie, observé que le 1,8-cinéole a un taux variant de 29,73 à 66,2%, l' α -pinène varie entre 3,5 et 14,9% et le limonène de 3,12 à 7,27%. Seul le clone (HN1) contient 8,85% de p-cymène, 8,5% de spathulénol et la cryptone (5,87%).

KOUMAGLO, MOUDACHIROU et coll. (152) ont, en 1997, dans un travail effectué sur l'espèce *camaldulensis* du Togo, rapporté que le constituant majeur est le 1,8-cinéole (66,6%), les autres composés comme le limonène (3,5%) et l' α -pinène (2,3%) sont mineurs.

Notons que la cryptone (0,10 et 5,87%) obtenue respectivement à partir de 2 clones (AG1 et HN1) de *camaldulensis* d'Australie n'a été mise en évidence dans aucun autre échantillon de ce type d'*Eucalyptus* par les auteurs précédemment cités.

TABLEAU 7

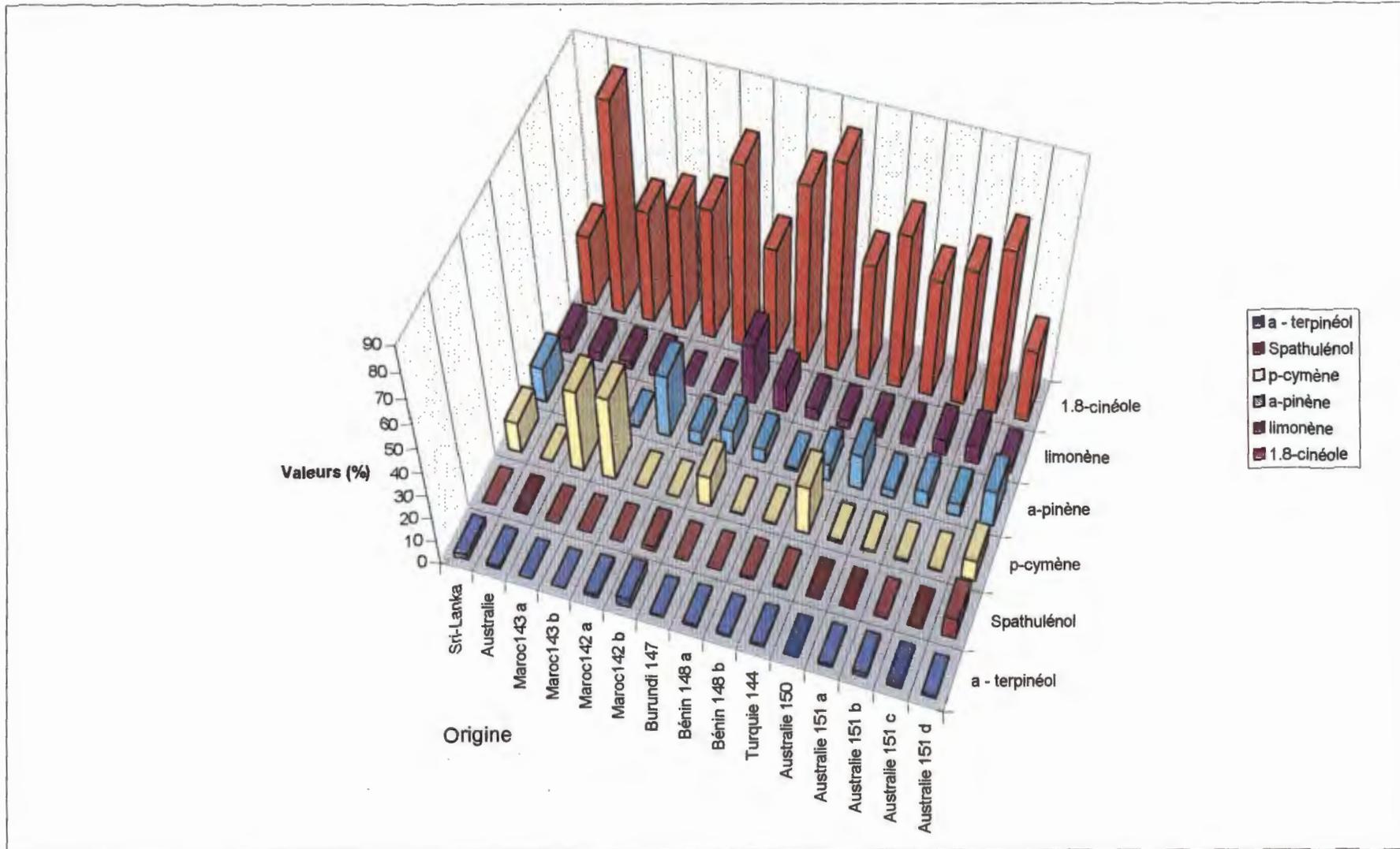
Eucalyptus camaldulensis Dehn., chémotype à cinéole-1,8 (Travaux des auteurs : principaux composés)

Auteurs (Référence) Année	Senanayake (145) 1983	Boland (92) 1991	Zrira (143) 1991	Zrira (142) 1992	Menut (147) 1994	Moudac hirou (148) 1994	Ayedoun (149) 1995	Azcan (144) 1995	Bignel (150) 1996	Bignel (151) 1996					
Origine	Sri-Lanka	Australie	Maroc		Maroc		Burundi	Bénin		Turquie	Australie	Australie		Australie	
Partie distillée	Feuilles	Feuilles (chem. 1)	Feuilles fraîches (143a)	Feuilles sèches (143b)	Feuilles (142a)	Feuilles (142b)	Feuilles	Feuilles		Feuilles	Feuilles	Feuilles ECLA ₁	Feuilles ECLA ₆	Feuilles AG ₁ HN ₁	
α -Pinène	14,4	1,56	1,30	0,70	25,7	5,7	10,1	5,69	1,1	6,90	14,72	3,49	6,92	5,06	14,89
β -Pinène	0,4	0,05	-	-	0,4	0,4	0,1	1,69	-	-	0,21	0,22	0,20	0,37	0,35
Limonène	6,1	3,63	3,20	3,50	-	-	24,2	11,24	4,5	3,71	3,56	3,64	6,25	7,27	3,12
Cinéole-1,8	28,6	83,75	45,00	49,90	52,4	72,4	43,3	71,14	82,5	46,99	61,89	47,85	54,98	66,19	29,73
p-Cymène	12,9	0,18	33,90	34,80	-	-	12,8	0,52	0,5	20,53	0,67	0,32	0,76	0,28	8,85
α -Terpinéol	2,3	1,36	-	-	1,4	3,8	0,5	0,97	0,9	0,90 ^b	-	1,02	1,74	1,06	0,73
Terpinène-4-ol	1,3	1,39 ^a	0,30 ^a	0,10 ^a	0,1	2,8	1,2	0,33	0,2	2,08	3,27 ^a	-	1,21	0,68	2,57
Cryptone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10	5,87
Globulol	6,5	4,40	-	-	0,4	0,7	0,2	1,23	5,2	0,17	-	5,03	3,27	0,57	3,59
Spathuléol	-	0,27	0,10	0,10	-	1,8	0,1	-	0,9	0,85	-	0,16	0,20	0,07	8,52

a : et aromadendrène

b : et acétate de terpinyle

Graphe 1 : *Eucalyptus camaldulensis* Dehn., chémotype à cinéole -1.8 (Travaux des auteurs : principaux composés)



II-2-3-2- TYPE À P-CYMÈNE

Ce type, décrit par plusieurs auteurs, se localise en différent lieux. Ainsi :

En 1986, T. NDOU et R. VON WANDREUSZKA (153) ont signalé que, dans l'*Eucalyptus camaldulensis* de l'Afrique du sud, le p-cymène (48,3%), l' α -pinène (10,85%) et l'aromadendrene (9,9%) sont les composés majoritaires.

Dans la même espèce cultivée en Uruguay, E. DELLACASSA et coll. (154) trouvent, en 1990, le p-cymène (30,8%), le spathuléol (15,3%) et la cryptone (12,5%). Les autres constituants ont chacun un taux inférieur à 5,0%.

M. DETHIER et coll. (147) signalent, en 1994, dans leur travail effectué sur l'*Eucalyptus camaldulensis* du Burundi, la présence de p-cymène (20%) voisinant avec le spathuléol (22%).

Deux ans plus tard, en 1996, BIGNEL et coll. (150), sur l'espèce *camaldulensis* var *camaldulensis* d'Australie, mettent en évidence le p-cymène (21,88%) comme composé dominant suivi du spathuléol (16,54%), de la cryptone (14%) et d' α -pinène (4%).

Tableau 8 :

Eucalyptus camaldulensis Dehnh., chémotype à p-cymène
(Travaux des auteurs: principaux composés)

Auteurs (Référence) Année	Thilohali (153) 1985	Dellacassa (154) 1990	Bignel (150) 1996
Origine	Afrique du Sud	Uruguay	Australie
Partie distillée	Feuilles	Feuilles	Feuilles var <i>camaldulensis</i>
α-Pinène	8,9	1,5	3,99
β -Pinène	-	-	0,15
Limonène	-	1,2	0,80
Cinéole-1,8	-	1,5	-
p-Cymène	48,3	30,8	21,88
α -Terpinéol	-	-	0,30
Terpinène-4-ol	-	4,1	3,79 ^a
Cryptone	-	-	14,06
Globulol	-	-	0,62
Spathuléol	-	15,3	16,54

a : et aromadendrene

I-2-3-3- TYPE À SPATHULÉNOL

Le spathuléol a été mis en évidence dans deux échantillons d'huiles essentielles d'origine australienne (92, 151) avec un pourcentage de 18 à 29% par BOLAND (92) en 1991 et BIGNEL (151) en 1996.

A part ce constituant, ces deux échantillons sont, du point de vue chimique, différents.

BOLAND (92) a trouvé dans son échantillon l' α -pinène (10,60%) et le bicyclogermacrène (14,30%) contre respectivement 0,07 et 1,20% trouvé par BIGNEL (151). Ce dernier a déterminé dans son échantillon le p-cymène (12,36%) qui est de 0,02% pour l'autre. Quant au cryptone, seul BIGNEL (151) l'a trouvé dans son échantillon à un taux de 9,81%.

Tableau 9

Eucalyptus camaldulensis Dehn., chémotype à spathuléol
(Travaux des auteurs: principaux composés)

Auteurs (Référence)	Boland (92)	Bignel (151)
Année	1991	1996
Origine	Australie	Australie
Partie distillée	Feuilles (Chem. 2)	Feuilles Var <i>camaldulensis</i> SW ₁
α -Pinène	2,20	0,96
β -Pinène	10,60	0,07
Limonène	2,07	1,50
Cinéole-1,8	4,70	4,61
p-Cymène	0,02	12,36
α -Terpinéol	0,72	0,85
Terpinène-4-ol	0,11	3,05
Cryptone	-	9,81
Globulol	9,70	1,37
Spathuléol	18,30	28,97
Bicyclogermacrène	14,30	1,20

II-3-HUILES ESSENTIELLES D'*EUCALYPTUS* *CAMALDULENSIS* DU BÉNIN : NOS TRAVAUX

C'est l'espèce la mieux adaptée au Bénin et représente la grande majorité des plantations béninoises dans le projet dit «plantation bois de feu ».

II-3-1- TENEUR EN HUILES ESSENTIELLES

Pour cette huile, plusieurs plantations situées sur divers sites ont été étudiées. Il s'agit des sites de :

- Sèmè, Cotonou, Pahou, Calavi dans la région méridionale
- Bohicon dans la région centrale
- Parakou, Banikoara et Malanville dans la région septentrionale

Les rendements en huiles essentielles obtenus à partir des feuilles adultes séchées d'*E. camaldulensis* varient selon le site de 0,59 à 1,82% (tableau 10).

L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* peut être obtenue tout au long de l'année avec un rendement moyen de 1,07% sur le site de Sèmè. Les sites de Calavi et de Pahou donnent des rendements moyens respectifs de 1,03% et 0,88%. Les autres rendements sont de 0,62% pour le plus faible à Banikoara et 0,95% pour le plus fort à Bohicon à l'intérieur du pays.

Ces variations de rendements dépendent de certains facteurs.

Tableau 10:Variation du rendement d'*Eucalyptus camaldulensis* du Bénin

Sites de récolte	Nombre de récoltes	Rendements en pourcentage		
		Minima	Maxima	Moyennes
Sèmè	12	0,76	1,63	1,07
Pahou	06	0,59	1,26	0,88
Calavi	12	0,66	1,82	1,03

II-3-2- INFLUENCE DE LA PÉRIODE ET DU LIEU DE RÉCOLTE SUR LE RENDEMENT

Le tableau 11 présente les rendements en huiles essentielles, d'*E. camaldulensis*, sur 12 mois entre octobre 1995 et septembre 1996 et sur les sites de Sèmè et Calavi.

Nous obtenons des rendements minima de 0,62% (mai 1996) et 0,7% (août 1996) et maxima de 1,82% (mars 1996) et 1,63% (avril 1996) respectivement à Calavi et Sèmè. Le site de Calavi donne donc lieu à une huile essentielle avec un rendement élevé par rapport au site de Sèmè.

De plus, une période de hauts rendements s'établit de janvier à mars pour le site de Calavi, ce qui correspond à la grande saison sèche. Par contre, c'est d'avril à juin, pendant la grande saison des pluies, que l'on retrouve le même phénomène sur le site de Sèmè.

Cependant les résultats sur les deux sites concordent pendant la petite saison des pluies (octobre et novembre) puisqu'ils donnent tous les deux des rendements plus ou moins élevés différents (1,16 et 1,61% pour Calavi ; 1,16 et 1,28% pour Sèmè) pendant cette période (Graphe 2).

Sans être affirmatif sur l'influence du sol, nous pouvons dire que les deux sites ne sont pas identiques sur cet aspect. Le site de Sèmè se trouve dans la zone côtière bordant le Golfe de Guinée avec un sol sablonneux caractéristique. Ce sol est reconnu pour sa capacité de rétention d'eau des précipitations. Par contre le site de Calavi a un sol latéritique. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la part du sol dans la variation du rendement en huile essentielle de cette plante.

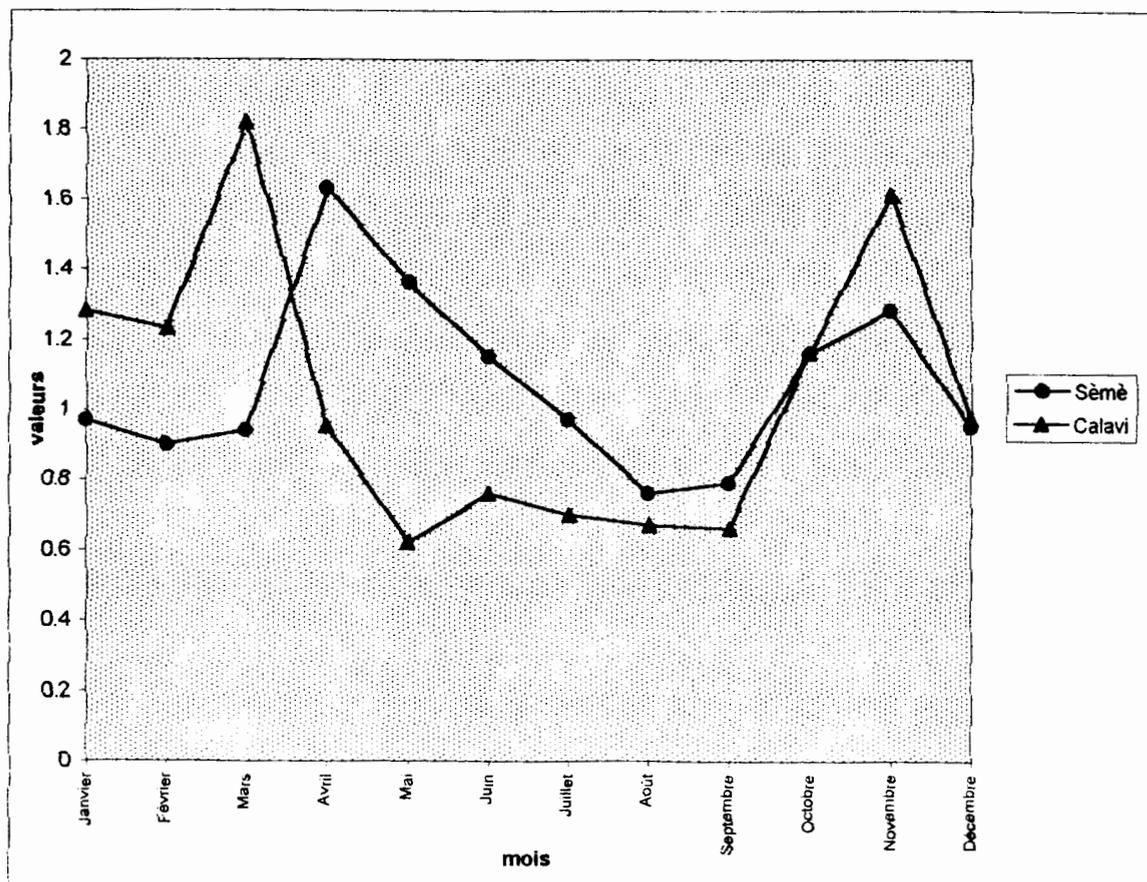
Tableau 11 :

Evolution du rendement en huile essentielle d'*E. camaldulensis* sur 12 mois entre octobre 1995 et septembre 1996 à Calavi et Sèmè

Sites de récolte	Mois de récolte											
	Jan	Fév	Mars	Avr	Mai	Juin	Juill	Août	Sept	Oct	Nov	Déc
Calavi	1,28	1,23	1,82	0,95	0,62	0,76	0,70	0,67	0,66	1,16	1,61	0,97
Sèmè	0,97	0,90	0,94	1,63	1,36	1,15	0,97	0,76	0,79	1,16	1,28	0,95

Graphe 2 :

Courbes de variation des rendements en huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* du Bénin : sites de Calavi et de Sèmè.



II-3-3- COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE D'*EUCALYPTUS CAMALDULENSIS* DU BENIN

Nous avons étudié la composition chimique de l'huile essentielle de 40 échantillons de parties aériennes d'*E. camaldulensis* entre 1995 et 1996.

II-3-3-1- MATÉRIEL VÉGÉTAL

Sur les 40 échantillons récoltés, 12 proviennent du site de Sèmè, 06 du site de Cotonou, 06 du site de Pahou, 12 du site de Calavi et 1 échantillon par site pour Bohicon, Parakou, Banikoara et Malanville.

Les détails sont donnés dans la partie expérimentale.

II-3-3-2- RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les figures : 9, 10, 11 et 12 donnent les chromatogrammes et les impacts électroniques des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* du Bénin. 76 composés ont été identifiés (tableau 12) tout échantillon et tout site confondus.

Les produits caractéristiques sont les suivants : 1,8-cinéole (9,24 à 72,5%), γ -terpinène (en trace jusqu'à 38,10%), p-cymène (1,08 à 25,0%), α -pinène (0,6 à 12,97%), β -pinène (0,09 à 28,11%), limonène (1,16 à 14,16%).

Il existe d'autres constituants non négligeables comme terpinèn-4-ol, α -terpinéol, cryptone, globulol, spathuléol, phellandral et oxyde de trans humulène.

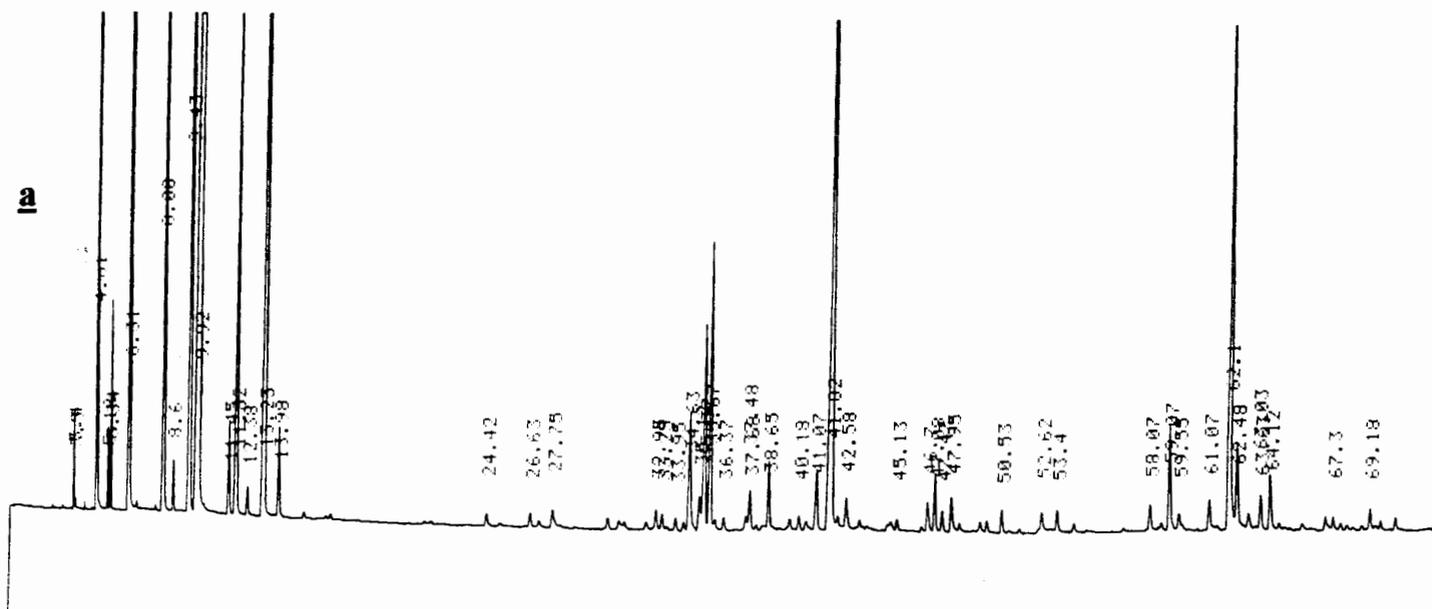
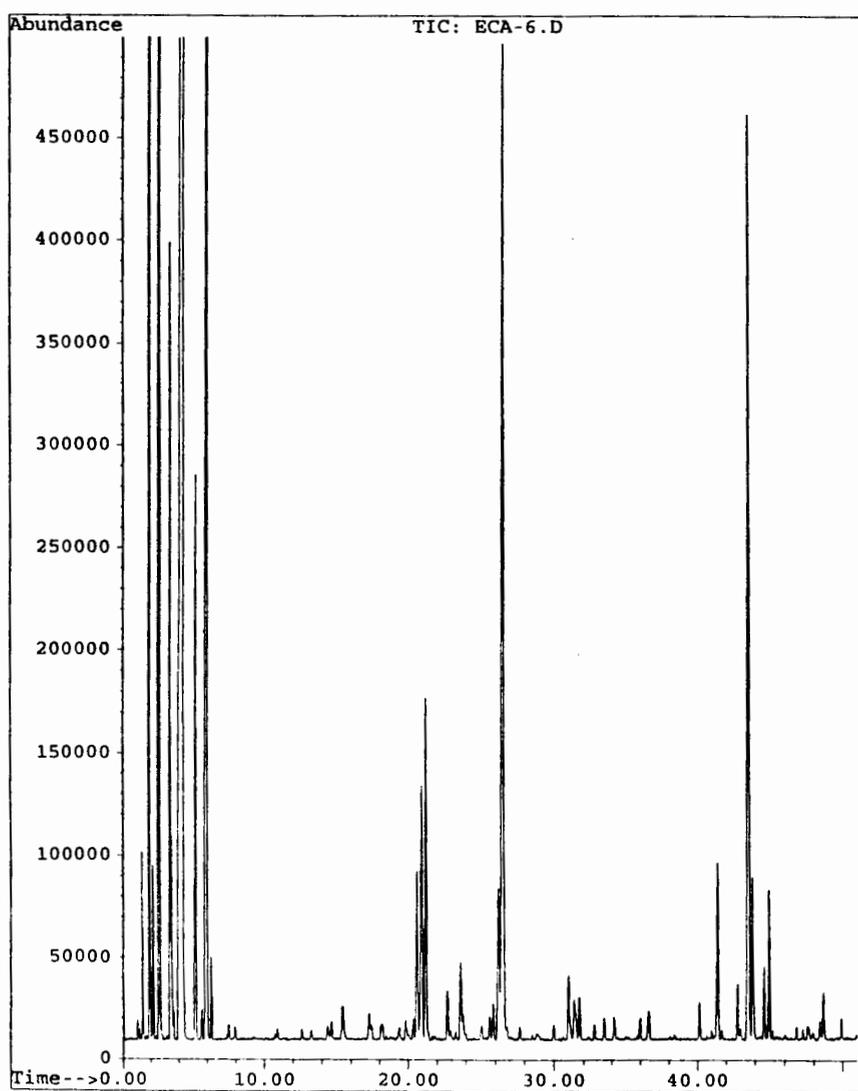
Figure 9 :**a- Chromatogramme de l'huile essentielle d'*E camaldulensis* de Calavi****b- Impact électronique de l'huile essentielle de *E camaldulensis* de Calavi obtenu par couplage CPG/SM****b**

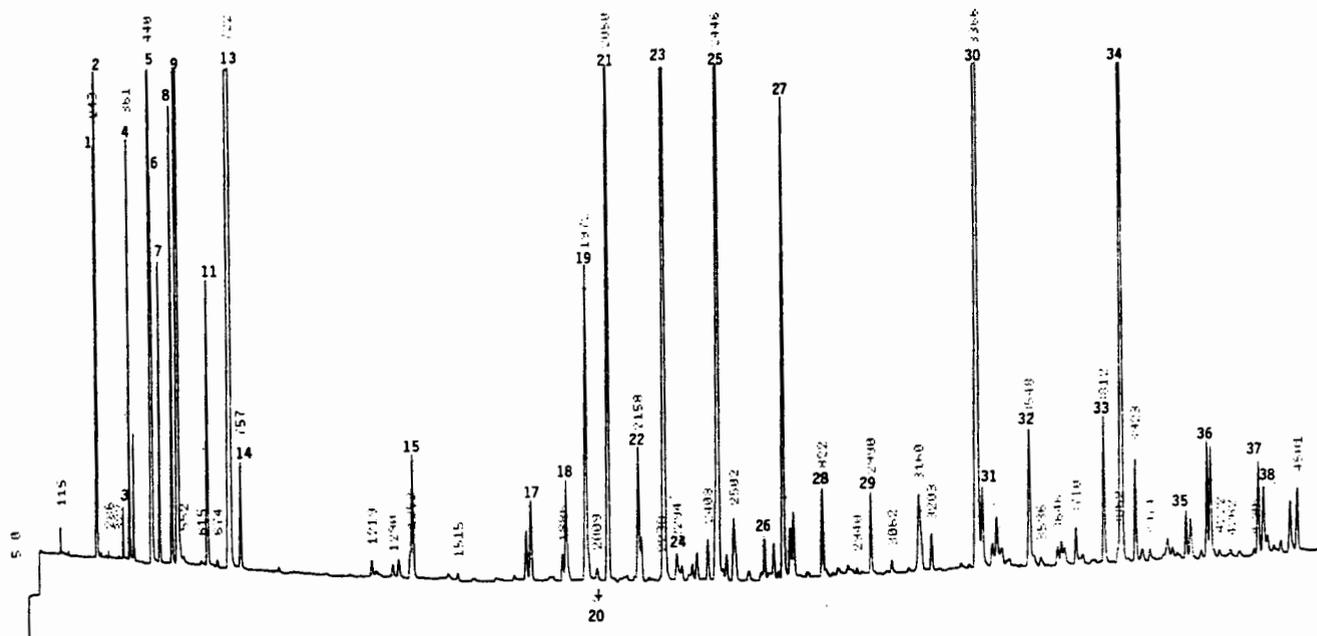
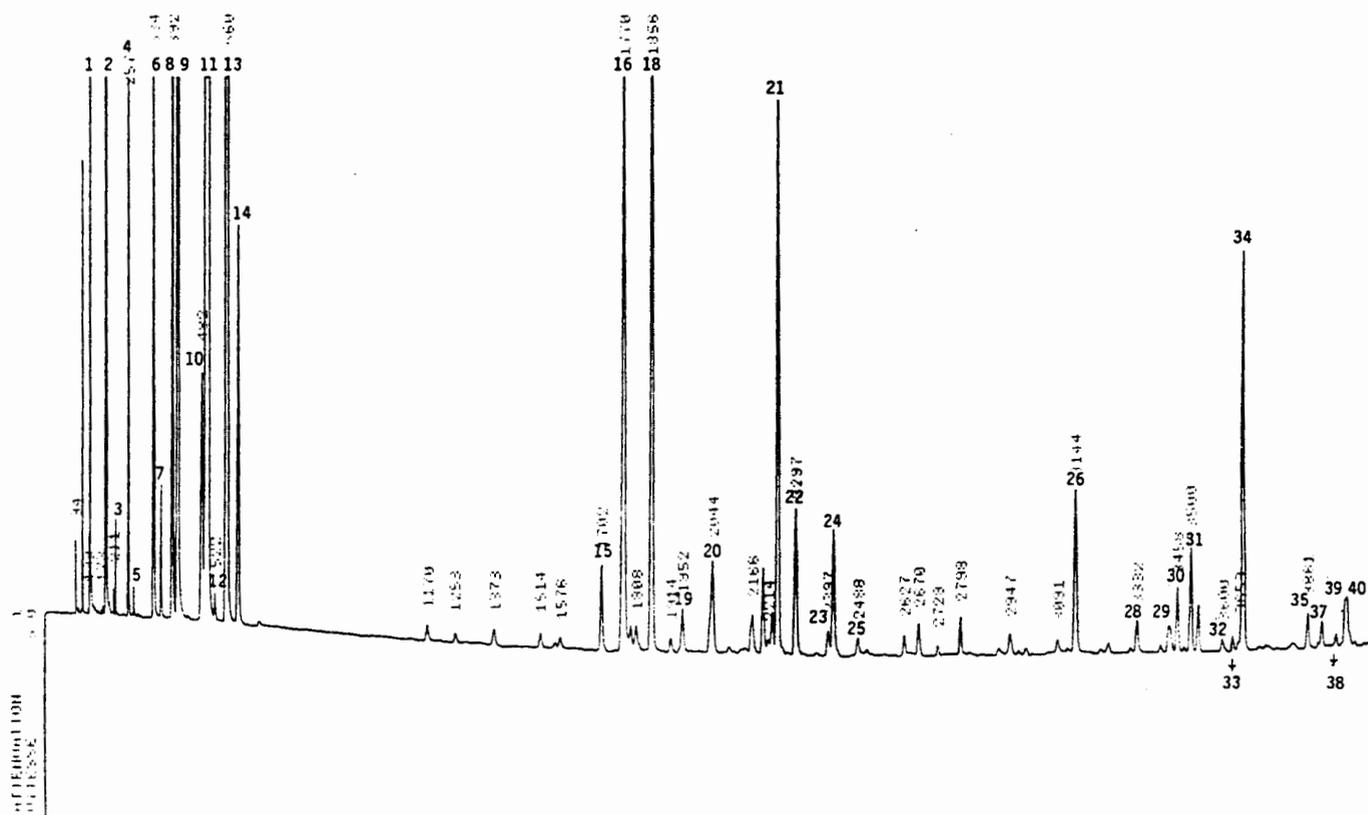
Figure 10 :Chromatogramme de l'huile essentielle d'*E.camaldulendis* de Bohicon**Figure 11 :**Chromatogramme de l'huile essentielle d'*E.camaldulendis* de Pahou

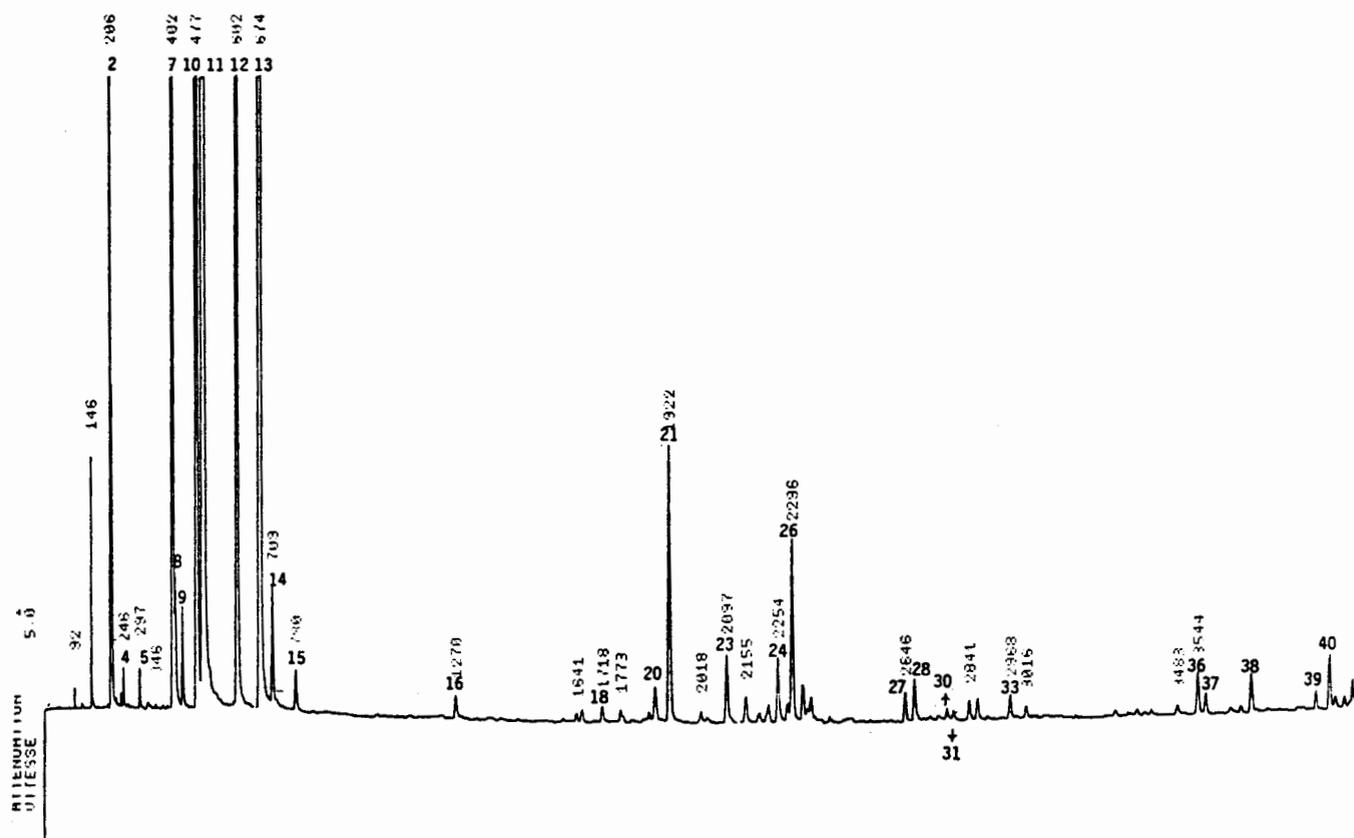
Figure 12 :Chromatogramme de l'huile essentielle d'*E.camaldulensis* de Cotonou

Tableau 12 :Composés chimiques (76) identifiés dans les huiles d'*E. camaldulensis* du Bénin

- 3-méthylbutanol	- β -caryophyllène	- oxyde de trans- caryophyllène
- 2-méthylbutanal	- aromadendrène	- para-mentha-1, 5-dièn-7-ol
- α -pinène	- terpinèn-4-ol	- oxyde d'humulène
- α -thujène	- alloaramadendrène	- longipinanol
- camphène	- cryptone	- cubénol
- isobutirate d'isobutyle	- carvotanacétone	- lédol
- β -pinène	- trans-pinocarvéol	- élémol
- sabinène	- α -humulène	- épïcubénol
- α -phellandrène	- γ -cardinène	- épiglobulol
- myrcène	- δ - cardinène	- globulol
- α -terpinène	- bornéol	- cuminol
- limonène	- cardin-1,4-diène	- viridiflorol
- 1,8-cinéole	- α -terpinéol	- α -eudesmol
- (Z)- β -ocimène	- germacrène-D	- γ -eudsmol
- γ -terpinène	- myrténol	- spathuléol
- (E)- β -ocimène	- trans-p-menth-1(7),8-dièn-2-ol	- trans-cardinol
- paracymène	- oxyde de phellandrène	- thymol
- terpinolène	- phellandral	- cavacrol
- isovalérate d'isoamyle	- bicyclogermacrène	- trans-muurolol
- paracyménène	- trans-carvéol	- isospathuléol
- camphre	- cuminaldéhyde	- β -eudesmol
- carvénone	- acétate de sabinyle	- α -cardinol
- pinocavone	- paracymèn- 8-ol	- isobicyclogermacrénal
- linalol	- cis-carvéol	- lépidozénal
- fenchol	- cis-p-menth-1(7), 8-dièn-2-ol	
- trans-p-menth-2-èn-1-ol	- oxyde de trans-humulène	

La composition chimique des huiles essentielles d'*E.camaldulensis* varie d'un site à un autre. Il ressort que plusieurs chémotypes peuvent être distingués au sein de cette espèce acclimatée au Bénin.

II-3-3-2-1- CHÉMOTYPE À 1,8-CINÉOLE

Les sites de Sèmè et Calavi sont caractérisés par une dominance en 1,8-cinéole (tableaux 13a et 14a).

A Calavi, son taux varie entre 32,02% en août à 71,43% en mars. Les autres composés étant l' α et le β -pinène (10,71 et 10,16%) dans le premier cas et le limonène (5,72%) suivi du globulol (3,3%) dans le deuxième cas (tableau 13b, graphe 3).

A Sèmè le taux en 1,8-cinéole est plus homogène sur les 12 mois puisqu'il se maintient autour de 70%. Les composés secondaires sont encore le limonène avec un taux allant ici jusqu'à 11%, les α et β -pinènes (5,6 et 2,55%) et le globulol (2%) en moyenne. (tableau 14b, graphe 4).

Les baisses des taux de 1,8-cinéole semblent se compenser par une augmentation des taux en limonène et α -terpinéol, ce qui confirme la transformation déjà signalée (156) du 1,8-cinéole à ces deux composés.

II-3-3-2-2- CHÉMOTYPE À P-CYMÈNE

Nous avons relevé ce chémotype sur les sites de Bohicon, Parakou, Banikoara et Malanville, c'est-à-dire de la région centrale à la région septentrionale. Les taux de composé varient de 19,5% à 25%. Il est suivi du 1,8-cinéole (10 à 16,3%) de l'oxyde de trans-humulène (7,6 à 13,6%), du phellandral (4 à 6%), de la cryptone (6 à 7%), du terpinèn-4-ol (4 à 6%) et du spathuléol (4 à 8%). A ces composés s'ajoutent l' α -phellandrène, le myrcène ou le β -caryophyllène selon le site.

38 constituants chimiques ont été identifiés dans l'ensemble de ces échantillons. On remarque une homogénéité dans la composition chimique des huiles essentielles de ces localités (tableaux 15a et 15b, graphe 5).

II-3-3-2-3- CHÉMOTYPE À γ -TERPINÈNE

Le site de Pahou donne lieu à une huile essentielle d'*E. camaldulensis* se caractérisant sur les six mois d'études par le taux le plus élevé de γ -terpinène (26 à 38%). Sur les 6 échantillons analysés, 40 constituants chimiques ont été identifiés ; il est à remarquer qu'il existe très peu de fluctuation dans les pourcentages des composés majoritaires de ce chémotype (tableaux 16a et 16b, graphe 6).

En effet si le taux le plus bas de γ -terpinène est de 26%, les autres chiffres sont autour de 34%. Les autres composés majoritaires sont : α -pinène (\approx 12%), α -phellandrène (2 à 6,5%), 1,8-cinéole (9,2 à 12,6%), p-cymène (11,3 à 15,2%) et terpinèn-4-ol (3 à 4,4%).

Tableau 13a:composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* : site de Calavi

COMPOSÉS IDENTIFIÉS	MOIS DE RÉCOLTE											
	Janv	Fév	Mars	Avri	Mai	Juin	Juill	Août	Sept	Oct	Nov	Déc
1- α -pinène	2,83	2,53	2,23	8,83	12,9	6,87	4,82	10,8	11,8	2,35	5,55	5,0
2-camphène	0,11	0,2	0,03	0,38	0,28	0,20	0,10	0,26	0,27	0,1	0,29	0,20
3- β -pinène	0,51	0,7	0,35	7,61	16,5	6,10	4,60	10,2	13,3	0,53	4,0	5,35
4- α -phellandène	0,35	0,53	0,17	1,18	3,61	1,75	2,31	6,8	5,21	0,44	0,85	1,85
5-limonène	5,38	5,07	5,72	5,92	4,73	5,10	4,27	6,74	5,74	5,18	5,81	5,95
6-1,8-cinéole	70,4	69,3	71,4	53,7	32,5	50,8	48	31,0	31,3	70,8	62,5	50,9
7- γ -terpinène	0,26	0,32	0,22	0,85	2,18	2,49	2,81	4,92	3,62	0,29	0,58	2,47
8-p-cymène	0,37	0,4	0,35	0,42	8,65	8,12	7,6	8,93	8,75	0,36	0,41	8,21
9-fenchol	0,16	0,08	0,25	0,42	0,66	0,42	0,26	0,55	0,60	0,20	0,25	0,41
10-aromadendrène	2,61	3,07	2,15	1,24	1,66	0,92	0,22	1,05	1,35	2,36	2,15	1,08
11-terpinèn-4-ol	0,51	0,62	0,41	0,99	1,28	1,22	1,17	1,18	1,23	0,57	0,76	1,07
12-alloaromadendrène	0,53	0,63	0,44	0,24	0,2	0,17	0,14	0,45	0,32	0,59	0,43	1,9
13-trans-pinocarvéol	0,12	0,07	0,16	0,26	0,3	0,3	0,31	0,50	0,40	0,1	0,17	0,28
14- α -terpinéol	2,34	1,6	3,08	4,53	6,12	4,08	1,96	3,36	4,75	2,01	3,10	4,30
15-élémol	0,15	0,20	0,10	0,01	0,12	0,1	0,06	0,34	0,23	0,17	0,15	0,06
16-épiglogulol	0,94	1,01	0,86	0,48	0,51	0,25	tr	0,22	0,36	1,05	0,75	0,35
17-globulol	4,84	5,40	4,28	2,83	3,17	8,53	13,9	1,07	2,12	5,16	4,12	6,74
18-iridiflorol	0,82	1	0,74	0,17	0,48	0,32	0,17	0,96	0,63	0,91	0,58	0,24

Tableau 13 b: Composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*:
Site de Calavi

	α -pinène	β -pinène	limonène	α - terpinéol	globulol	1,8-cinéole
Janvier	2.83	0.51	5.38	2.34	4.84	70.4
Février	2.53	0.7	5.07	1.6	5.4	69.3
Mars	2.23	0.35	5.72	3.08	4.28	71.4
Avril	8.83	7.61	5.92	4.53	2.83	53.7
Mai	12.9	16.5	4.73	6.12	3.17	32.5
Juin	6.87	6.1	5.1	4.08	8.53	50.8
Juillet	4.82	4.6	4.27	1.96	13.9	48
Août	10.8	10.2	6.74	3.36	1.07	31
Sept	11.8	13.3	5.74	4.75	2.12	31.3
Oct	2.35	0.53	5.18	2.01	5.16	70.8
Nov	5.55	4	5.81	3.1	4.12	62.5
Déc	5	5.35	5.95	4.3	6.74	50.9

Graphe 3 : Histogramme des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* :Site de Calavi

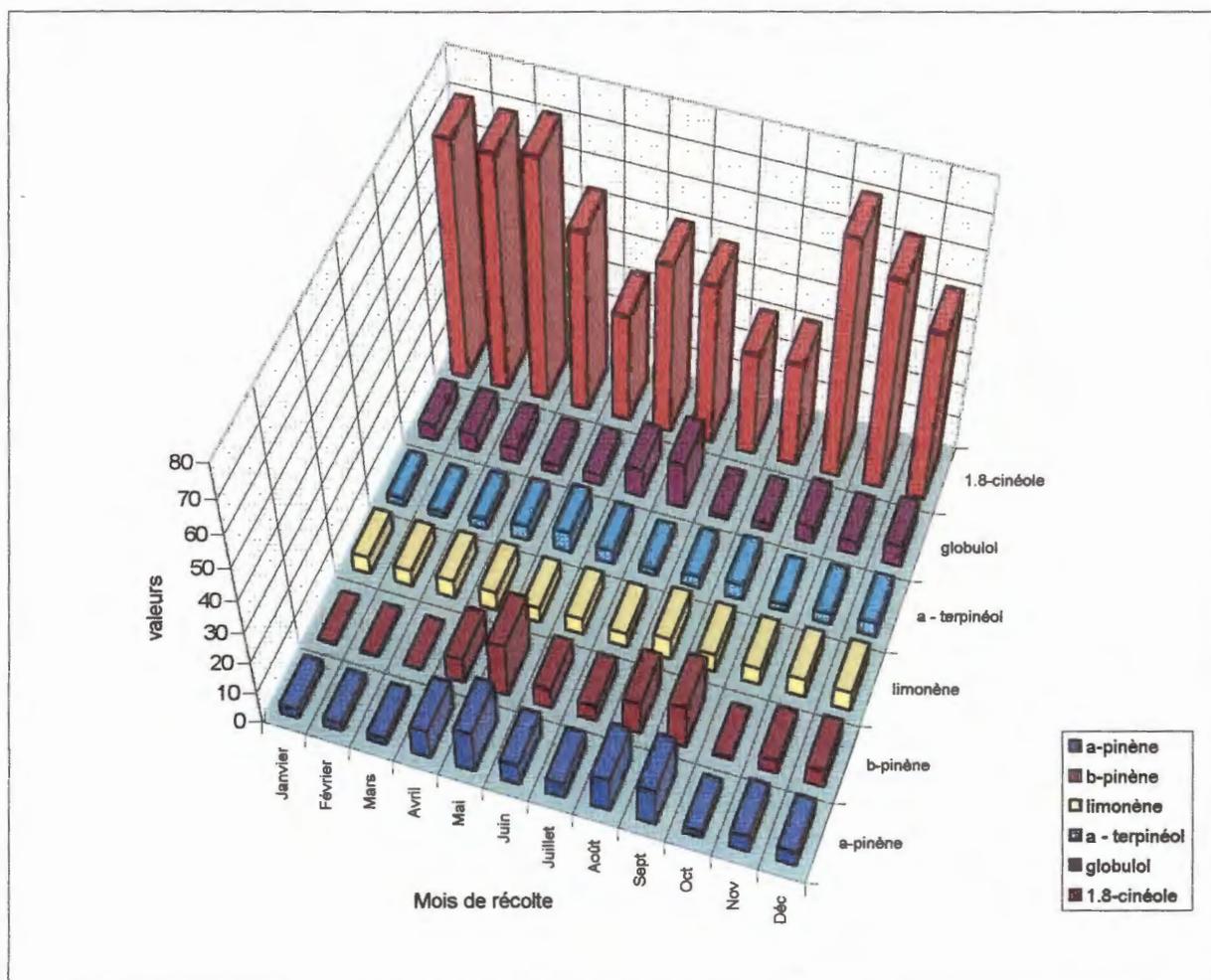


Tableau 14a:
composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* :
site de Sèmè

COMPOSÉS IDENTIFIÉS	MOIS DE RECOLTE											
	Janv	Fév	Mar	Avri	Mai	Juin	Juill	Aoû	Sep	Oct	Nov	Déc
1- α -pinène	5,53	7,24	6,15	4,30	5,38	4,6	5,35	4,82	5,20	5,53	5,27	5,72
2-camphène	0,11	0,15	0,13	0,09	0,06	0,07	0,09	tr	0,10	0,8	tr	0,1
3- β -pinène	4,11	5,24	3,1	1,61	0,98	1,02	1,15	0,89	0,9	1,51	2,51	5,25
4- α -phellandrène	0,22	0,24	0,2	0,26	0,39	0,38	0,40	0,21	0,30	0,39	0,26	0,23
5-limonène	7,31	5,14	5,41	7,56	11,5	12,8	13,8	12,7	11,4	9,61	9,71	8,52
6-1,8-cinéole	69,8	69	69,2	72,5	72,0	71,8	71,6	70,0	70,4	71,7	70,4	70,0
7- γ -terpinène	0,32	0,34	0,3	0,37	0,38	0,39	0,44	0,38	0,41	0,42	0,40	0,39
8-p-cymène	0,64	0,68	0,6	0,72	0,55	0,65	0,76	0,70	0,73	0,70	0,71	0,69
9-fenchol	0,25	0,21	0,3	0,27	0,08	0,07	0,06	0,15	0,10	0,07	0,12	0,14
10-aromadendrène	1,63	0,89	0,75	1,43	0,40	0,36	0,32	0,63	1,24	1,33	1,42	1,57
11-terpinèn-4-ol	0,38	0,4	0,36	0,41	0,56	0,45	0,34	0,36	0,35	0,39	0,37	0,40
12-alloaromadendrène	0,85	0,89	0,75	0,35	0,19	0,16	0,13	0,17	0,15	0,15	0,18	0,16
13-trans-pinocarvéol	0,55	0,59	0,64	0,45	0,38	0,30	0,22	0,36	0,28	0,26	0,32	0,35
14- α -terpinéol	1,17	0,73	0,44	1,90	1,73	1,25	0,80	1,3	1,40	1,93	1,32	1,37
15-élémol	0,09	0,1	0,10	0,08	0,00	tr	0,00	0,04	0,06	tr	0,07	0,05
16-épiglogulol	0,45	0,45	0,44	0,46	0,19	0,47	0,74	0,60	0,67	0,55	0,63	0,58
17-globulol	2,43	2,5	2,6	2,29	0,99	0,68	0,32	2,5	2,60	2,57	2,18	2,81
18-iridiflorol	0,43	0,44	0,45	0,42	0,06	0,08	0,07	0,25	0,16	0,09	0,20	0,26

Tableau 14 b : Composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*: site de Sèmè

	α -pinène	β -pinène	α -terpinéol	globulol	limonène	1.8-cinéol
Janvier	5.53	4.11	1.17	2.43	7.31	69.8
Février	7.24	5.24	0.73	2.5	5.14	69
Mars	6.15	3.1	0.44	2.6	5.41	69.2
Avril	4.3	1.61	1.9	2.29	7.56	72.5
Mai	5.38	0.98	1.73	0.99	11.55	72
Juin	4.6	1.02	1.25	0.68	12.8	71.8
Juillet	5.35	1.15	0.8	0.32	13.6	71.6
Août	4.82	0.89	1.3	2.5	12.7	70
Septemb	5.2	0.9	1.4	2.6	11.8	70.4
Octobre	5.53	1.51	1.93	2.57	9.51	71.7
Novemt	5.27	2.51	1.32	2.18	9.71	70.4
Décembt	5.72	5.25	1.37	2.81	8.52	70

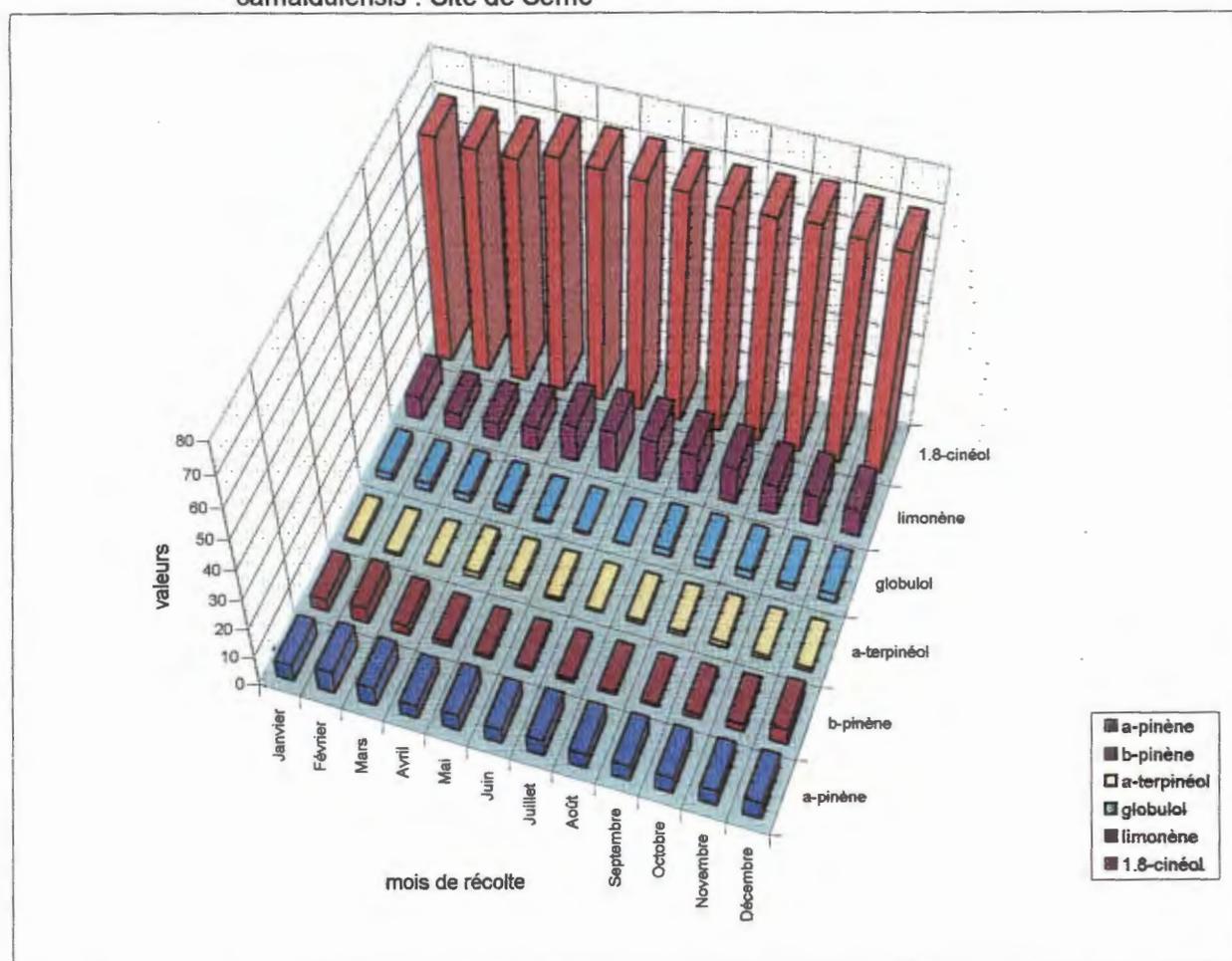
Graphe 4 : Histogramme des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* : Site de Sèmè

Tableau 15a :

Composition chimique des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* des localités de Bohicon, Parakou, Banikoara et Malanville (décembre 199)

COMPOSES CHIMIQUES	LIEUX DE RECOLTE			
	Bohicon	Parakou	Banikoara	Malanville
1- α -pinène	0,6	1,7	2,2	3,04
2- α -thujène	1,8	-	-	-
3- β -pinène	0,1	00,8	0,09	0,09
4-sabinène	0,9	0,6	0,5	0,8
5- α -phellandrène	3,7	-	-	6,2
6-myrcène	0,9	2,5	6,8	0,8
7- α -terpinène	0,8	0,4	0,9	-
8-limonène	1,4	1,16	1,5	1,5
9-1,8-cinéole	13,1	10,1	16,7	16,3
10-(Z)- β -ocimène	tr	0,09	0,12	0,08
11- γ -terpinène	-	0,8	1,4	1,2
12-(E)- β -ocimène	tr	0,1	0,1	0,09
13-p-cymène	25,0	19,5	23,8	24,9
14-terpinolène	0,4	0,25	0,5	0,4
15-p-cyménène	0,6	0,3	0,9	0,6
16-camphre	tr	0,05	tr	tr
17-carvénone	0,4	0,15	0,3	0,26
18-fenchol	0,1	0,6	tr	0,5
19-trans-p-menth-2-èn-1-ol	0,6	0,5	0,4	0,3
20- β -caryophyllène	1,9	3,3	1,8	2,04
21-terpinèn-4-ol	3,6	4,5	4,9	4,03
22-alloaromadendrène	0,8	0,9	0,7	0,7
23-cryptone	6,6	6,1	7,3	5,8
24-carvotanacétone	0,1	2,4	1,9	1,1
25-phellandral	5,7	4,5	5,2	4,1
26-bicyclogermacrène	0,2	0,1	tr	0,05

27-Cuminaldéhyde	2,6	2,6	2,6	2,3
28acétate de sabinyle	0,4	0,17	0,4	0,2
29-p-cymèn-8-ol	0,4	0,5	0,5	0,4
30-oxyde de trans-humulène	8,8	13,75	5,6	7,6
31-p-mentha-1,5-dièn-ol	0,2	0,25	0,2	0,2
32-oxyde d'humulène	0,8	1,2	0,5	0,7
33-cuminol	0,7	0,7	0,6	0,5
34-spathuléol	5,5	7,9	3,8	4,6
35-thymol	0,2	0,3	0,4	0,3
36-carvacrol	-	0,5	0,5	0,3
37-isobicyclgermacréol	0,5	0,4	0,3	0,3
38-lépidozénal	0,4	0,4	0,2	0,27
RENDEMENTS (%)	0,95	0,70	0,62	0,66

Spectre de masse de lepidozénal

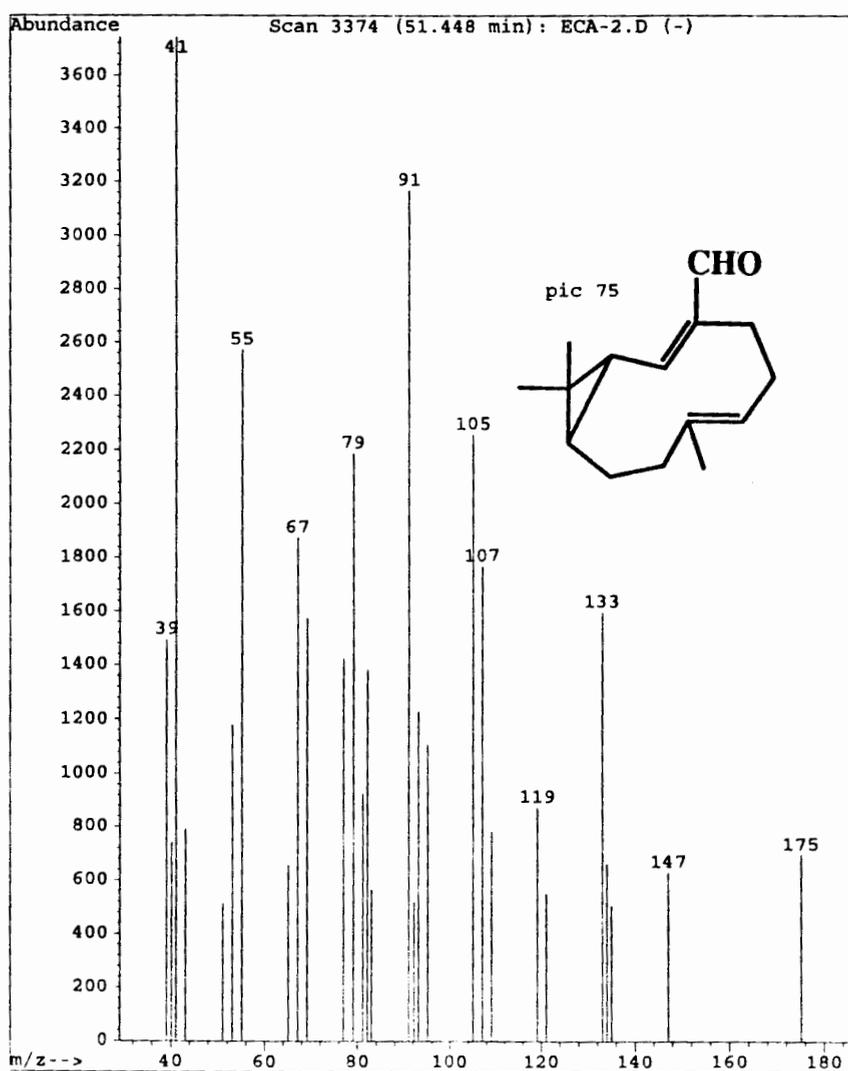


Tableau 15 b : Composés majoritaires des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* des localités de Bohicon , Parakou, Banikoara et Malanville (Décembre 1996)

	terpinèn-4-ol	phellandral	spathulénoï	cryptone	ox.de trans hum.	1.8-cinéol	p-cymène
Bohicon	3.6	5.7	5.5	6.0	8.8	13.1	25
Parakou	4.5	4.5	7.9	6.1	13.75	10.1	19.5
Banikoara	4.9	5.2	3.8	7.3	5.6	16.7	23.8
Malanvii	4.03	4.1	4.6	5.8	7.6	16.3	24.9

Graphe 5 : Histogramme des composés majoritaires des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* des localités de Bohicon , Parakou, Banikoara et Malanville (Décembre 1996)

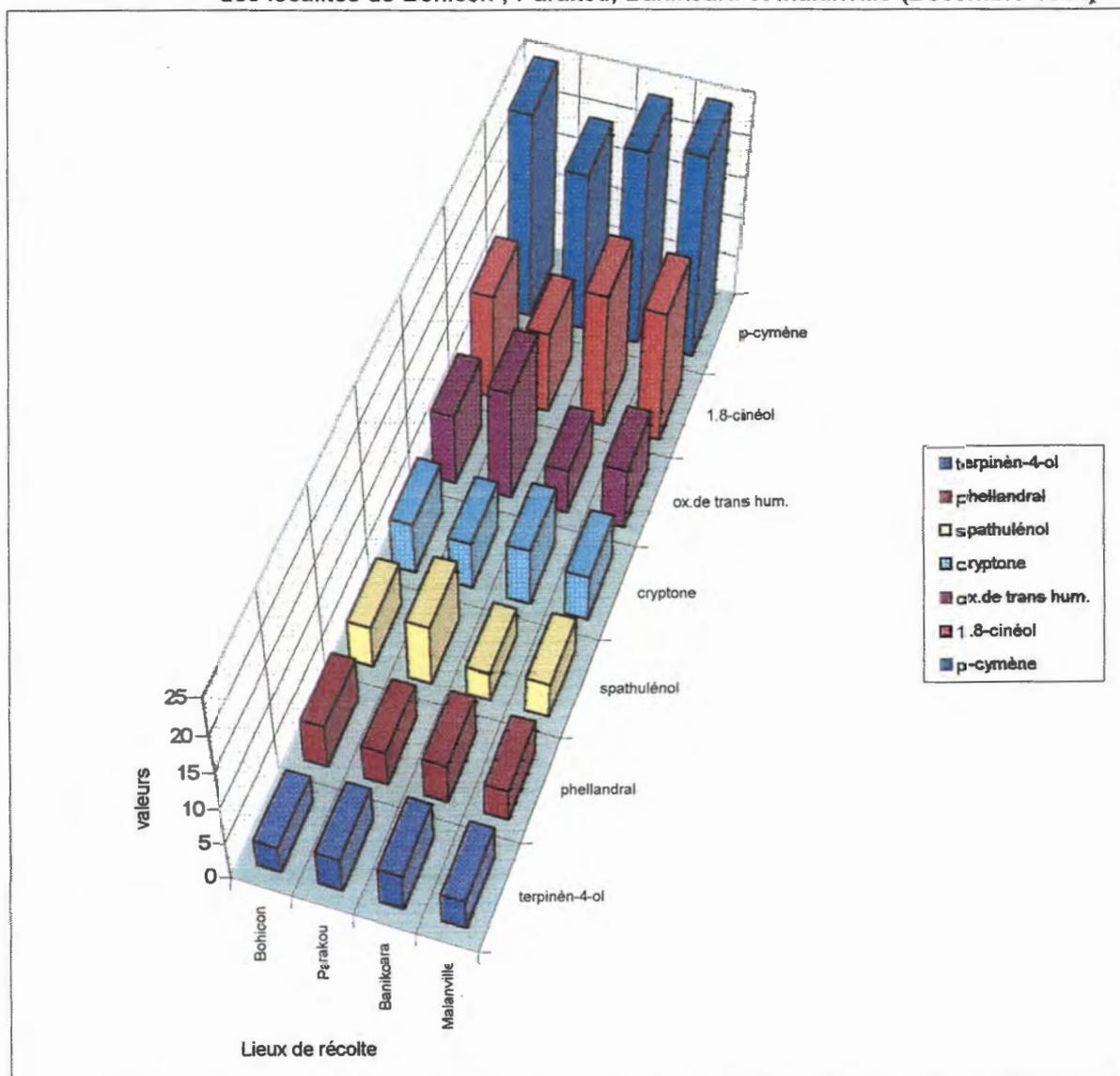


Tableau 16a:

Composition chimique des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* à différentes saisons sur le site de Pahou

CONSTITUANTS IDENTIFIÉS	PÉRIODES DE RÉCOLTE					
	G S S		G S P		P S S	P S P
	Janvier	Mars	Mai	Juillet	Septembre	Novembre
1-3-méthyl butanol	3,85	2,20	2,46	2,22	1,96	2,15
2-α-pinène	11,26	11,52	12,29	12,25	12,10	11,75
3-camphène	0,11	0,10	0,11	0,12	0,12	0,12
4- β -pinène	1,27	1,09	1,13	0,99	0,83	0,74
5-sabinène	0,05	0,05	0,05	0,04	0,06	0,05
6-α-phellandrène	0,52	4,69	5,00	3,16	2,35	2,10
7- α -terpinène	0,21	0,23	0,25	0,21	0,24	0,27
8-limonène	2,06	2,23	2,28	2,29	2,32	2,30
9-1,8-cinéole	12,54	10,36	9,82	9,72	9,95	9,24
10-(Z)- β -ocimène	0,79	0,60	0,53	0,73	0,89	0,87
11-γ-terpinène	29,59	37,28	35,10	33,28	36,64	38,10
12-(E)- β -ocimène	0,10	0,09	0,08	0,07	0,10	0,06
13-p-cymène	14,50	11,33	11,78	13,02	15,14	13,02
14-terpinolène	1,16	1,05	0,11	0,87	1,22	1,20
15-linalol	0,60	0,41	0,35	0,35	0,36	0,33
16- β -caryophyllène	1,79	2,81	3,59	4,34	2,82	3,11
17-aromadendrène	0,06	0,14	0,15	0,14	0,06	0,09
18-terpinèn-4-ol	4,35	3,66	3,08	3,21	3,16	3,28
19-alloaromadendrène	0,06	0,13	0,17	0,28	0,20	0,17
20- α -humulène	0,38	0,43	0,58	0,69	0,51	0,58
21-α-terpinéol	2,46	2,43	2,05	2,42	2,08	2,17
22-germacrène-D	0,35	1,06	1,57	1,24	0,44	0,75
23- γ 2-cadinène	0,09	0,08	0,16	0,17	0,09	0,12
24- δ -cadinène	0,46	0,32	0,63	0,65	0,53	0,59

25-Cadina-1,4-diène	tr	0,04	0,08	0,09	0,06	0,07
26-Oxyde de caryophyllène	0,26	0,27	0,33	0,45	0,65	0,81
27-Oxyde d'humulène	tr	tr	0,02	0,03	tr	tr
28-longipininol	0,05	0,11	0,12	0,16	0,12	0,16
29-cubénol	0,10	0,10	0,20	0,17	0,18	0,20
30-épi-cubénol	0,18	0,30	0,31	0,38	0,24	0,29
32-globulol	0,29	0,63	0,54	0,70	0,39	0,45
33- α -eudesmol	0,03	0,08	0,05	0,09	0,04	0,05
34- γ -eudesmol	0,04	0,10	0,07	0,12	0,04	0,07
35-spathulénol	0,83	1,07	1,09	1,52	1,45	1,70
36-T-cardinol	0,09	0,14	0,13	0,18	0,10	0,15
37-Carvacrol	0,22	0,12	0,10	0,14	0,09	tr
38-T-muurolol	0,14	tr	tr	tr	0,02	0,09
38-Iso-spathulénol	tr	0,04	0,01	0,05	0,01	0,02
39- β -eudesmol	0,12	0,26	0,26	0,46	0,16	0,10
40- α -cardinol	tr	tr	tr	0,04	0,14	0,10
RENDEMENTS	1,26	1,16	0,59	0,66	0,95	0,70

GSS = grande saison sèche

GSP = grande saison des pluies

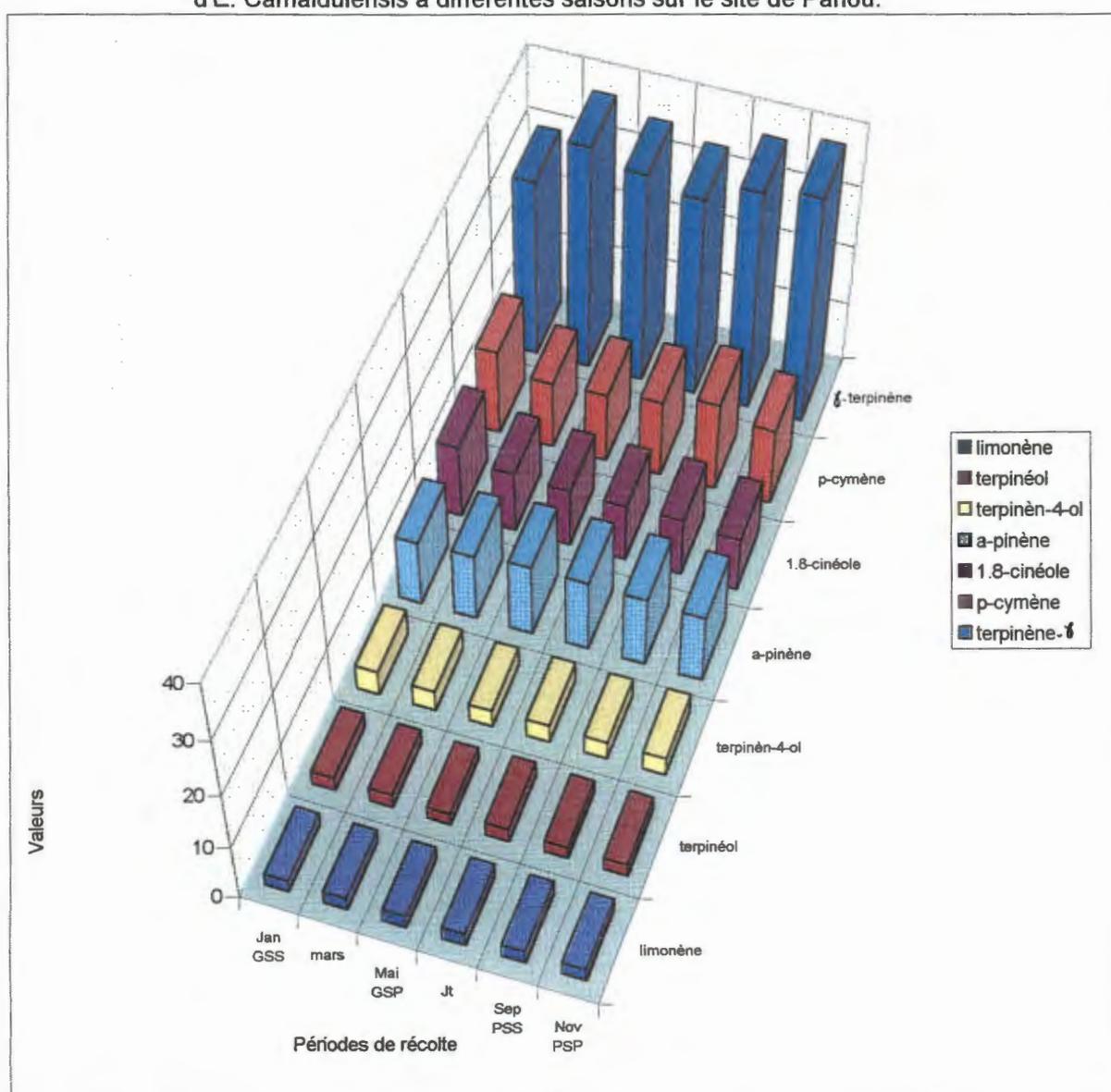
PSS = petite saison sèche

PSP = petite saison des pluies

Tableau 16 b : Composés majoritaires des huiles essentielles d'*E. Camaldulensis* à différentes saisons sur le site de Pahou.

		limonène	terpinéol	terpinèn-4-ol	a-pinène	1.8-cinéole	p-cymène	terpinène- δ
GSS	Jan	2.06	2.46	4.35	11.26	12.54	14.5	29.59
	mars	2.23	2.43	3.66	11.52	10.36	11.33	37.28
GSP	Mai	2.28	2.05	3.08	12.29	9.82	11.78	35.1
	Jt	2.29	2.42	3.21	12.25	9.72	13.02	33.28
PSS	Sep	2.32	2.08	3.16	12.1	9.95	15.14	36.64
PSP	Nov	2.3	2.17	3.28	11.75	9.24	13.02	38.1

Graphe 6 : Histogramme des composés majoritaires des huiles essentielles d'*E. Camaldulensis* à différentes saisons sur le site de Pahou.

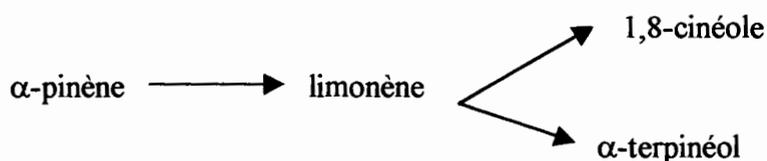


II-3-4- INFLUENCE DU LIEU ET DE LA PÉRIODE DE RÉCOLTE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE

On constate (graphe 7), d'avril à juillet, que les teneurs en 1,8-cinéole dans l'huile d'origine de Sèmè restent approximativement au voisinage de 72%, (celles d' α -phellandrène demeurent inférieures à 0,5%), celles de limonène augmentent de 7 à 14% et celles d' α -terpinéol diminuent, dans la même période, de 1,9 à 0,8%.

Quant aux huiles provenant de Calavi, leurs teneurs en 1,8-cinéole ne sont maximales ($\approx 70\%$) que de janvier à mars et en octobre alors que celles de limonène restent constantes ($\approx 5\%$) tandis que celles d' α -terpinéol sont maximales d'avril à juin.

D'autre part, sur le site de Sèmè, les teneurs en 1,8-cinéole et en α -terpinéol évoluent dans le même sens, tandis que celles de limonène évoluent en certaines périodes en sens inverse avec les deux premières. Le site de Calavi donne des taux d' α et de β -pinène qui augmentent chaque fois que ceux de 1,8-cinéole diminuent. Ces constats s'expliquent par les transformations déjà signalées par les auteurs (157, 158).



On constate également, sur le site de Calavi, que les teneurs de certains constituants comme α -pinène, β -pinène, γ -terpinène, p-cymène et α -phellandrène augmentent chaque fois que celles 1,8-cinéole baissent. Il existe à Calavi un parallélisme entre teneur en huile et proportion en 1,8-cinéole; le pourcentage en masse de 1,8-cinéole en mars (1,3%) fait 6 fois celui du mois d'août (0,20%).

Par ailleurs, les 2 huiles se distinguent l'une de l'autre par leurs teneurs élevées en globulol (2 à 14%) et pinènes (2,6 à 29,5%) pour le site de Calavi, en limonène (5 à 17%) pour le site de Sèmè.

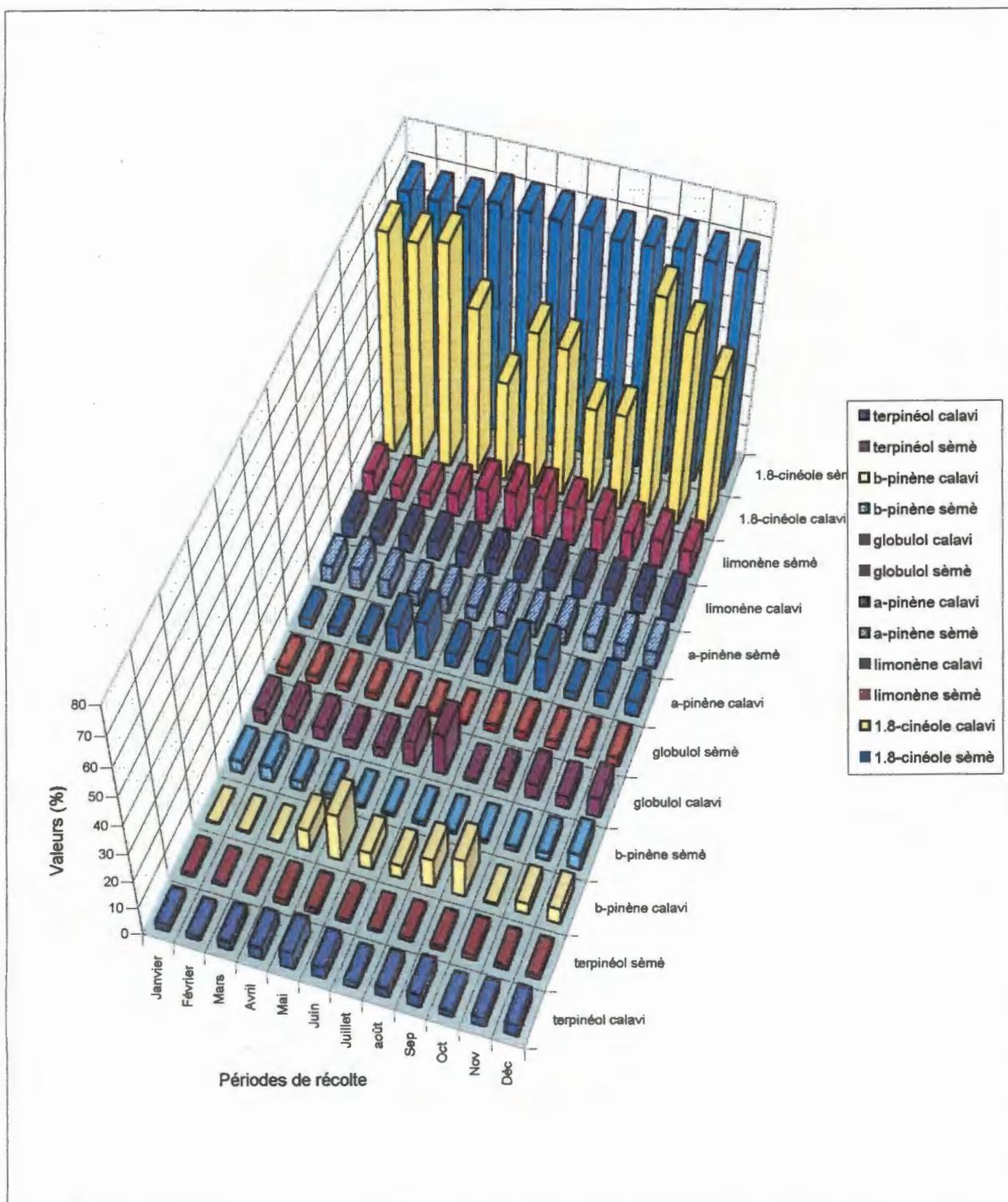
Ces résultats montrent qu'une huile de qualité, correspondant aux profils normés (NFT 75-113) fixant pour une huile à usage médicinal le taux en 1,8-cinéole $\geq 70\%$) peut être obtenue à partir du site de Sèmè avec un rendement de 0,8 à 1,6% au cours de tout le cycle végétatif, alors que mars, indiqué par les auteurs (125, 129, 159) comme étant la période la plus favorable, correspond effectivement à celle permettant l'obtention d'une huile de qualité d'origine de Calavi en tout point comparable à celle de Sèmè.

Tableau 17:

Variation des pourcentages des composés majoritaires des huiles essentielles de *E. camaldulensis* des sites de Calavi et Sèmè en fonction de la période de récolte

PÉRIODE	POURCENTAGES DES COMPOSÉS MAJORITAIRES											
	α -pinène		β -pinène		Limonène		1,8-cinéole		α -terpinéol		globulol	
	calavi	sèmè	calavi	sèmè	Calavi	sèmè	calavi	Sèmè	calavi	sèmè	calavi	sèmè
Janvier	2,83	5,53	0,51	4,11	5,38	7,31	70,4	69,8	2,34	1,17	4,84	2,43
Février	2,53	7,24	0,7	5,24	5,07	5,14	69,3	69,0	1,6	0,73	5,40	2,5
Mars	2,23	6,15	0,35	3,1	5,72	5,41	71,4	69,2	3,08	0,44	4,28	2,6
Avril	8,83	4,30	7,61	1,61	5,92	7,56	53,7	72,5	4,53	1,90	2,83	2,29
Mai	12,9	5,38	16,5	0,98	4,73	11,5	32,5	72,0	6,12	1,73	3,17	0,99
Juin	4,82	4,60	6,10	1,02	5,10	12,8	50,8	71,8	4,08	1,25	8,53	0,68
Juillet	4,82	5,35	4,60	1,15	4,27	13,6	48	71,6	1,96	0,80	13,9	0,32
Août	10,8	4,82	10,2	0,89	6,74	12,7	31,0	70,0	3,36	1,3	1,07	2,5
Septembre	11,8	5,20	13,3	0,9	5,74	11,8	31,3	70,4	4,75	1,40	2,12	2,60
Octobre	2,35	5,53	0,53	1,51	5,18	9,61	70,8	71,7	2,01	1,93	5,16	2,57
Novembre	5,55	5,27	4,0	2,51	5,81	9,71	62,5	70,4	3,10	1,32	4,12	2,18
Décembre	5,0	5,72	5,35	5,25	5,95	8,52	50,9	70,0	4,3	1,37	6,74	2,81

Grphe 7 : Histogramme de comparaison des pourcentages des composés majoritaires des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* des sites de Calavi et Sèmè



II-3-5- INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA PLANTE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE

Les feuilles d'une plantation d'*Eucalyptus camaldulensis* située sur le campus de la faculté des sciences de la santé ont été récoltées puis extraites selon une périodicité de 2 mois. La première récolte a été effectuée sur des arbustes ayant 3 mois d'âge après la mise sous terre. Six prélèvements ont été réalisés. Le tableau 18a donne la composition chimique des produits obtenus.

On constate une augmentation régulière du taux en 1,8-cinéole qui, à l'origine était de 15% et passe après 13 mois à 71%. Il en est de même dans une certaine mesure du limonène. Par contre le taux des composés comme l' α -pinène, le β -pinène et le globulol baisse. Les autres composés à savoir l' α -terpinéol et le p-cymène ont leurs taux qui augmentent ou diminuent de façon différente pendant la période des 10 mois (graphe 8).

Les rendements évoluent aussi de façon régulière passant de 0,62 à 1,53% (graphe 9). Il existe alors une étroite corrélation entre l'âge des feuilles et le nombre de glandes sécrétrices d'une part et d'autre part entre le rendement et la densité des glandes sécrétrices.

Tableau 18a:

Variation en fonction du cycle végétatif de la composition chimique de
l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* du site de Cotonou

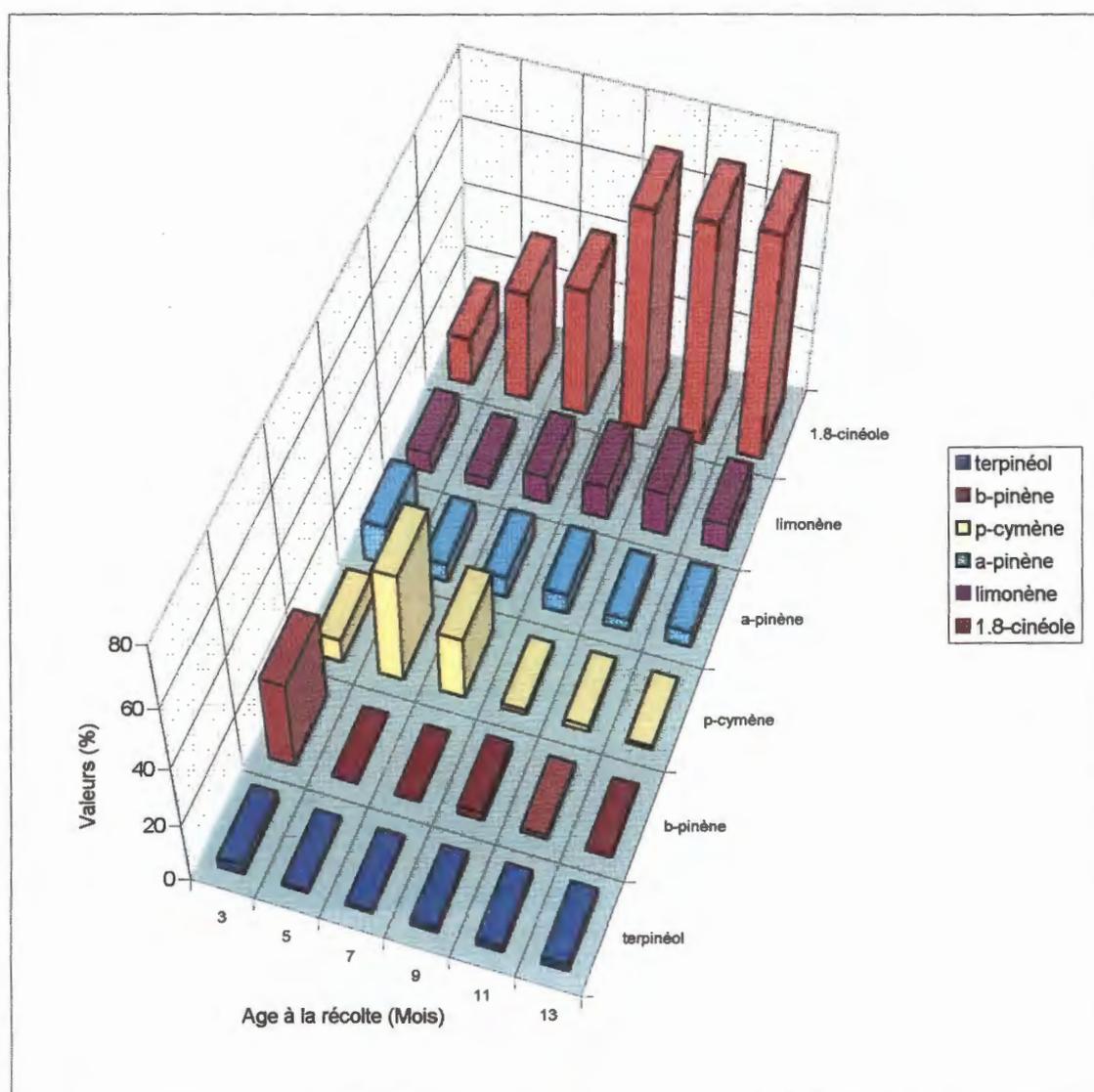
CONSTITUANTS IDENTIFIÉS	AGE A LA RECOLTE (EN NOMBRE DE MOIS)					
	3	5	7	9	11	13
1-2-méthyl butanal	tr	-		-		0,05
2- α -pinène	12,97	5,71	6,65	6,40	3,55	5,02
3-camphène	0,13	0,03	0,03	0,07	0,02	0,30
4-isobutyle d'isobutyrate	0,36	0,12	0,08	0,17	0,05	0,09
5- β -pinène	28,11	0,11	0,09	2,61	1,41	0,09
6-sabinène	0,05	0,06	tr	tr	0,05	0,04
7- α -phellandrène	0,35	2,10	8,41	0,03	-	0,02
8-myrène	0,43	0,10	0,41	-	0,51	0,37
9- α -terpinène	0,07	0,04	0,31	0,16	-	0,07
10-limonène	6,34	3,10	8,75	10,80	13,68	8,63
11-1,8-cinéole	15,07	34,16	39,7	68,95	69,76	71,04
12- γ -terpinène	0,77	1,03	7,39	0,72	tr	0,48
13-p-cymène	7,74	35,57	20,02	1,60	1,97	1,08
14-terpinolène	0,25	0,19	0,44	0,01	tr	1,03
15-isamyl d'isovalérate	0,09	0,22	0,17	0,02	tr	0,02
16-p-cyménène	0,08	0,12	0,11	0,12	0,05	0,14
17-camphre	0,28	0,05	-	0,06	0,03	-
18-pinocarvone	0,26	0,13	0,09	0,05	0,09	-
19-fenchol	1,08	0,05	tr	0,88	0,07	0,25
20- β -caryophyllène	3,79	0,56	0,16	0,78	0,91	0,51
21-terpinèn-4-ol	1,09	1,63	1,40	0,54	0,63	0,75
22-alloaromadendrène	0,67	0,49	-	-	0,24	0,13
23-pinocarvéol	0,96	0,22	0,38	0,35	0,06	0,49
24- γ -cadinène	0,17	0,33	0,34	0,46	0,46	0,64
25-bornéol	0,93	0,25	0,10	0,30	0,12	0,30

26-α-terpinéol	3,33	0,94	0,93	1,93	2,17	2,40
27-myrténol	1,18	0,43	0,16	0,12	0,05	0,13
28-trans-p-menth-1(7),8-dièn-2-ol	-	tr	0,21	0,37	0,12	0,29
29-oxyde de phellandrène	-	0,11	0,05	-	-	-
29-trans carvéol	-	0,21	0,03	-	-	0,09
30-p-cymèn-8ol	-	-	0,09	0,08	0,22	0,21
31-cis-carvéol	-	-	0,10	-	tr	0,04
32-cis-p-menth-1(7),8-dièn-2-ol	-	-	0,11	0,29	0,08	0,24
33-trans-oxyde de caryophyllène	0,38	-	-	-	tr	-
34-lédol	0,92	0,08	tr	0,10	0,29	0,12
35-globulol	5,38	0,77	0,21	0,75	1,63	0,62
36-iridiflorol	0,85	0,53	0,11	0,13	0,32	0,32
37-spathuléol	0,56	0,10	0,21	-	-	0,08
38-thymol	0,05	-	0,09	0,02	-	-
39-Carvacrol	0,05	0,89	0,30	0,04	0,04	0,02
40- β - eudesmol	0,22	-	0,05	tr	-	0,04
RENDEMENTS	0,62	0,67	1,16	1,23	1,28	1,55

Tableau 18b : Composés majoritaires de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* du site de cotonou en fonction du cycle végétatif

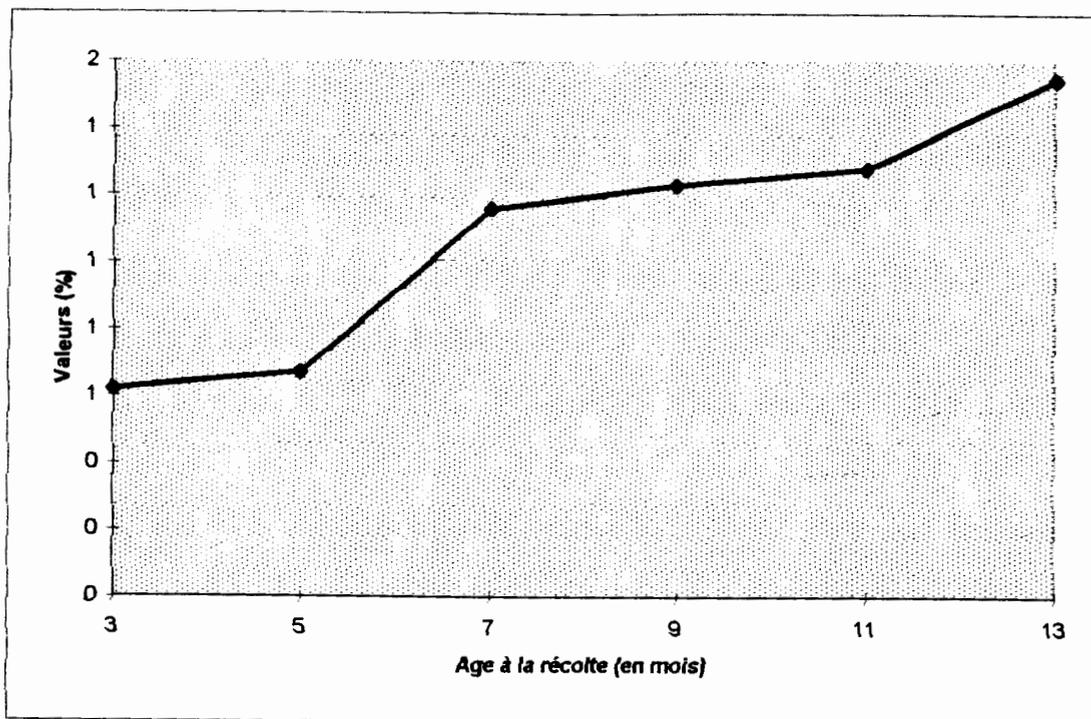
AGE (Mois)	terpinéol	β -pinène	p-cymène	α -pinène	limonène	1.8-cinéole
3	3.33	28.11	7.74	12.9	6.34	15.07
5	0.94	0.11	35.57	5.71	3.1	34.16
7	0.93	0.09	20.02	6.65	8.75	39.7
9	1.93	2.61	1.6	6.4	10.8	68.95
11	2.17	1.41	1.97	3.55	13.68	69.76
13	2.4	0.09	1.08	5.02	8.63	71.04

Graphe 8 : Histogramme des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* du site de cotonou en fonction du cycle végétatif



Graphe 9

Courbe de variation des rendements en huile essentielle d'*E. camaldulensis* de Cotonou.



II-3-6- COMPARAISON DE NOS RÉSULTATS AVEC CEUX DE LA LITTÉRATURE

Une comparaison des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* du Bénin avec celle de la littérature fait apparaître ce qui suit :

1°- Le taux en 1,8-cinéole dans les échantillons des sites de Calavi et Sèmè cumule à 70% et est comparable en ce sens aux échantillons du Maroc (142, 143). Ils en sont différents par la présence d' α -terpinéol. Ce composé qui est quelques fois sous forme de trace, augmente souvent pour atteindre 6% alors qu'un seul échantillon du Maroc le contient à un taux de 8,4% (142b). Le p-cymène est sous forme de trace dans ces échantillons.

2°- Les échantillons provenant de la région septentrionale sont comparables à ceux d'Australie (149), de l'Uruguay (153), du Burundi (147) et du Mali (155) pour leur teneur en p-cymène qui est d'environ 20 à 25%. Ils en diffèrent :

* par leurs teneurs particulièrement faibles en 1,8-cinéole (10 à 16%), alors que les huiles essentielles en provenance du Burundi et du Mali en contiennent respectivement 43,3% et 60%.

* par la présence de composés à taux relativement élevé comme le spathulénol (8% à Parakou), la cryptone (7% à Banikoara), le trans-humulène oxyde (14% à Parakou) et enfin le phellandral (6% à Bohicon).

II-3-7- CONCLUSION

L'étude de la composition des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* d'origine béninoise a permis de mettre en évidence :

1°- 3 chémotypes dont un à γ -terpinène jamais cité dans la littérature (site de Pahou).

2°- Une localisation de chacun des chémotypes pouvant être décrite de la façon suivante :

* Région méridionale :

- sites de Sèmè, Cotonou et Calavi : 1,8-cinéole

- site de Pahou : γ -terpinène

* Régions centrale et septentrionale :

- sites de Bohicon, Parakou, Banikoara et Malanville : p-cymène

3°- Une influence du lieu et de la période de récolte sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle, et que l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* en provenance de Sèmè répond aux normes NFF 75-113 durant tout le cycle végétatif.

4°- Une augmentation régulière de la teneur en 1,8-cinéole et du rendement en huiles essentielles pendant la maturation de la plante. Il découle de cette dernière constatation que l'exploitation commerciale dans le but de production de l'eucalyptol ne peut se faire qu'à partir du 9^{ième} mois au moins après la mise en terre des jeunes plants

II-4- *EUCALYPTUS CITRIODORA* HOOK : **SYN. *E. MACULATA* VAR. *CITRIODORA* BALEY**

II-4-1- BOTANIQUE

L'*Eucalyptus citriodora* est un bel arbre de 25 à 40 m de haut à l'écorce unie blanc-rosé et tachetée, les branches forment une couronne éparse.

Il se distingue des autres espèces par l'odeur de citronnelle de ses feuilles qui sont souvent alternes au moins à l'état adulte. Les feuilles âgées sont lancéolées.

Les fleurs sont axillaires en panicules et les fruits sont ovoïdes (154).

C'est une espèce fragile mal adaptée au Bénin.

II-4-2- EMPLOIS

L'*Eucalyptus citriodora* sert aussi comme plante ornementale au voisinage des maisons et au bord des routes ; son bois est recherché par les fabricants de bois d'œuvre (154).

L'*Eucalyptus citriodora* est aussi appelé gommier à odeur de citron. Car les feuilles dégagent une délicieuse odeur de citron comparée aussi à l'odeur de la citronnelle.

Les feuilles sèches de cet arbre, placées dans les tissus ou dans le papier, leur communiquent leur odeur particulière.

En médecine traditionnelle, les feuilles sont utilisées en inhalation contre les affections des voies respiratoires (155).

L'huile essentielle extraite des feuilles d'*Eucalyptus. citriodora* est utilisée en parfumerie et en cosmétique. Elle intervient seule ou combinée dans plusieurs domaines d'applications et emprunte plusieurs voies d'utilisation dont le résumé est consigné dans le tableau 7 (141).

Planche 4 : *Eucalyptus citriodora* du Bénin



Tableau 19:*Eucalyptus citriodora*, propriétés et champs d'action de l'huile essentielle

Domaines d'intervention	Champs d'action	Voies
Médecine générale	Piqûres d'insecte Moustiques (répulsif)	Cutanée
Infectiologie	Paludisme (préventif et curatif)	Cutanée
Gynécologie	Fibrome	Cutanée (à visée circulatoire)
	Congestion Ovarienne et Utérine	Voie vaginale
Dermatologie	«Cellulite»(rétention hydrolipidique)	Cutanée (à visée activatrice d'exfoliation)
	Eczéma variqueux	Cutanée
Rhumatologie	Arthrite	Cutanée visée anti-inflammatoire
	Tennis-elbow	Cutanée
Angéo-phlébo-cardiologie	Phlébite	Orale cutanée
	Hémorroïdes interne et externe	Rectale
	Pédiatrie	Cutanée
Endocrinologie et métabolisme	Diabète (adjuvant obésité)	Orale cutanée

II-4-3- HUILE ESSENTIELLE D'E. CITRIODORA : TRAVAUX ANTÉRIEURS

De nombreux travaux ont été effectués sur l'espèce *citriodora* qui fournit une huile essentielle considérée comme la meilleure source naturelle de citronellal.

Une étude bibliographique effectuée par BOLAND et coll. (92), PENFOLD et coll. (162) et SINGH et coll. (163) a mis en évidence quatre variétés chimiques avec des taux variables de citronellal.

II-3-4-1- TYPE À CITRONELLAL ($\geq 65\%$)

Ce type, riche en citronellal, à été identifié depuis 1920 par BAKER et SMITH. (104)

En 1960, dans l'espèce zairoise, S. ARCTANDER (164) a trouvé ce composé à une teneur de 80%.

BARUA et al. (165) l'ont trouvé, en 1972, dans les feuilles indiennes à une teneur de 81,2% suivi de citronellol (8,6%) et d'isopulégol (6,3%).

Dans l'essence de *citriodora* de Kenya, J. W. MWANGI et al. (160) identifient en 1981 le citronellal à des taux variant de 29,7 à 88,1%.

Deux ans après, en 1983, CHEN et coll. (166) isolent 72,80% de ce composé dans la même espèce cultivée en Chine et 14,51% de citronellol.

Dans la même année, MIRANDA et coll. (167) trouvent dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* de Cuba, des composés oxygénés qui représentent 90% du mélange avec un taux de 70,0% de citronellal.

Toujours au cours de la même année 1983, et dans un autre échantillon en provenance de la Chine, S. SUGIMOTO (168) a trouvé ce composé à une teneur de 66,7%

LAWRENCE et REYNOLDS (169) isolent, en 1988, 76,1% de citronellal dans celle du Brésil.

61-71,5% du même composé, 16,6-18% d'isopulégol et 5,6-8,1% de citronellol ont été identifiés, en 1988, par B. S. RAZAFINDRAKOTO (131) dans l'essence de l'espèce malgache.

Le même composé est trouvé à une teneur de 80,10%, par D. J. BOLAND et al. (92) en 1991 dans un échantillon poussant en Australie.

Dans deux échantillons de l'espèce béninoise, MOUDACHIROU et coll. (170) ont trouvé en 1994 le citronellal à des taux supérieurs à 75%, l'isopulégol (2 à 15%) et le citronellol (2 à 13%).

Un an plus tard, toujours dans un troisième échantillon béninois, M. A. AYEDOUN (149) le trouve à une teneur de 71,3%, le citronellol à 10,5% et l'isopulégol à 5,1%.

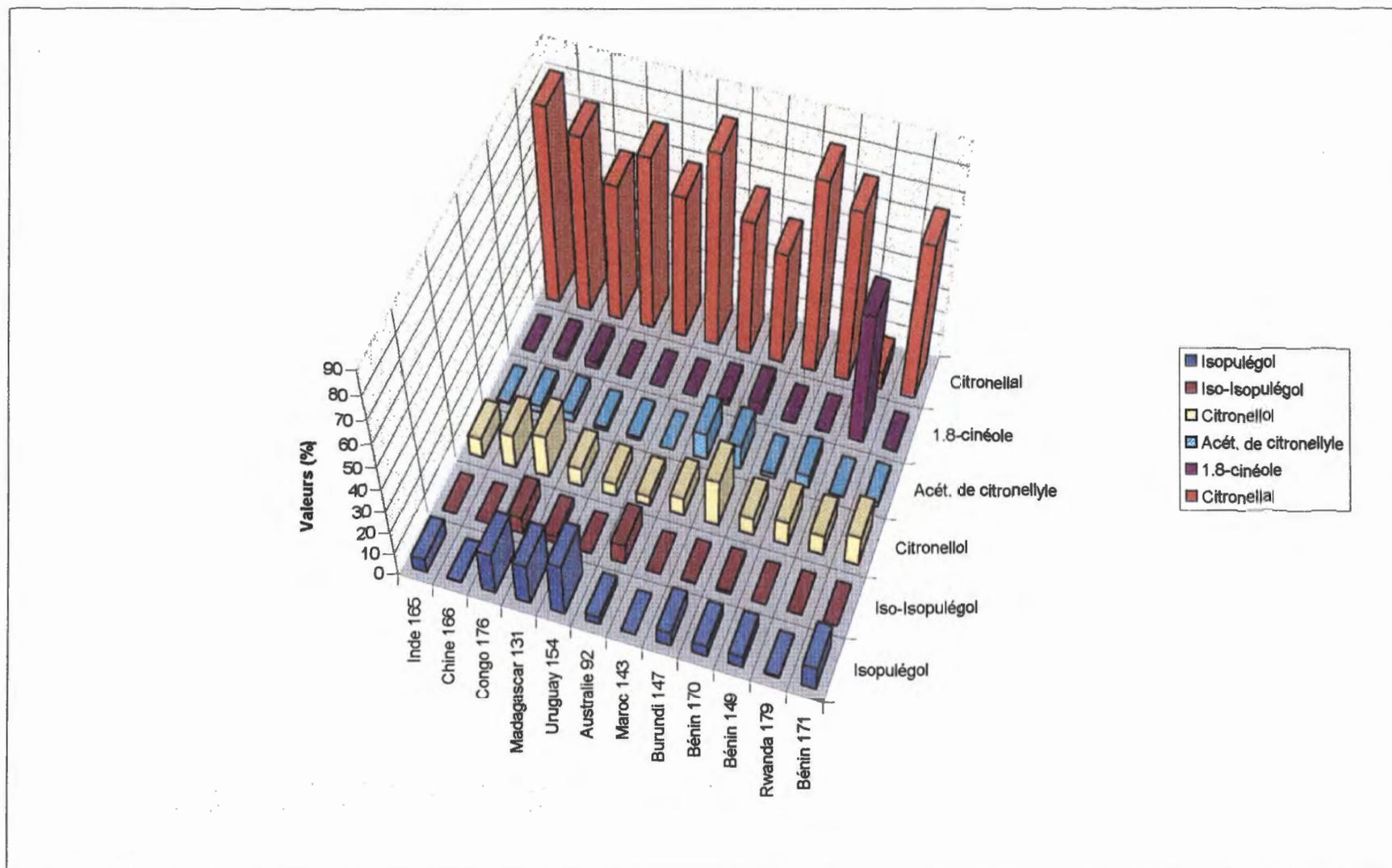
TABLEAU 20

Principaux composés chimiques des huiles essentielles d'*Eucalyptus citriodora* (Travaux des auteurs)

Auteurs (Référence) Année	Barua (165) 1972	Chen (166) 1983	Lamaty, M enut, Kiyabou (176) 1987	Razafindrak oto (131) 1988	Dellacassa (154) 1990	Boland (92) 1991	Zrira (143) 1991	Menut Dethier (147) 1994	Moudachi rou (170) 1994	Ayedoun (149) 1995)	Garry Chalchat (179) 1996	Gameau (171) 1996)
Origine	Inde	Chine	Congo	Madagascar	Uruguay	Australie	Maroc	Burundi	Bénin		Rwanda	Bénin
Partie distillée	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles		Feuilles	Feuilles
α -Pinène	0,1	0,22	0,5-0,8	0-0,4	-	0,14	1,5	0,6	0,07	0,1	1,3	0,10
β -Pinène	0,6	0,29	-	0,3-1,0	-	0,36	1,7	1,7	0,30	0,3	1,4	0,42
Limonène	-	tr	-	-	-	0,00	0,8	0,5	0,08	0,1	5,7	-
Cinéole-1,8	0,2	2,11	2-3,3	0,2-0,3	-	0,00	2,0	4,9	0,47	0,3	55,4	0,52
Isopulégol	6,3	0,34	15,7-18,3	16,6-18	22,9	3,41	-	6,2	4,90	5,1	0,6	10,33
Citronellal	81,2	72,80	40,3-57	61-71,5	59,2	80,10	56,3	46,9	79,72	71,3	7,2	65,45
iso-Isopulégol	-	-	5,8-7,4	0,5-3	-	8,51	-	0,7	1,50	-	0,2	-
Citronellol	8,6	14,51	9,4-18,3	5,6-8,1	5,6	4,18	7,8	20,4	7,65	10,5	8,9	13,05
Acétate de citronellyle	0,4	3,10	1,2-3,8	1-1,5	1,4	0,02	11,4	10,3	1,99	5,4	0,3	2,05

Graph 10: Principaux composés chimiques des huiles essentielles d'*Eucalyptus citriodora*

(Travaux des auteurs)



F. X. GARNEAU et coll. (171) quant à eux, trouvent en 1996, dans un quatrième échantillon béninois, le citronellal à un pourcentage de 65,45%, l'isopulégol et le citronellol étant respectivement de 10,33 et 13%.

Dans l'espèce togolaise, KOUMAGLO, MOUDACHIROU et coll. ont trouvé à une teneur de 85% (152).

Quant à l'acétate de citronellyle, sa proportion ne dépasse pas 6% dans l'ensemble des échantillons de ce type.

II-4-3-2- TYPE INTERMÉDIAIRE

Cette variété est caractérisée par une teneur moyenne en citronellal allant de 20 à 50% et plus et du guaïacol (172-175).

Au Congo, LAMATY, MENUT, KIYABOU (176) ont trouvé dans les feuilles de l'espèce congolaise 40,3 à 57% de citronellal, 15,7 à 18,3% d'isopulégol et 9,4–18,3% de citronellol.

Pour DELLACASSA (154) le citronellal est obtenu à un taux de 59,2%, l'isopulégol à 22,9% et le citronellol à 5,6% dans l'échantillon provenant de l'Uruguay.

Ce composé, à une teneur de 56,3% et le citronellol à 7,8%, sont identifiés dans l'huile marocaine par ZRIRA et coll. (143).

En 1994, MENUT, DETHIER et coll. (147) trouvent, dans une espèce croissant au Burundi, 46,9% de citronellal, le citronellol étant de 20,4% et l'isopulégol de 6,2%. Notons que l'acétate de citronellyle se trouve dans les deux derniers échantillons respectivement à un taux de 11,4% et 10,3%.

II-4-3-3- TYPE "A"

Ce type contient du citronellol, de l'acétate de citronellyle et du citronellal, composés entre 1 et 14%. Cette variété a été étudiée par PENFOLD et MORISON (1948), PENFOLD et al. (1951) (177, 178).

II-4-3-4- TYPE HYDROCARBONÉ

Il contient un faible pourcentage de citronellal (<10%) aux côtés des composés hydrocarbonés (69, 70).

Au Rwanda, la variété dont la teneur en citronellal est $\leq 10\%$ mais avec un pourcentage élevé (55,4%) en 1,8-cinéole est récoltée par CHALCHAT et GARRY (179). Elle a une teneur de 8,9% de citronellol, l'isopulégol étant de 0,6%

II-5- HUILES ESSENTIELLES D'*EUCALYPTUS* *CITRIODORA* DU BÉNIN : NOS TRAVAUX

Du sous genre corimbia, l'*Eucalyptus citriodora* est une espèce qui n'est pas très répandue au Bénin. On la trouve disséminée dans les plantations d'*Eucalyptus camaldulensis* avec des peuplements de faibles densités (quelques pieds); il existe également quelques rares plantations privées

Quatre sites ont été l'objet de nos études ; il s'agit des sites de Calavi et Kétou (octobre 1995 à septembre 1996), de Tovo de mai 1996 à mars 1997 et Kansoukpa de janvier 1995 à novembre 1996. Dans cette dernière localité, nous avons examiné l'évolution de l'huile essentielle en fonction de l'âge de la plante

II-5-1- TENEUR EN HUILES ESSENTIELLES

Les tableaux 21, 22 et 23 présentent la teneur en huiles essentielles des quatre localités.

On remarque que cette espèce se caractérise par un rendement souvent élevé (1,45 à 6%). La localité de Calavi possède les plus forts rendements quel que soit la période de l'année (4,35 en décembre à 5,90% en juin). Les rendements obtenus sur le site de Kétou sont les plus constants et tournent autour de 2,5% avec une variation de 0,5%. Les rendements sont plus faibles à Tovo (1,45% en janvier à 3,2% en juillet).

Les périodes de hauts rendements semblent coïncider sur les sites de Calavi et de Kétou avec celles des saisons de pluies : 4,75, 5,30, 5,90% pendant la grande saison des pluies et 4,80 et 5,60% pendant la petite saison des pluies pour le site de Calavi et respectivement 2,61, 2,72 et 2,83% puis 2,47 et 2,75% pour le site de Kétou. Parallèlement, les plus faibles rendements sont obtenus sur ces deux sites pendant la grande saison sèche (4,35 et 2,34%) (tableau 21, graphe 11). Il en est de même du site de Tovo (grande saison des pluies 3,2% et grande saison sèche 1,45%) (tableau 22, graphe 12).

De ces observations, il découle que le lieu et la période de récolte ont une nette influence sur le rendement en huiles essentielles d'*E. citriodora* du Bénin.

Concernant l'influence de l'âge de la plante, les rendements en huiles essentielles sont un peu fluctuants et sont aussi influencés par la saison (tableau 23, graphe 13). On note deux valeurs significatives (2,7% à 6 mois d'âge et 3,86% à 27 mois d'âge) avec un maximum à 10 mois (3,6%, grande saison des pluies) et des rendements supérieurs à 3,24% à partir du 21^{ème} mois.

Tableau 21 :

Rendements en huiles essentielles d'*E. citriodora* des sites de Calavi et de Kétou en pourcentage (octobre 1995-novembre 1996).

Saison	G. S. S.			G. S. P.				P. S. S.		P. S. P.		G.S.S.	Moyen
	Janv	Fév	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov		
Kétou	2,43	2,36	2,33	2,52	2,61	2,72	2,83	2,59	2,47	2,75	2,52	2,34	2,54
Calavi	4,57	4,89	4,53	4,75	5,29	5,90	5,53	4,84	4,80	5,60	4,97	4,35	5,00

Graphe 11 :

Courbes de variation des rendements en huiles essentielles d'*E. citriodora*

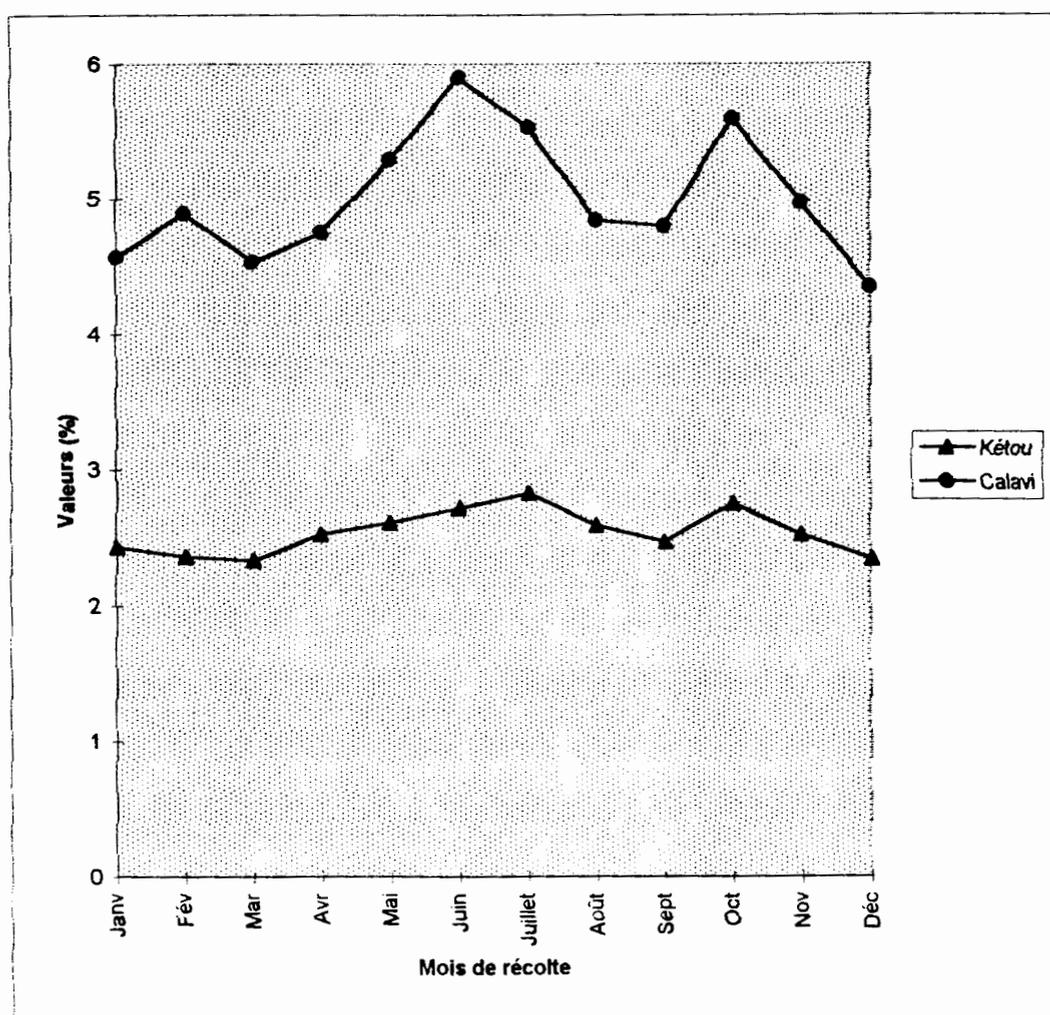


Tableau 22:

Rendement saisonnier en huiles essentielles d'*E. citriodora* du site de Tovo (mai 1996-mars 1997)

Saison	G. S. P.		P. S. S.	P. S. P.	G. S. S.		Moyen
Mois	Mai	Juillet	Septembre	Novembre	Janvier	Mars	
R ^{nt} , en %	2,51	3,20	2,10	2,35	1,45	1,70	2,21

Graphe 12 :

Courbes de variation saisonnière des rendements en huiles essentielles

d'*E. citriodora* : site de Tovo

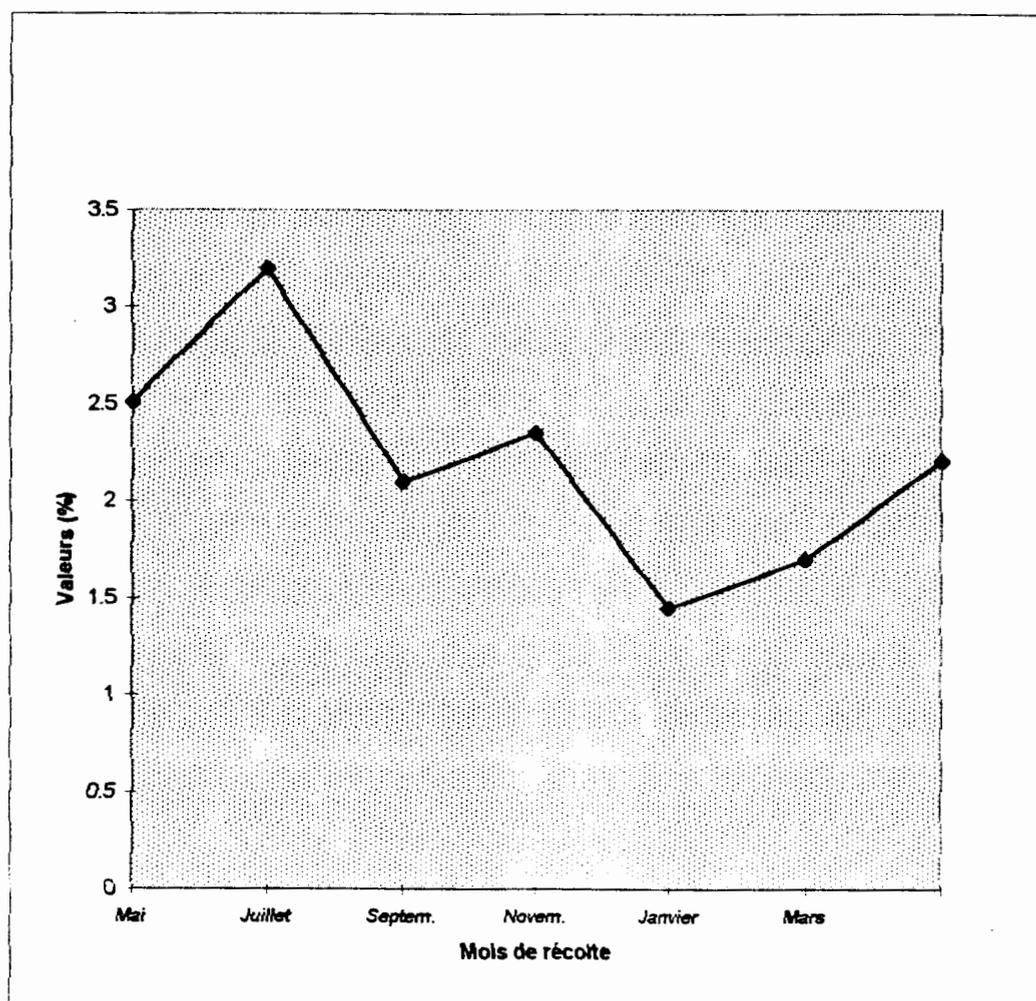


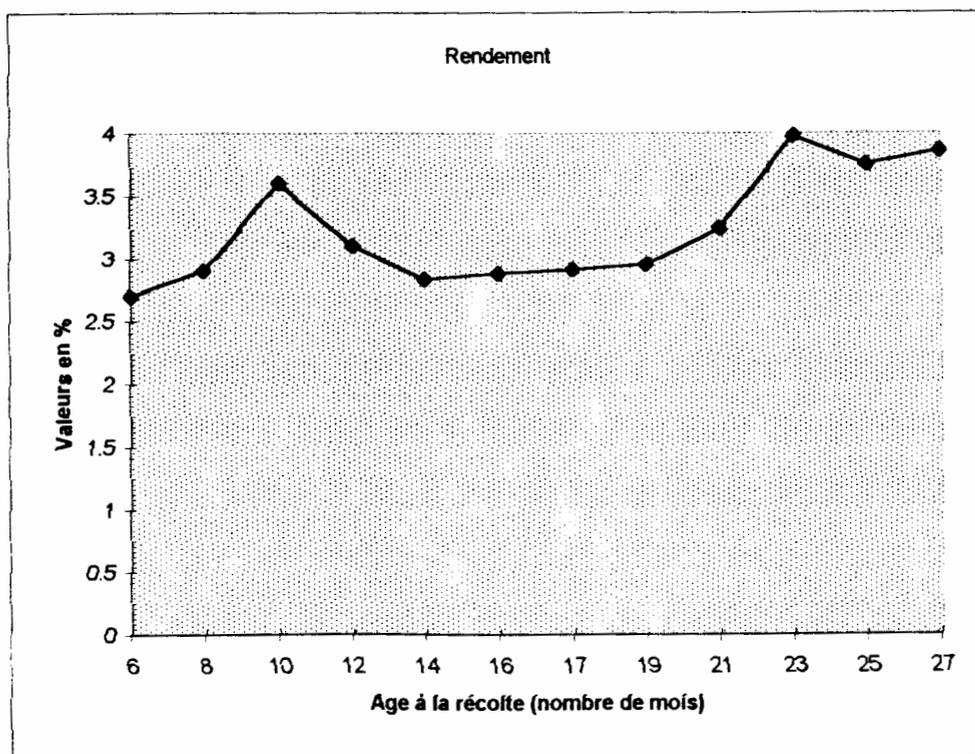
Tableau 23 :

Teneur en huiles essentielles d'*E. citriodora* de Kansoukpa en fonction de l'âge (en nombre de mois) entre février 1995 et novembre 1996.

Mois	Fév	Avr	Juin	Août	Oct	Déc	Janv	Mars	Mai	Juil	Sept	Nov
Age	2	8	10	12	14	16	17	19	21	23	15	27
R ^{nt}	2,70	2,90	3,60	3,10	2,83	2,88	2,91	2,95	3,24	3,98	3,75	3,86

Graphe 13 :

Courbe de variation de la teneur en huiles essentielles d'*E. citriodora* de Kansoukpa en fonction de l'âge (en nombre de mois) entre février 1995 et novembre 1996



II-5-2- COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'*E. CITRIODORA* DU BÉNIN

II-5-2-1- MATÉRIEL VÉGÉTAL

Nous avons étudié la composition chimique de 42 échantillons de parties aériennes sèches d'*E. citriodora* dont : 24 échantillons entre octobre 1995 et septembre 1996 provenant de Calavi et de Kétou, 6 échantillons de mai 1996 à mars 1997 de Tovo et 12 échantillons de février 1995 à novembre 1996 provenant de Kansoukpa.

II-5-2-2- RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

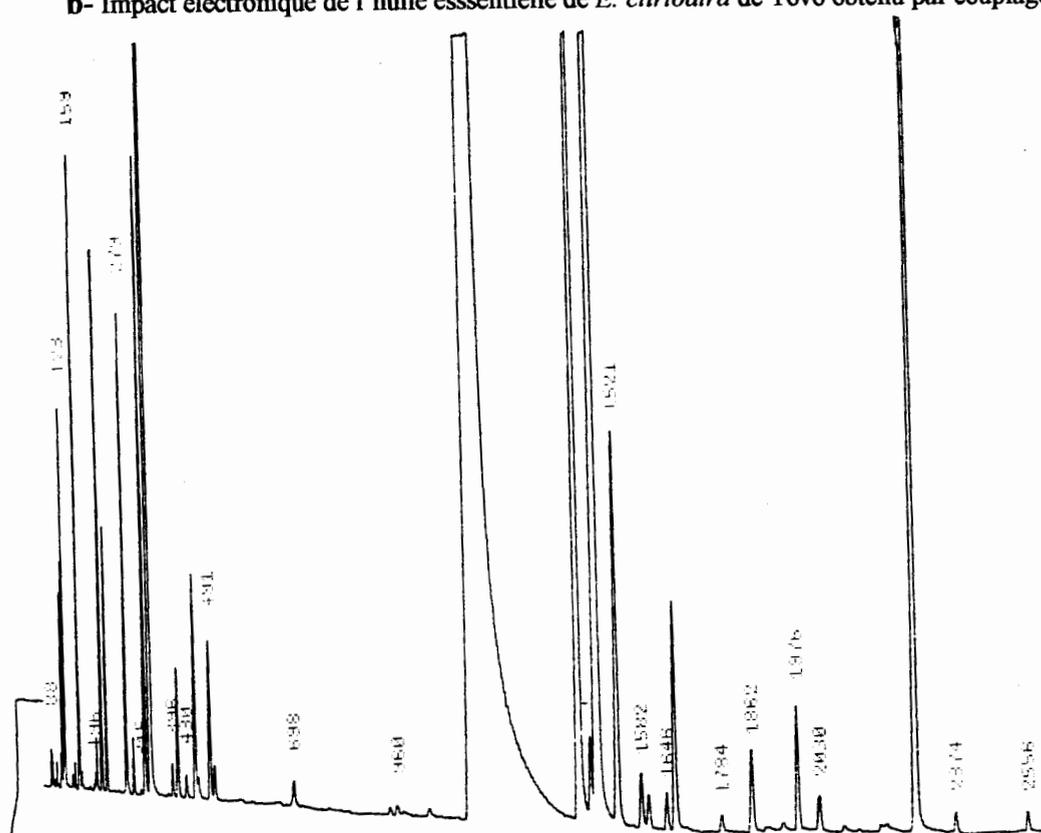
Les résultats des analyses ont été regroupés dans les tableaux 24 à 28. Nous avons identifié 20 constituants chimiques illustrés par les figures 13 et 14 (sites de Tovo et Kansoukpa).

Sur les quatre sites, le composé majoritaire est le citronellal (55 à 87%) ; à côté du citronellal, on trouve l'isopulégol (3 à 13,8%), le néoisopulégol (1 à 4,70%), le citronellole, l'acétate de citronellyle et le méthyleugénol sont en proportion variable selon le site. Il est cependant important de souligner que le 1,8-cinéole qui se trouve en proportion très élevée (3 à 9,5%) dans les échantillons du site de Tovo, est sous forme de trace dans les échantillons des autres sites. Il en est de même du méthyleugénol et de l'acétate de citronellyle qui se trouve en trace à Calavi, Kétou et Tovo mais à une proportion atteignant 4% dans l'huile essentielle de la plante adulte (27 mois d'âge) à Kansoukpa.

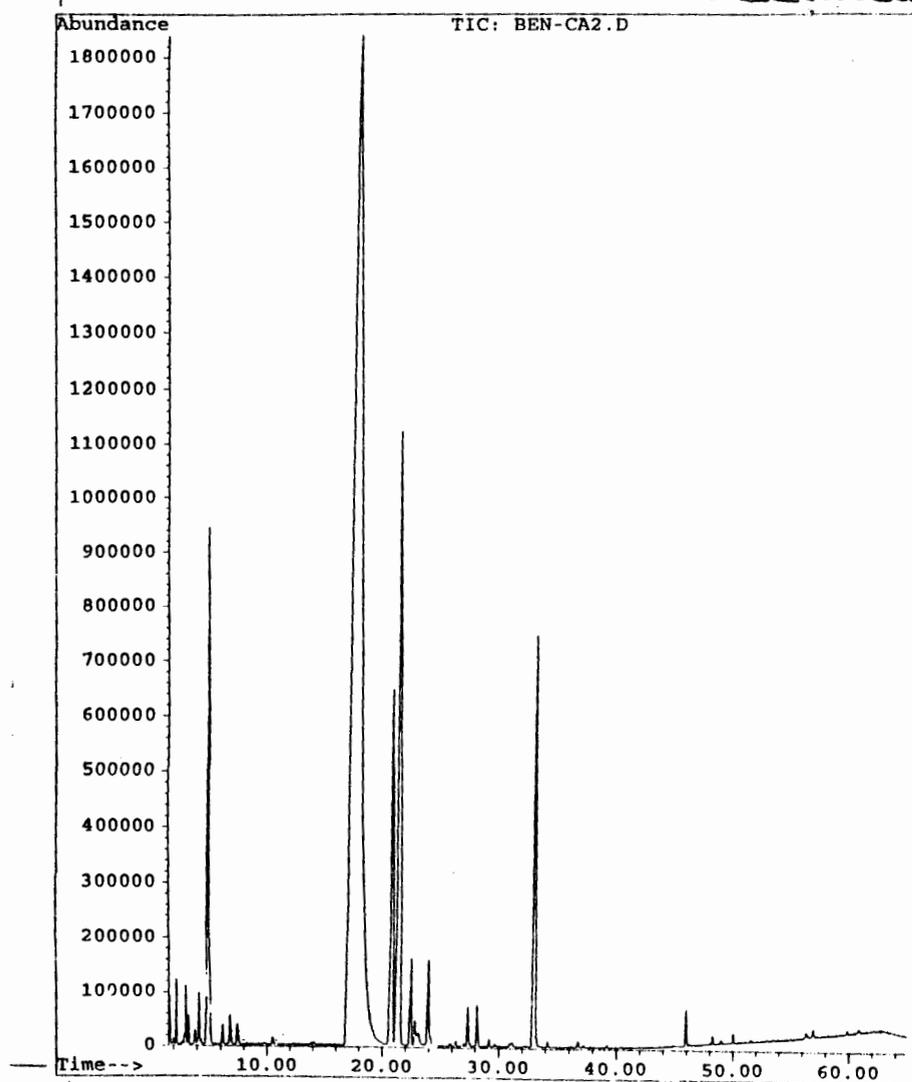
Figures 13: a- Chromatogramme de l'huile essentielle d'*E. citriodora* de Tovo

b- Impact électronique de l'huile essentielle de *E. citriodora* de Tovo obtenu par couplage CPG/SM

a



b



Figures 14 : a- Chromatogramme de l'huile essentielle d'*E. citriodora* de Kansoukpa

b- Impact électronique de l'huile essentielle de *E. citriodora* de Kansoukpa obtenu par couplage CPG/SM

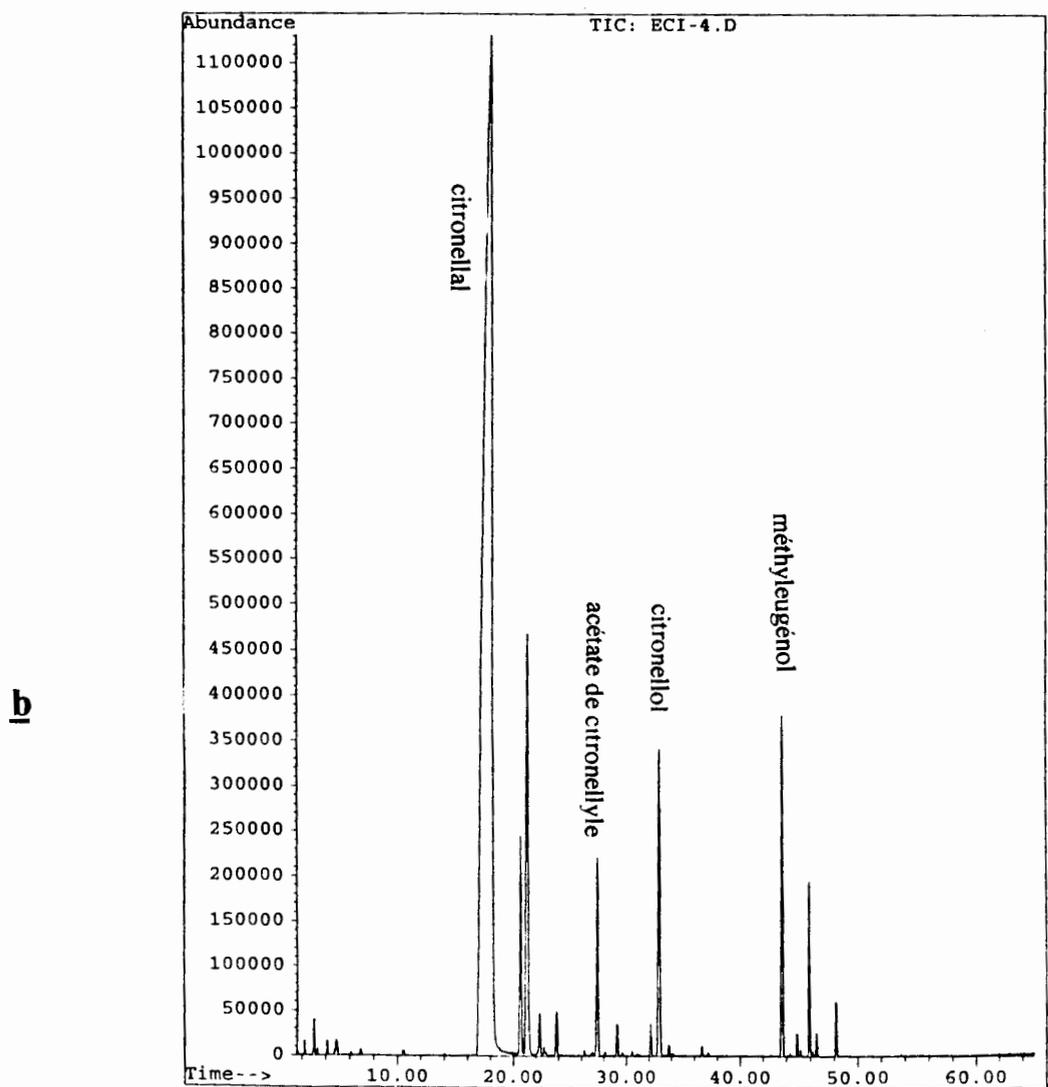
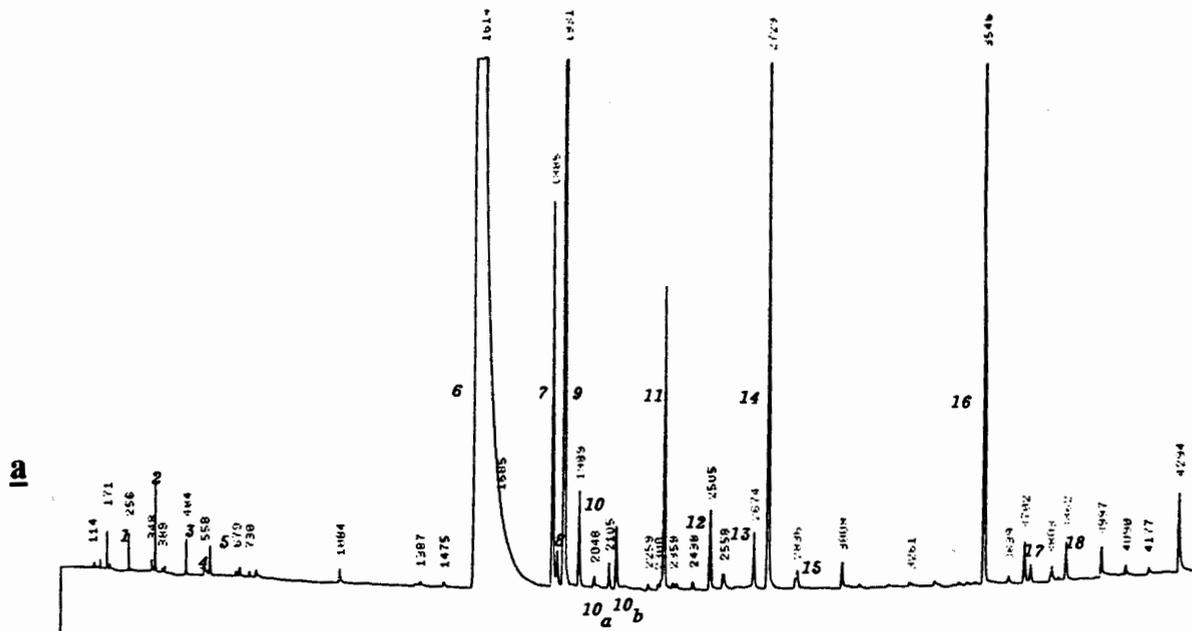


Tableau 24a: Variation de la composition chimique de l'huile essentielle d'*E. citriodora* : site de Calavi

COMPOSÉS IDENTIFIÉS	PÉRIODES DE RÉCOLTE											
	Jan	Fév	Mar	Av	Mai	Juin	Juil	Ao	Sept	Oct	Nov	Déc
1- α -pinène	0,3	0,2	tr	0,14	0,13	0,2	0,20	0,20	0,20	0,40	0,80	0,10
2- β -pinène	0,7	0,13	0,30	0,30	0,40	0,60	0,60	0,60	0,60	0,56	0,80	0,36
3-myrcène	0,2	0,44	0,10	tr	tr	tr	0,16	0,15	0,16	tr	0,09	0,10
4-limonène	tr	0,66	tr	0,09	tr	tr	0,07	tr	tr	tr	0,17	0,20
5-1,8-cinéole	tr	0,5	0,30	0,43	tr	tr	0,08	tr	tr	tr	0,10	0,80
6-citronellal	80,5	81,7	78,0	79,04	85,9	87,03	85,9	81,10	81,70	84,80	82,0	76,40
7-néo-isopulégol	2,4	1,9	1,70	1,60	2,00	1,80	1,50	2,70	1,10	2,20	1,80	1,90
8-linalol	1,7	0,80	0,60	1,90	1,60	1,30	1,46	1,30	1,30	1,00	1,10	0,80
9-isopulégol	6,5	4,90	4,30	5,80	5,60	4,60	4,30	6,20	3,20	5,00	4,60	4,80
10-trans-caryophyllène	0,98	0,50	0,05	tr	tr	tr	1,00	0,70	0,50	0,45	0,80	0,80
10a-iso-isopulégol*	0,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,60	tr	tr	0,10	tr
10b-néo-iso-isopulégol*	0,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,40	tr	tr	0,30	tr
11-acétate de citronellyle	tr	1,50	2,20	0,17	0,10	tr	tr	tr	-	tr	tr	5,70
12- γ -élémane	tr	0,20	tr	-	tr	-	tr	0,08	-	-	0,10	0,09
13-acétate de géranyle	-	0,20	-	tr	0,20	tr	tr	tr	-	-	-	-
15-citronellol	3,5	3,50	6,80	3,95	3,20	3,25	3,60	4,20	3,10	4,30	3,50	6,80
15-acétate de phénylethyle	tr	0,14	tr	0,08	-	tr	tr	0,10	tr	tr	0,08	tr
16-méthyleugénol	tr	0,50	0,01	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr
17-p-mentha-3, 8-diol**	-	0,04	0,02	-	-	tr	-	-	-	-	0,05	tr
18-p-mentha-3, 8-diol**	-	0,1	tr	-	tr	-	-	-	-	-	0,09	tr

* : Présents dans tous les échantillons d'huiles essentielles d'*Eucalyptus citriodora*

** : Isomères non identifiés

Tableau 24 b : Variation des composés majoritaires de l'huile essentielle d'E.
citriodora : Site de Calavi

	néo-isopu.	citronellol	isopulégol	citronellal
Janvier	2.4	3.5	6.5	80.5
Février	1.9	3.5	4.9	81.7
Mars	1.7	6.8	4.3	78
Avril	1.6	3.95	5.8	79.04
Mai	2	3.2	5.6	85.9
Juin	1.8	3.25	4.6	87.03
Juillet	1.5	3.6	4.3	85.9
Août	2.7	4.2	6.2	81.1
Sept	1.1	3.1	3.2	81.7
Oct	2.2	4.3	5	84.8
Nov	1.8	3.5	4.6	82
Déc	1.9	6.8	4.8	76.4

Graphe 14 : Histogramme de variation des composés majoritaires de l'huile essentielle d'E.
citriodora:site de Calavi

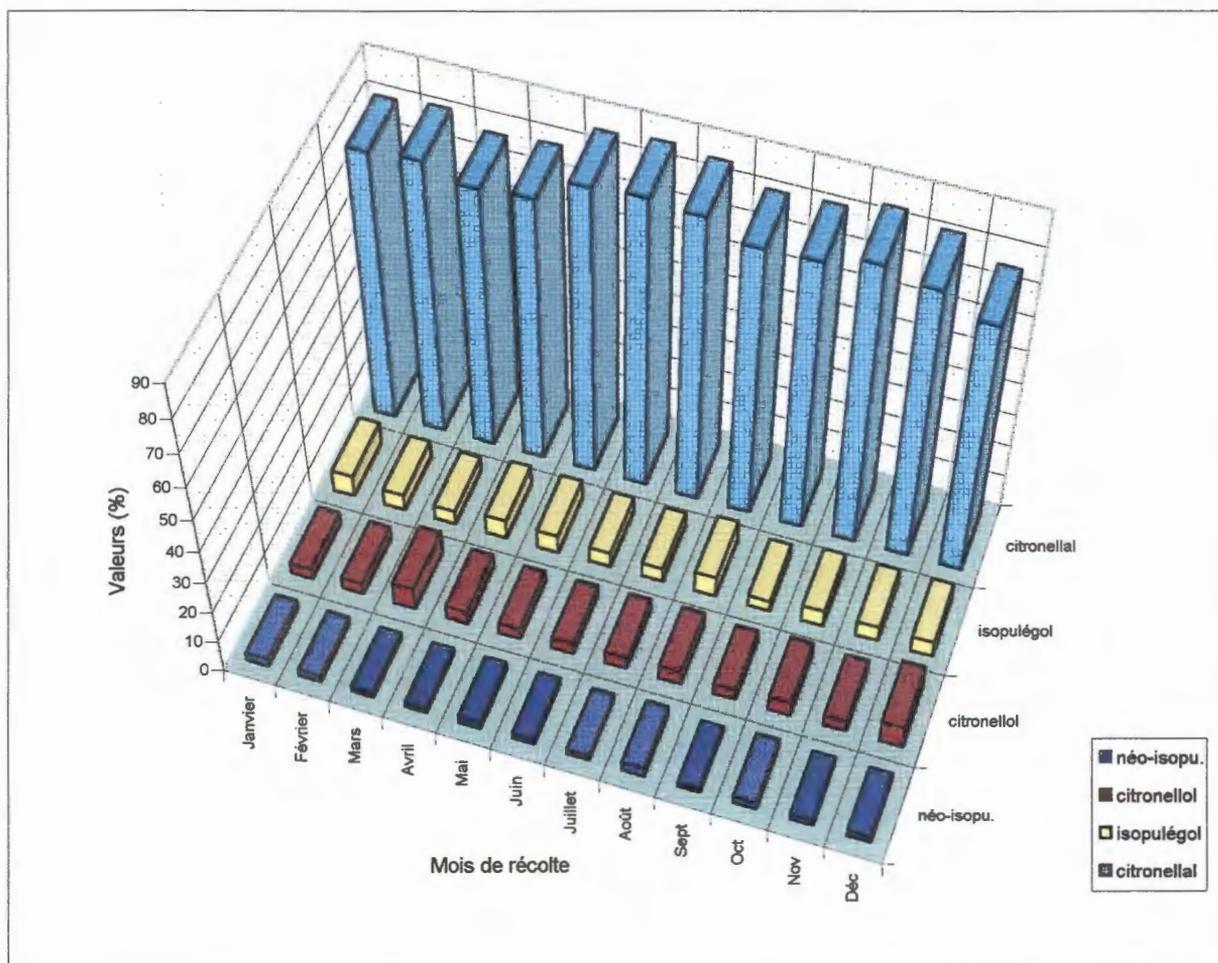


Tableau 25a: Variation de la composition chimique de l'huile essentielle de *E. citriodora* : site de Kétou

COMPOSÉS IDENTIFIÉS	PÉRIODES DE RÉCOLTE											
	Jan	Fév	Mar	Av	Mai	Juin	Juil	Ao	Sept	Oct	Nov	Déc
1- α -pinène	0,4	0,3	0,1	0,24	0,23	0,3	0,35	0,30	0,33	0,30	0,80	0,20
2- β -pinène	0,81	0,21	0,42	0,33	0,51	0,59	0,61	0,71	0,70	0,65	0,89	0,47
3-myrcène	0,3	0,54	0,20	0,03	0,06	0,04	0,25	0,26	0,24	0,02	0,09	0,10
4-limonène	0,1	0,76	0,16	0,19	0,09	0,1	0,17	0,08	0,1	0,13	0,27	0,30
5-1,8-cinéole	0,11	0,59	0,41	0,53	0,12	tr	0,08	0,1	0,12	0,16	0,10	0,80
6-citronellal	63,62	61,63	62,14	64,02	74,44	82,19	80,88	77,03	76,12	80,22	77,59	65,52
7-néo-isopulégol	2,51	2,01	1,82	1,77	2,15	1,93	1,62	2,81	1,22	2,33	1,92	2,03
8-linalol	1,81	0,89	0,72	2,09	1,73	1,43	1,56	1,40	1,41	1,11	1,12	0,92
9-isopulégol	12,79	13,81	10,53	9,22	7,46	5,37	4,30	5,72	6,64	4,65	5,50	8,32
10-trans-caryophyllène	0,97	0,53	0,05	tr	tr	tr	1,09	0,78	0,56	0,55	0,79	0,80
10a-iso-isopulégol*	0,2	0,09	0,13	tr	0,1	tr	tr	0,60	tr	tr	0,10	0,13
10b-néo-iso-isopulégol*	0,31	tr	0,08	0,1	tr	0,07	tr	0,50	tr	0,09	0,30	tr
11-acétate de citronellyle	0,1	1,56	4,43	0,27	0,21	tr	0,15	tr	0,03	0,1	1,6	5,70
12- γ -élémane	0,05	0,23	0,07	tr	0,13	tr	0,1	0,08	tr	-	0,10	0,09
13-acétate de géranyle	tr	0,29	tr	-	0,32	tr	-	0,11	tr	-	tr	-
14-citronellol	12,03	12,78	12,91	10,90	8,54	4,64	4,11	5,37	5,89	4,35	5,40	9,67
15-acétate de phénylthyle	0,05	0,19	0,08	tr	tr	-	0,10	tr	0,05	tr	0,11	tr
16-méthyleugénol	0,26	0,49	0,01	tr	-	tr	tr	-	-	0,06	tr	tr
17-p-mentha-3, 8-diol**	-	0,04	0,02	-	-	tr	-	tr	0,03	-	0,05	tr
18-p-mentha-3, 8-diol**	tr	0,1	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	0,8	tr

Tableau 25 b :Variation de la composition chimique de l'huile essentielle d'E.citriodora:

Site de Kétou

	néo-isopu.	citronellol	isopulégol	citronellal
Janvier	2.51	12.03	12.79	63.62
Février	2.01	12.78	13.81	61.63
Mars	1.82	12.91	10.53	62.14
Avril	1.77	10.9	9.22	64.02
Mai	2.15	8.54	7.46	74.44
Juin	1.93	4.64	5.37	82.19
Juillet	1.62	4.11	4.3	80.88
Août	2.81	5.37	5.72	77.03
Sept	1.22	5.89	6.64	76.12
Oct	2.33	4.35	4.65	80.22
Nov	1.92	5.4	5.5	77.59
Déc	2.03	9.67	8.32	65.52

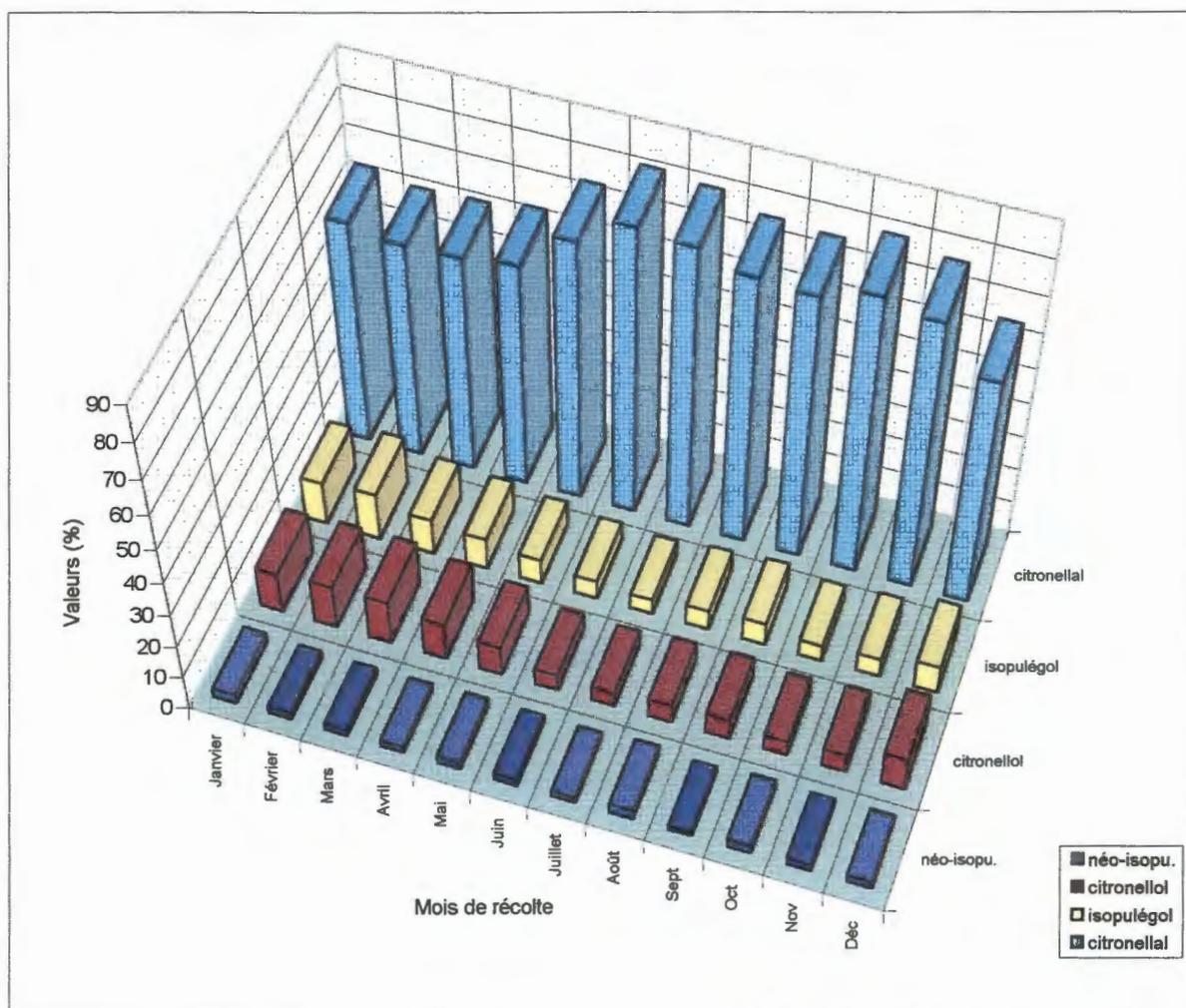
Graphe 15 :Histogramme de variation des composés majoritaires de l'huile essentielle d'E. citriodora:site de Kétou

Tableau 26a : Variation saisonnière de la composition chimique de l'huile essentielle d'E. citriodora : site de Tovo (mai 1996-mars 1997)

COMPOSÉS IDENTIFÉS	PÉRIODES DE RÉCOLTE					
	G S P		P S S	P S P	G S S	
	Mai	Juillet	Septembre	Novembre	Janvier	Mars
1- α -pinène	0,20	0,20	0,40	0,20	0,85	0,63
2- β -pinène	0,20	0,20	0,40	0,30	0,80	0,60
3-myrcène	0,26	0,20	0,50	0,26	0,96	0,73
4-limonène	0,40	0,37	0,80	0,40	1,30	1,05
5-1,8cinéole	2,90	2,90	5,80	3,80	9,50	7,80
6-citronellal	72,60	72,10	67,60	70,40	63,60	65,30
7-néo-isopulégol	2,80	3,10	4,70	3,70	3,90	4,30
8-linalol	0,15	0,10	0,17	0,10	0,25	0,22
9-isopulégol	6,80	8,10	10,30	9,30	7,50	8,90
10-trans-caryophyllène	2,10	1,50	1,10	1,10	0,57	0,84
10a-iso-isopulégol*	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
10b-néo-iso-isopulégol*	0,50	0,50	0,60	0,50	0,40	0,70
11-acétate de citronellyle	0,40	0,37	0,26	0,35	0,09	0,15
12- γ -élémane	0,30	0,20	0,10	0,15	0,06	0,10
13-acétate de géranyle	tr	tr	tr	tr	tr	tr
14-citronellol	7,30	7,60	4,17	6,60	2,10	3,15
15-acétate de phénylethyle	tr	tr	0,05	0,06	tr	tr
16-méthyleugénol	tr	tr	0,07	tr	tr	tr
17-p-mentha-3,8-diol**	tr	tr	tr	0,02	tr	tr
18-p-mentha-3,8-diol**	tr	tr	0,04	tr	tr	tr

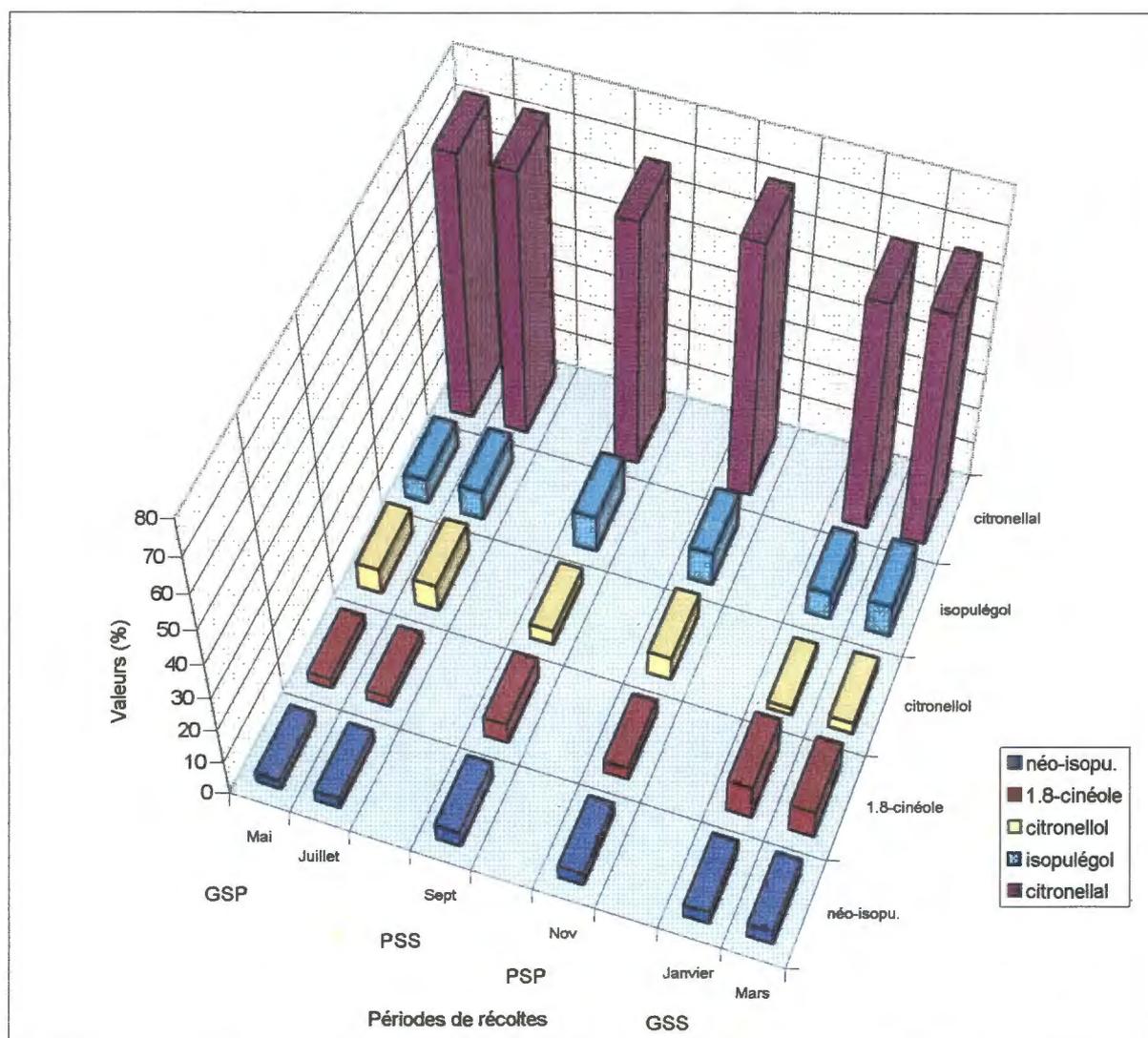
* : Présents dans tous les échantillons d'huiles essentielles d'*Eucalyptus citriodora*

** : Isomères non identifiés

Tableau 26b : Variation saisonnière des composés majoritaires de l'huile essentielle d'E. citriodora : site de Tovo (Mai 1996 -Mars 1997)

		néo-isopu.	1.8-cinéole	citronellol	isopulégol	citronellal
GSP	Mai	2.8	2.9	7.3	6.8	72.6
	Juillet	3.1	2.9	7.6	8.1	72.1
PSS	Sept	4.7	5.8	4.17	10.3	67.6
PSP	Nov	3.7	3.8	6.6	9.3	70.4
GSS	Janvier	3.9	9.5	2.1	7.5	63.6
	Mars	4.3	7.8	3.15	8.9	65.3

Graphe 16 : Histogramme de variation saisonnière des composés majoritaires de l'huile essentielle d'E. citriodora: Site de Tovo (Mai 1996 -Mars 1997)



II-5-3- INFLUENCE DU LIEU ET DE LA PÉRIODE DE RÉCOLTE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE

On remarque que l'huile essentielle d'*E. citriodora* en provenance de Calavi est plus riche en citronellal (>76%) que celle d'origine de Kétou (tableau 27, graphe 17). La différence la plus importante, de 11 à 20%, couvre toute la grande saison sèche et s'étend jusqu'au début de la grande saison des pluies (décembre à avril). De mai à novembre, leurs teneurs sont presque voisines: $\Delta \approx 5\%$, excepté le mois de mai. Elles varient mensuellement de 76 à 86%. Parallèlement, les proportions d'isopulégol diminuent de 7,5 à 3,2% et de 13,8 à 4,3% sur les sites de Calavi et Kétou, de même que celles du citronellol de 13,8 à 4,1% uniquement sur le site de Kétou et tournent presque autour de 3,5% sur le site de Calavi.

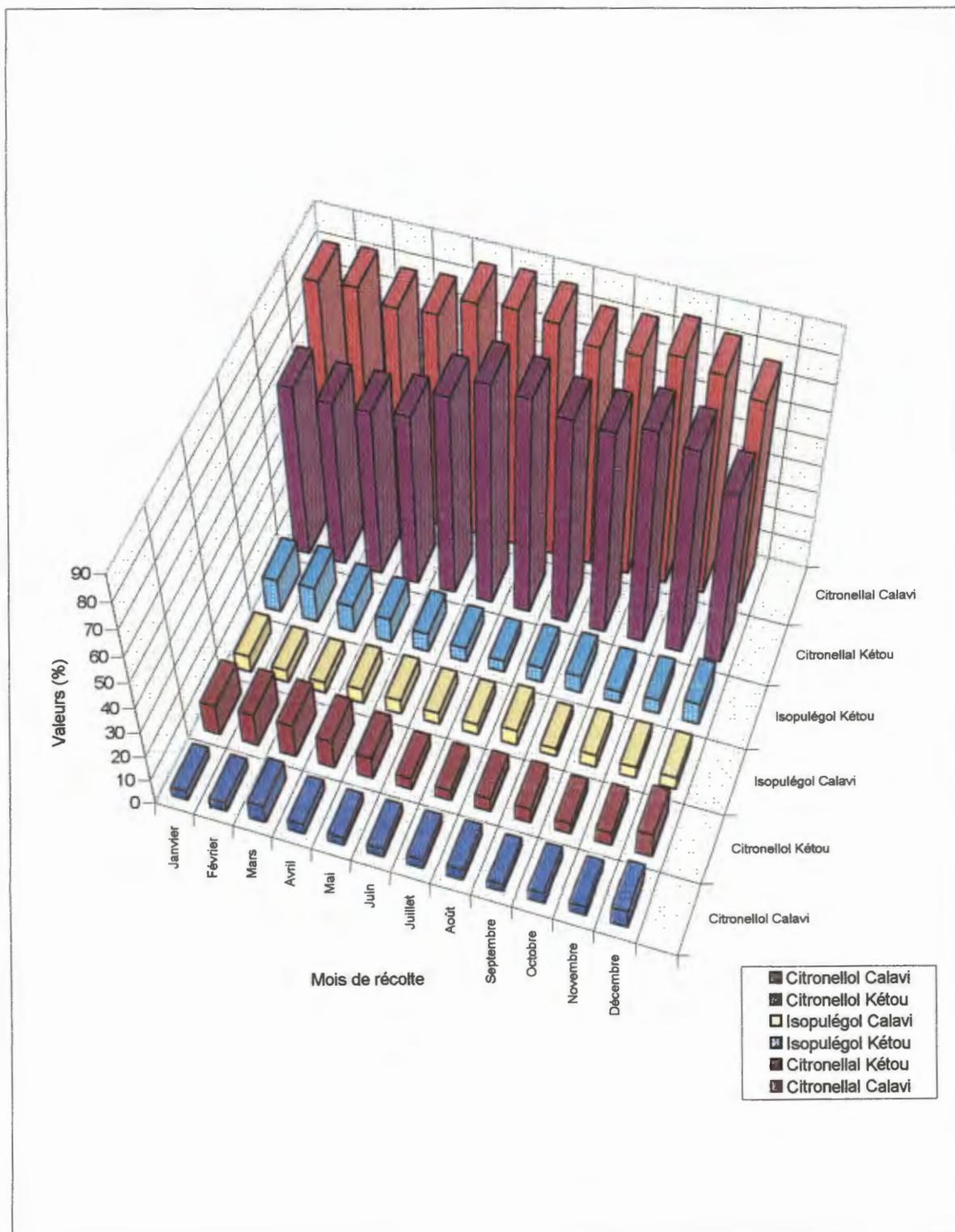
Les baisses des taux de citronellal semblent se compenser par les hausses des taux en isopulégol et en citronellol. La somme de ces composés tourne autour d'une moyenne de 91% pour le site de Calavi et de 88% pour le site de Kétou.

Tableau 27 :

Variation des composés majoritaires des huiles essentielles d'*E. citriodora* sur les sites de Calavi et de Kétou.

Constituants Majoritaires	Lieux de récolte	GSS			GSP				PSS		PSP		GSS
		Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Ao	Sept	Oct	Nov	Déc
Citronellal	Calavi	80,5	81,7	78,0	79,0	85,9	87,0	85,9	81,1	81,7	84,7	82,0	76,4
	Kétou	63,6	61,6	62,1	64,0	74,4	82,2	80,9	77,0	76,1	80,2	77,6	65,5
Isopulégol	Calavi	6,5	4,9	4,3	5,8	5,6	4,6	4,3	6,2	3,2	5,0	4,6	4,8
	Kétou	12,8	13,8	10,5	9,22	7,46	5,37	4,30	5,72	6,64	4,65	5,50	8,32
Citronellol	Calavi	3,5	3,5	6,8	3,95	3,2	3,35	3,6	4,2	3,1	4,3	3,5	6,8
	Kétou	12	13,8	12,9	10,9	8,54	4,63	4,11	5,37	5,9	4,35	5,40	9,67
Total	Calavi	90,4	90,2	89,1	88,8	94,7	95	93,8	91,5	88,0	94,0	90,1	88,0
	Kétou	88,4	88,3	85,5	84,1	90,4	92,2	89,3	88,1	88,6	89,2	88,5	83,5

Graphe 17: Histogramme de comparaison des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*E. citreodora* des sites de Calavi et de Kétou



II-5-4- INFLUENCE DE L'AGE DE LA PLANTE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE

Douze prélèvements de parties aériennes ont été effectués dans le jeune peuplement d'*E. citriodora* de Kansoukpa à partir de 6 mois après la mise en terre jusqu'à 27 mois. Les résultats analytiques des huiles essentielles révèlent une faible augmentation des taux de citronellal qui passe de 72% à l'âge de 6 mois à 80% à l'âge de 27 mois avec des maxima allant jusqu'à 85% (mois de juillet, grande saison des pluies). On remarque qu'à l'âge de 10 mois, le taux de citronellal atteint déjà plus de 82% (mois de juin, grande saison des pluies).

Quant aux autres composés majoritaires, leurs pourcentages élevés au début, diminuent pendant la croissance de la plante. Le méthyl eugénol (2 à 4,7%), absent dans les échantillons d'huile provenant des feuilles adultes, se retrouve dans les jeunes plants.

Les résultats montrent que l'*E. citriodora* du Bénin sur le site de Kansoukpa est caractérisé par une huile essentielle suffisamment riche en citronellal (82,4%) dès l'âge de 10 mois avec un rendement en huile de 3,6% et qu'il est influencé par la saison des pluies.

Tableau 28a:

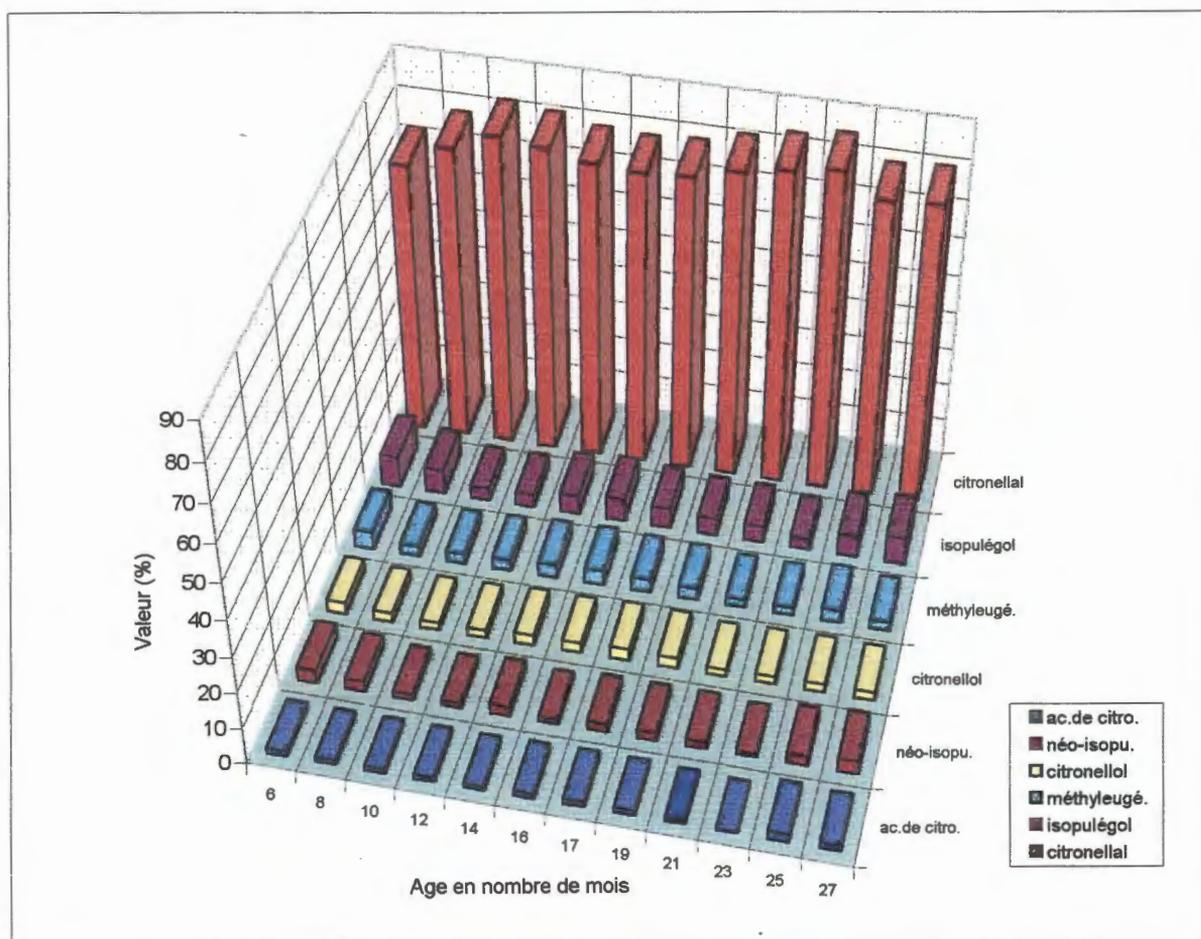
Variation en fonction de l'âge de la composition chimique de l'huile essentielle d'*E. citriodora* du site de Kansoukpa (février 1995-novembre 1996)

COMPOSÉS IDENTIFÉS	AGE (en nombre de mois), MOIS DE RÉCOLTE											
	6 Fev	8 Avr	10 Juin	12 Août	14 Oct	16 Déc	17 Janv	19 Mars	21 Mai	23 Juil	25 Sept	27 Nov
1- α -pinène	0,08	0,23	0,24	0,15	0,10	0,10	tr	0,01	0,13	tr	tr	0,25
2- β -pinène	0,26	0,30	0,26	0,20	0,30	0,15	0,20	0,26	0,30	tr	0,40	0,60
3-myrcène	0,10	0,20	0,20	0,20	0,10	0,05	tr	0,20	0,11	0,20	0,16	0,20
4-limonène	0,03	0,20	0,20	0,30	0,05	0,13	tr	0,05	0,09	0,10	0,10	0,40
5-1,8-cinéole	0,10	0,30	0,26	0,30	0,13	0,20	0,10	0,10	0,17	0,50	0,40	0,30
6-citronellal	72,20	77,91	82,40	81,05	78,80	78,10	78,70	81,55	83,5	85,20	79,30	80,13
7-néo-isopulégol	3,80	2,85	1,50	1,40	2,50	1,20	2,10	2,05	1,90	1,30	2,70	3,60
8-linalol	0,25	0,26	0,20	0,30	tr	0,47	0,14	0,10	0,17	0,25	0,16	0,20
9-isopulégol	8,40	6,60	3,35	3,40	5,30	6,20	5,40	4,50	4,40	3,00	5,90	7,30
10-trans-caryophyllène	0,50	0,45	0,74	0,60	0,80	0,30	0,60	0,72	0,50	0,90	0,50	0,50
10a-iso-isopulégol*	0,20	tr	tr	tr	tr	tr	0,14	tr	tr	tr	0,10	0,10
10b-néo-iso-isopulégol*	0,60	tr	tr	tr	0,35	0,24	0,40	0,30	tr	0,10	0,30	0,50
11-acétate de citronellyle	1,40	1,30	1,30	1,33	1,20	1,50	1,60	1,50	1,10	0,30	2,30	1,60
12- γ -élémane	0,40	0,50	0,50	0,30	0,60	tr	0,50	0,63	0,25	tr	0,50	0,40
13-acétate de géranyle	0,30	0,14	0,30	0,30	0,30	tr	0,30	0,23	0,30	0,30	0,20	0,15
14-citronellol	3,30	2,50	2,01	2,10	2,80	2,70	3,10	2,90	1,85	2,20	2,40	2,20
15-acétate de phénylethyle	tr	0,10	0,13	0,13	tr	0,10	0,10	tr	0,11	tr	tr	tr
16-méthyleugénol	4,70	2,70	2,60	3,00	3,70	3,90	3,50	3,10	2,20	2,00	3,40	2,30
17-p-mentha-3,8-diol*	0,16	tr	0,08	0,05	tr	0,10	0,20	0,10	0,04	-	-	-
18-p-mentha-3,8-diol*	0,20	0,09	0,10	0,04	tr	0,10	0,20	0,10	0,08	-	-	-

Tableau 28b : Variation en fonction de l'âge des composés majoritaires de l'huile essentielle d'E. citriodora du site de Kansoukpa (Février 1995-Novembre 1996)

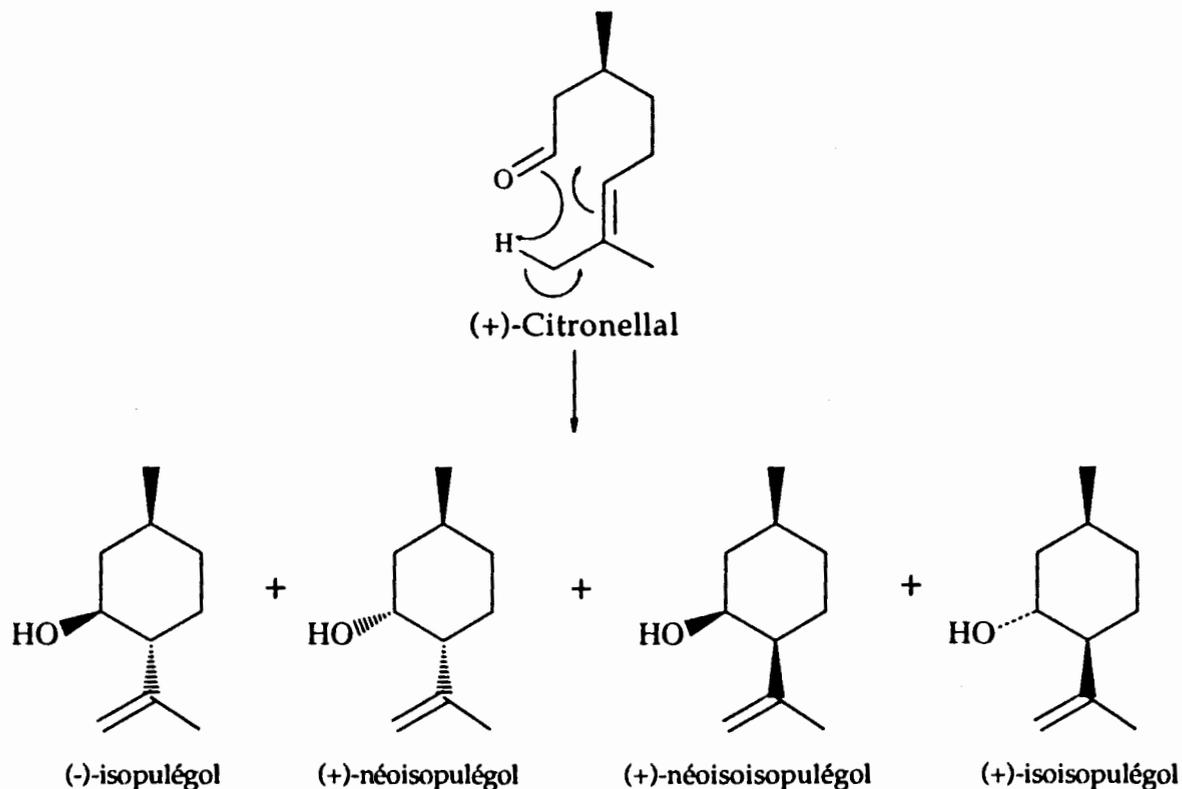
		ac.de citro.	néo-isopu.	citronellol	méthyleugé.	isopulégol	citronellal
Février	6	1.4	3.8	3.3	4.7	8.4	72.2
avril	8	1.3	2.85	2.5	2.7	6.6	77.91
Juin	10	1.3	1.5	2.01	2.6	3.35	82.4
Août	12	1.33	1.4	2.1	3	3.4	81.05
Oct	14	1.2	2.5	2.8	3.7	5.3	78.8
Déc	16	1.5	1.2	2.7	3.9	6.2	78.1
Janvier	17	1.6	2.1	3.1	3.5	5.4	78.7
Mars	19	1.5	2.05	2.9	3.1	4.5	81.55
Mai	21	1.1	1.9	1.85	2.2	4.4	83.5
Juillet	23	0.3	1.03	2.2	2	3	85.2
Sept	25	2.3	2.7	2.4	3.4	5.9	79.3
Nov	27	1.6	3.6	2.2	2.3	7.3	80.13

Graphe 18: Histogramme de variation en fonction de l'âge des composés majoritaires de l'huile essentielle d'E. citriodora du site de Kansoukpa (Février 1995-Novembre 1996)

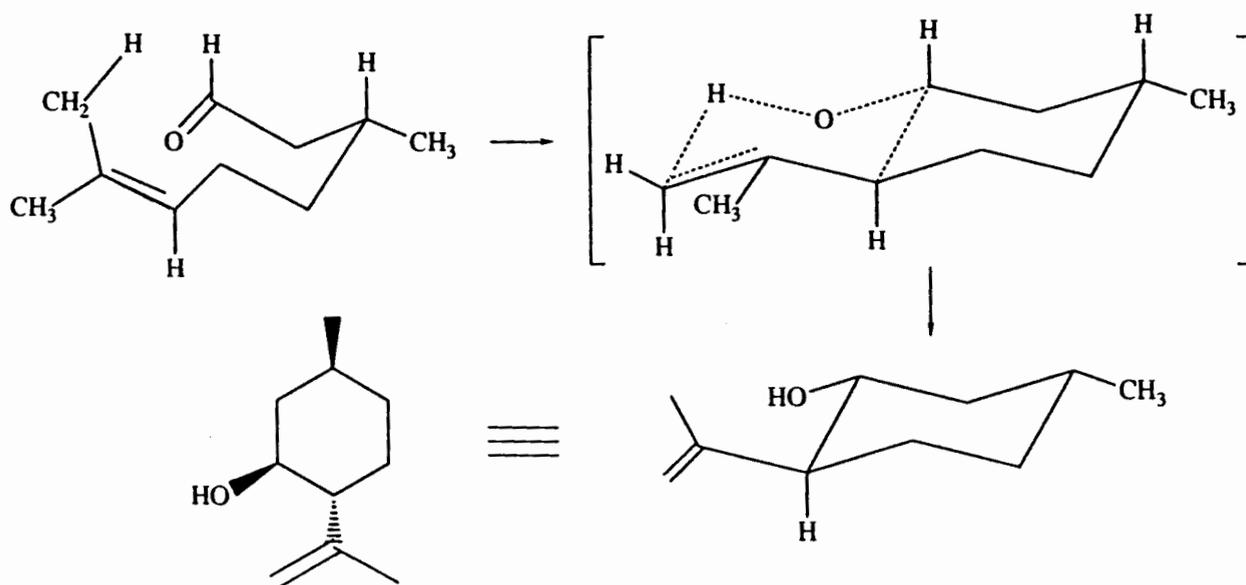


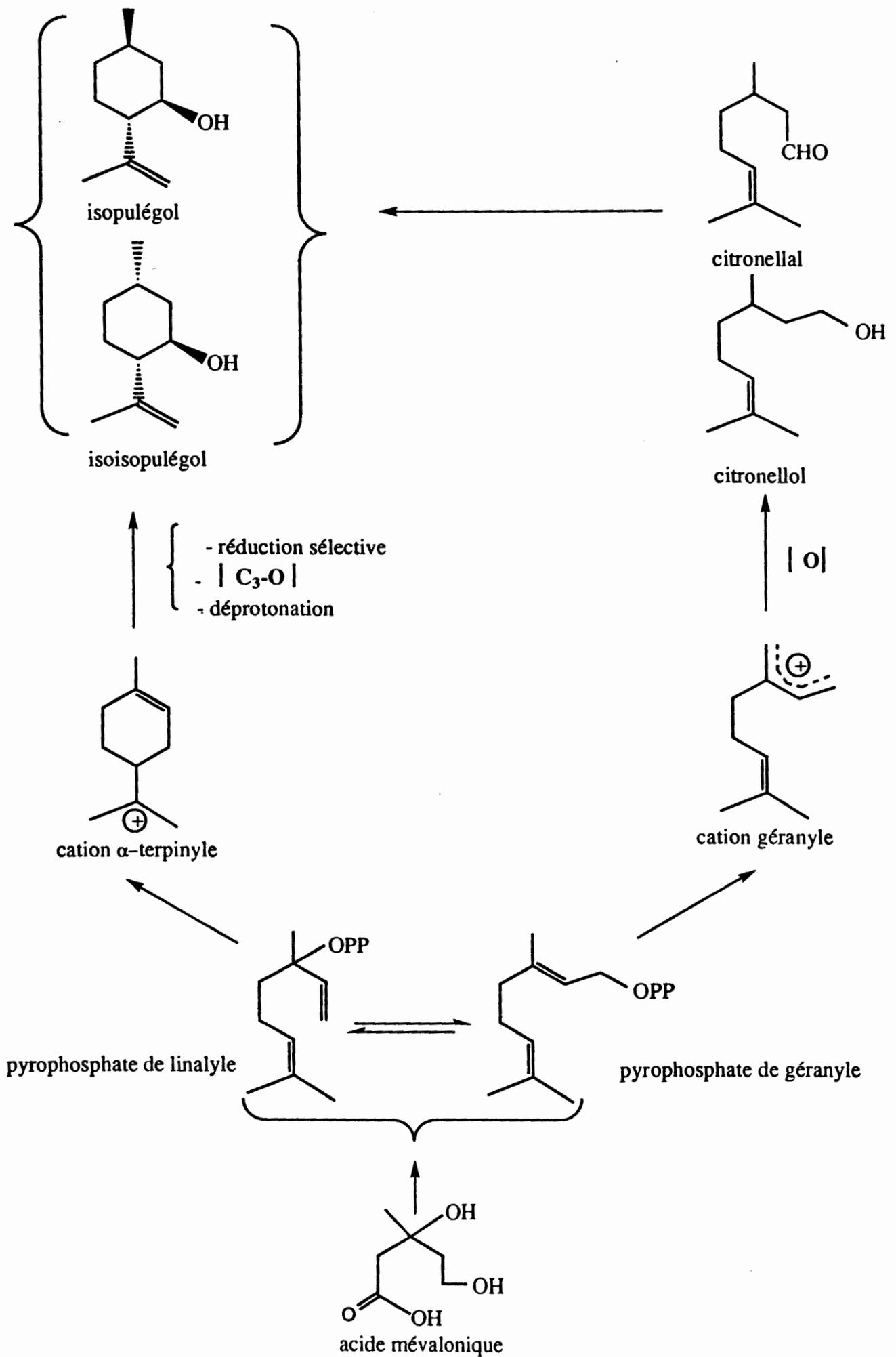
Formation de l'isopulégol et de trois de ses isomères

L'isopulégol et ses isomères peuvent être obtenus à partir du (+)-citronellal en milieu acide selon le schéma réactionnel suivant:



La préférence pour le (-)-isopulégol est en accord avec la structure de l'état de transition que l'on peut représenter en l'assimilant à celui admis pour une ène-réaction:





II-5-5- COMPARAISON DE NOS RÉSULTATS AVEC CEUX DE LA LITTÉRATURE

Dans le but de situer les huiles essentielles d'*E. citriodora* du Bénin que nous avons étudiées par rapport aux essences étrangères, nous avons comparé nos échantillons à ceux des auteurs.

Par leurs taux de citronellal d'environ 80% et d'isopulégol atteignant 7,5%, les huiles essentielles de Calavi et de Kansoukpa ressemblent aux échantillons de l'Inde (165) et d'Australie (92). Ils s'en différencient par leurs taux de citronellol généralement plus faible, 2,2% à Kansoukpa et 3% à Calavi.

A Tovo, le taux de citronellal qui oscille entre 63,6 et 72,6% le rapproche de l'échantillon de Madagascar (131) mais avec une teneur plus élevée en isopulégol (environ 7%), alors que cette teneur est entre 16,6 et 18% à Madagascar. Les échantillons en provenance de Kétou ressemblent beaucoup plus à l'échantillon de Madagascar que celui de la Chine (162).

II-5-6- CONCLUSION

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus citriodora* d'origine béninoise montre l'existence d'un taux élevé en citronellal (>80%) sur le site de Calavi.

Compte tenu d'une part, de l'influence du lieu et de la période de récolte et d'autre part, de l'influence de l'âge de la plante sur la composition chimique de l'huile, une huile essentielle de qualité de teneur élevée en citronellal peut être obtenue de mai à juillet et avec un rendement de 4 à 6% lorsque le végétal provient de Calavi. Les caractéristiques des huiles obtenues correspondent à celles retenues par les normes AFNOR et ISO et peuvent permettre d'atteindre des débouchés en parfumerie. Sa vulgarisation au Bénin mérite d'être encouragée car elle peut présenter pour le pays un intérêt économique important.

II-6- *EUCALYPTUS GLOBULUS* LABILL

II-6-1- ASPECT BOTANIQUE

Eucalyptus globulus est un arbre qui se développe très rapidement avec un port général pyramidal dans le jeune âge et en vieillissant, ses ramifications sont mal équilibrées.

Son écorce s'exfolie en grandes plaques sur le tronc. En dessous de cette écorce détachée, le tronc apparaît lisse, de couleur gris ardoisée. C'est un arbre qui se brise aisément sous l'action de vents un peu forts.

Les feuilles jeunes sont polymorphes selon qu'elles proviennent des jeunes plants ou de rameaux plus âgés. Les feuilles jeunes opposées, sont disposées horizontalement sur les rameaux, ovales oblongues, à pétioles très courts, pratiquement sessiles et embrassantes, blanchâtres et pruneuses. Elles sont portées par des tiges quadrangulaires ailées.

Les feuilles adultes sont persistantes, alternes, coriaces, en forme de faux très acuminées, non spitées, pétiolées. Le limbe à faces semblables est entier, atténué et oblique à la base. Elles sont disposées verticalement par rapport aux rameaux et sont portées par des tiges cylindriques.

Les feuilles renferment de l'huile essentielle dont le constituant principal est le 1,8-cinéole. Il est accompagné de carbures terpéniques (α et β pinène, camphène, p-cymène...), de carbures sesquiterpéniques (aromadendrène, alloaromadendrène) et d'alcools (α -terpinol, terpinène 4-ol, globulol...)

Les feuilles jeunes fournissent une essence caractérisée par une abondance d'hydrocarbures monoterpéniques et une légère augmentation du taux de 1,8-cinéole.

Planche 5 : *Eucalyptus globulus* du Bénin



Les feuilles âgées donnent une essence où le taux d' α - terpinéol, d'acétate d' α - terpényle et de globulol augmente, ce qui confirme l'hypothèse de la biosynthèse tardive de ces dérivés oxygénés.

II-6-2- EMPLOIS

L'huile essentielle extraite des feuilles est beaucoup utilisée en pharmacie, en cosmétique et autres, à cause de ses propriétés antiseptiques et bactéricides.

Le tableau 29 résume son utilisation dans le domaine de la santé.

Tableau 29:

Eucalyptus globulus ; champs d'action de l'huile essentielle

Domaine d'intervention	Champs d'action	Voies
Pneumologie	Bronchite (catarrhale bactérienne)	Cutanée à visée mucolytique expectorante et anti infectieuse respiratoire (facultative)
O.R.L.	Pharyngite, rhinite rhinopharyngite sinusite	Respiratoire (facultative)
Dermatologie	Mycoses cutanées	Cutanée (à visée antifongique)
	Dermites bactériennes et candidosique	Cutanée, orale
Ophthamologie	Conjonctivite infectieuse	Bain oculaire

II-6-3- HUILES ESSENTIELLES D'E. *GLOBULUS* : TRAVAUX ANTÉRIEURS

La plupart des travaux antérieurs donnent le 1,8-cinéole comme étant le composé principal (47,0 à plus de 70,0%) de l'essence. Les alcools sesquiterpéniques représentatifs sont les α -, β - et γ -eudesmols avec un taux total entre 1 et 13,0%.

En 1981, les travaux de S. FRAZAO (180), sur l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* du Portugal ont montré qu'elle est essentiellement riche en 1,8-cinéole (78,4%), surtout celle obtenue à partir des feuilles adultes.

AHMADOUCH et coll. (156) identifient, en 1985, le 1,8-cinéole (66%) et l' α -pinène (5,2%) comme produits majoritaires.

Le 1,8-cinéole et l' α -pinène sont les deux constituants reconnus majoritaires dans l'échantillon en provenance de l'Afrique du Sud (48,7 et 28,6%) (145), du Burundi (63,8 et 8,8%) (147) et d'Uruguay (64,5 et 23,9%) (154).

En 1995, J. C. CHALCHAT et al. (179) annoncent la présence de 1,8-cinéole (71,2%), du p-cymène (8,2%) et d' α -pinène (6,2%) dans l'essence d'*Eucalyptus globulus* de Rwanda.

D. J. BOLAND et coll. (92) trouvent dans l'espèce cultivée en Australie, le 1,8-cinéole (69,3%) et l' α -pinène (10,7%) comme composés principaux.

Dans un échantillon béninois, M. A. AYEDOUN (149) a identifié le 1,8-cinéole à un pourcentage de 56,7%, le p-cymène à 10,5% et l' α -pinène à 7,1%.

BAKER et SMITH (1920) (104) puis après GILDEMEISTER et HOFFMANN (1961) (184) ont trouvé l'espèce *globulus subsp. globulus* (Syn. *Eucalyptus gigantea*) caractérisée par les constituants comme 1,8-cinéole, α -pinène, l-pinocarvéol, α -terpinéol, aldéhyde isovalérique globulol et des sesquiterpènes.

1,8-cinéole (38-65%), α -pinène, α -, β -, γ -eudesmols sont les constituants caractéristiques mis en évidence par PENFOLD et MORRISON (1930) dans l'espèce *Eucalyptus globulus subsp bicostata* (Syn. *Eucalyptus bicostata*) (182).

Dans les fruits de cette espèce, MISHIMURA et al. (1979) identifient l'aromadendrène, le globulol, le 1,8-cinéole et l'alloaromadendrène comme constituants majeurs (183).

Toujours dans les fruits, BASLAS et SAXENA (1984) caractérisent 1,8-cinéole (73%) comme constituant majoritaire. Ils identifient 27 autres composés dont le méthyl eugénol, et le carvacrol (184).

II-7- HUILES ESSENTIELLES D'EUCALYPTUS GLOBULUS DU BÉNIN : NOS TRAVAUX

L'*E. globulus* est une espèce très peu représentative au Bénin. On la trouve souvent disséminer dans les plantations d'*E. camaldulensis* et aux bords des routes comme arbres ornementaux.

II-7-1- COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'E. GLOBULUS DU BÉNIN

Nous avons étudié la composition chimique de deux échantillons provenant des sites de Sèmè et Pahou. Les parties aériennes ont été récoltées en août 1996.

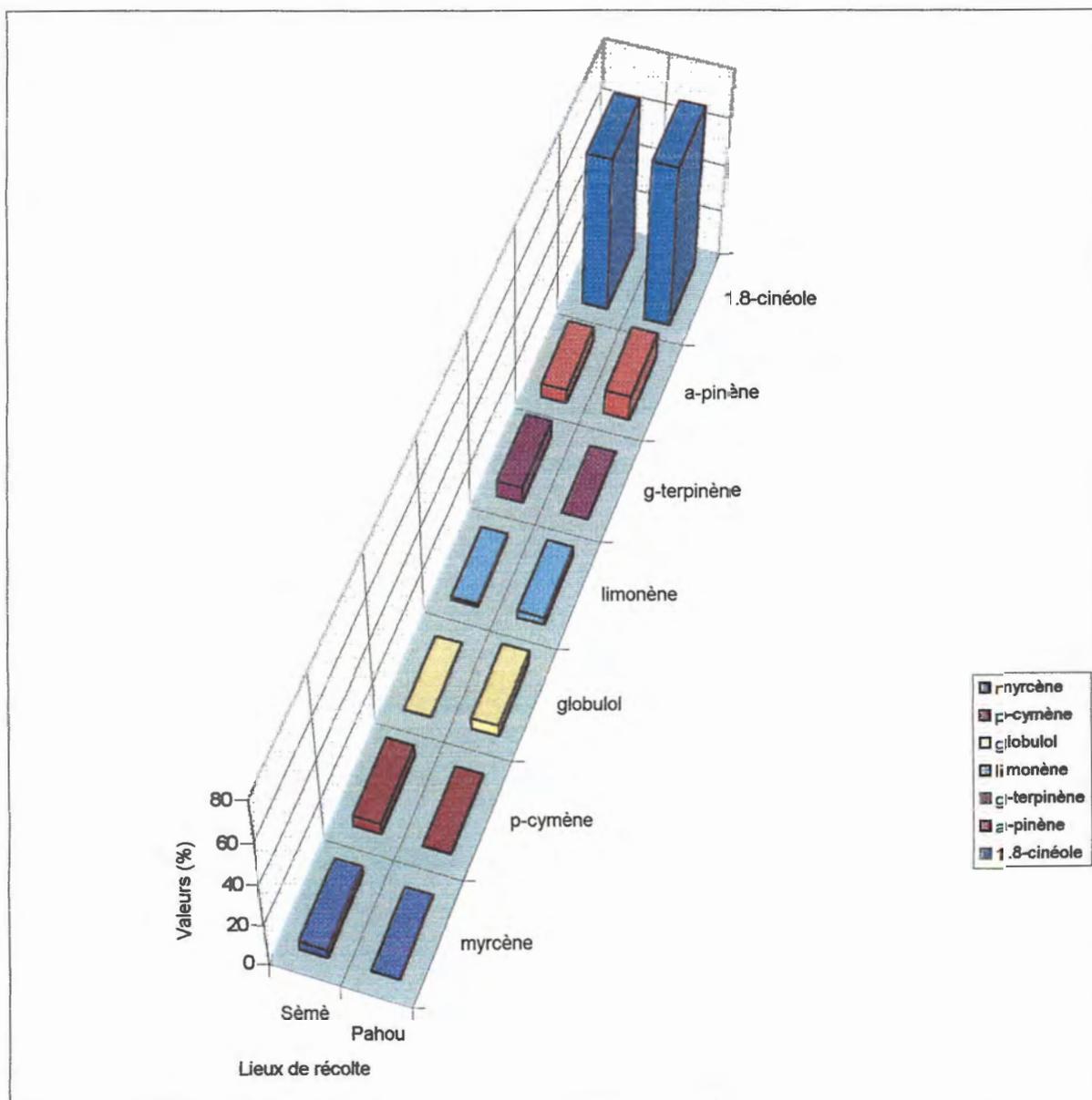
Les rendements en huiles essentielles obtenues par entraînement à la vapeur sont de 1,2% pour le site de Sèmè et 1,4% pour celui de Pahou.

Tableau 30a: Composition chimique des huiles essentielles d'*E. globulus* du Bénin

COMPOSÉS	LIEUX DE RÉCOLTE	
	SÈMÈ	PAHOU
α-pinène	6,1	10,66
α -thujène	0,20	tr
camphène	tr	0,03
β -pinène	0,60	0,18
sabinène	0,30	0,01
α -phellandrène	tr	0,09
myrcène	4,0	tr
limonène	1,33	3,3
1,8-cinéole	65,70	69,10
γ-terpinène	6,90	0,06
p-cymène	5,10	0,43
terpinolène	0,10	0,04
cryptone	2,20	tr
terpinen-4-ol	1,40	0,22
β -caryophyllène	0,10	0,03
α -terpinéol	0,80	0,70
aromadendrène	0,20	1,63
alloaromadendrène	0,10	0,74
bicyclogermacrène	0,17	tr
épiglobulo	0,10	0,80
globulol	0,20	5,33
viridiflorol	0,10	0,63
γ -eudesmol	0,60	0,40
β -eudesmol	0,80	0,50
TOTAL	96,90	94,86
Composés non identifiés	3,10	5,14

Tableau 30b: Composés majoritaires des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* du Bénin

	myrcène	p-cymène	globulol	limonène	γ -terpinène	α -pinène	1.8-cinéole
Sèmè	4	5.1	0.2	1.33	6.9	6.1	65.7
Pahou	0.01	0.43	5.33	3.3	0.06	10.66	69.1

Graphe 19 : Histogramme de comparaison des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*E. globulus* du Bénin

L'analyse chimique de ces deux huiles fait apparaître le 1,8-cinéole comme composé majoritaire avec des taux de 65,7 et 69%. Il est suivi d' α -pinène (6 à 10,7%); ces composés sont présents dans les deux échantillons. D'autres constituants comme le myrcène (4%), le γ -terpinène (7%), le paracymène (5%) ont été trouvés dans l'échantillon provenant du site de Sèmè alors qu'ils sont sous formes de traces dans celui de Pahou. Par contre ce dernier contient, comme second et exclusif composé, le globulol à 5,3% avec dans une moindre mesure le limonène (3,3%).

II-7-2 COMPARAISON DE NOS RÉSULTATS AVEC CEUX DE LA LITTÉRATURE

L'huile d'origine de Pahou ressemble à s'y méprendre à celle d'Australie signalée par D. J. BOLAND (92) qui a donné des pourcentages en 1,8-cinéole de 69,3% et d' α -pinène de 10,7%. Celle de Sèmè se rapproche de l'échantillon du Burundi rapporté par M. DETHIER et coll. en 1994 (147) avec 63,8% de 1,8-cinéole et 8,8% d' α -pinène. Par contre, la présence des composés secondaires comme le paracymène, le γ -terpinène et le myrcène n'ont pas été signalés par cet auteur.

II-7-3- CONCLUSION

Il ressort de l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle d'*E. globulus* d'origine béninoise prélevée sur deux sites et pour la période de récolte (août 1996) que la teneur en 1,8-cinéole est proche de celle de la norme NFT 75 113 (fixant pour une huile à usage médicinal le taux de 1,8-cinéole $\geq 70\%$) pour le site de Pahou (69%) mais demeure en deçà (65,7%) pour le site de Sèmè. L'huile essentielle d'*E. globulus* d'origine de Sèmè ne peut donc avoir un usage médical qu'après rectification. Des études doivent être effectuées sur toutes les autres périodes de l'année afin de tirer une conclusion plus générale et définitive.

II-8- *EUCALYPTUS TERETICORNIS* SMITH

II-8-1- ASPECT BOTANIQUE

L'Eucalyptus tereticornis est un arbre pouvant atteindre 30 à 45m de haut.

Cet arbre ressemble beaucoup à l'*Eucalyptus camaldulensis* mais il s'en distingue par l'opercule de ses boutons floraux, la pédicelle de ses fruits généralement plus robuste et son feuillage un peu luisant.

Il résiste moins bien aux sécheresses que l'*Eucalyptus camaldulensis*.

La multiplication est facile par semis et par les souches qu'il rejette après abattage. Il a un enracinement profond et étendu.

II-8-2- EMPLOIS

L'*Eucalyptus tereticornis* est utilisé en tant que bois de construction comme pilotis ou dans la fabrication de la pâte à papier. Il peut servir comme plante ornementale ou brise-vents.

Planche 6 :



***Eucalyptus tereticornis* du Bénin**

II-8-3- COMPOSITION DE L'HUILE ESSENTIELLE : TRAVAUX ANTÉRIEURS

Les différentes investigations bibliographiques des travaux effectués sur l'*Eucalyptus tereticornis* montrent l'existence de 3 types chimiques.

II-8-3-1- CHÉMOTYPE À 1,8-CINÉOLE

La teneur de ce composé est généralement supérieure à 20%. Il est souvent accompagné d' α - et β -pinène à taux généralement variables.

Pour les huiles essentielles du Congo (97a), de l'Inde (185), du Maroc (142) et du Rwanda (179), la teneur en 1,8-cinéole est comprise entre 20 et 30%. Celle d' α -pinène et de β -pinène étant respectivement de 11,8 et 7,1% pour le Congo (97a), 20,69 et 21,24% pour l'Inde (185), 13,0 et 1,0% pour le Maroc (142).

D'autres échantillons en provenance de l'Inde (186), du Cuba (187) et d'Australie (103) ont un pourcentage en 1,8-cinéole supérieur à 30%. L' α -pinène et le β -pinène y sont absents sauf dans l'échantillon de l'Inde (13,14 et 2%) (186).

Dans tous les échantillons de ce type, le taux de p-cymène est inférieur à 6% sauf dans l'échantillon du Rwanda (179) où il atteint 17,16%. Dans ce même échantillon, on y retrouve la cryptone (10,77%) rencontrée en très faible teneur (0,9%) dans un échantillon d'origine congolaise.

L'échantillon du Mali (155) a une teneur élevée (62%) en 1,8-cinéole comparativement aux échantillons précédemment cités suivi d' α -pinène (16,0%), d' α -terpinéol (9,0%) et de limonène (5,0%).

II-8-3-2- CHÉMOTYPE À P-CYMÈNE

Ont été recensés pour cette variété:

Les travaux de De RISCALA en 1976 (188) qui mettent en évidence le p-cymène à un taux de 75% suivi de la cryptone (5,5%).

Celui de DELLACASSA qui, en 1990, révèle la présence de p-cymène à un pourcentage de 28,8% et de cryptone (19,5%) (154).

Enfin, celui de BIGNEL (151) qui met en évidence le p-cymène (27,74%) et la cryptone (14,95%) dans l'huile en provenance d'Australie.

Dans ces 3 échantillons le pourcentage d' α -pinène est inférieur à 2% et celui de 1,8-cinéole à 10%.

II-8-3-3- CHÉMOTYPE À β -PINÈNE

Dans la bibliographie que nous disposons, nous avons recensé les travaux de :

LAMATY, MENUT et KIYABOU (97b), réalisés en 1986 sur un échantillon congolais, qui montre que le β -pinène est majoritaire (21,4%).

BOLAND et coll. en 1991 (92a) qui ont permis de l'identifier à un taux de 17,21%.

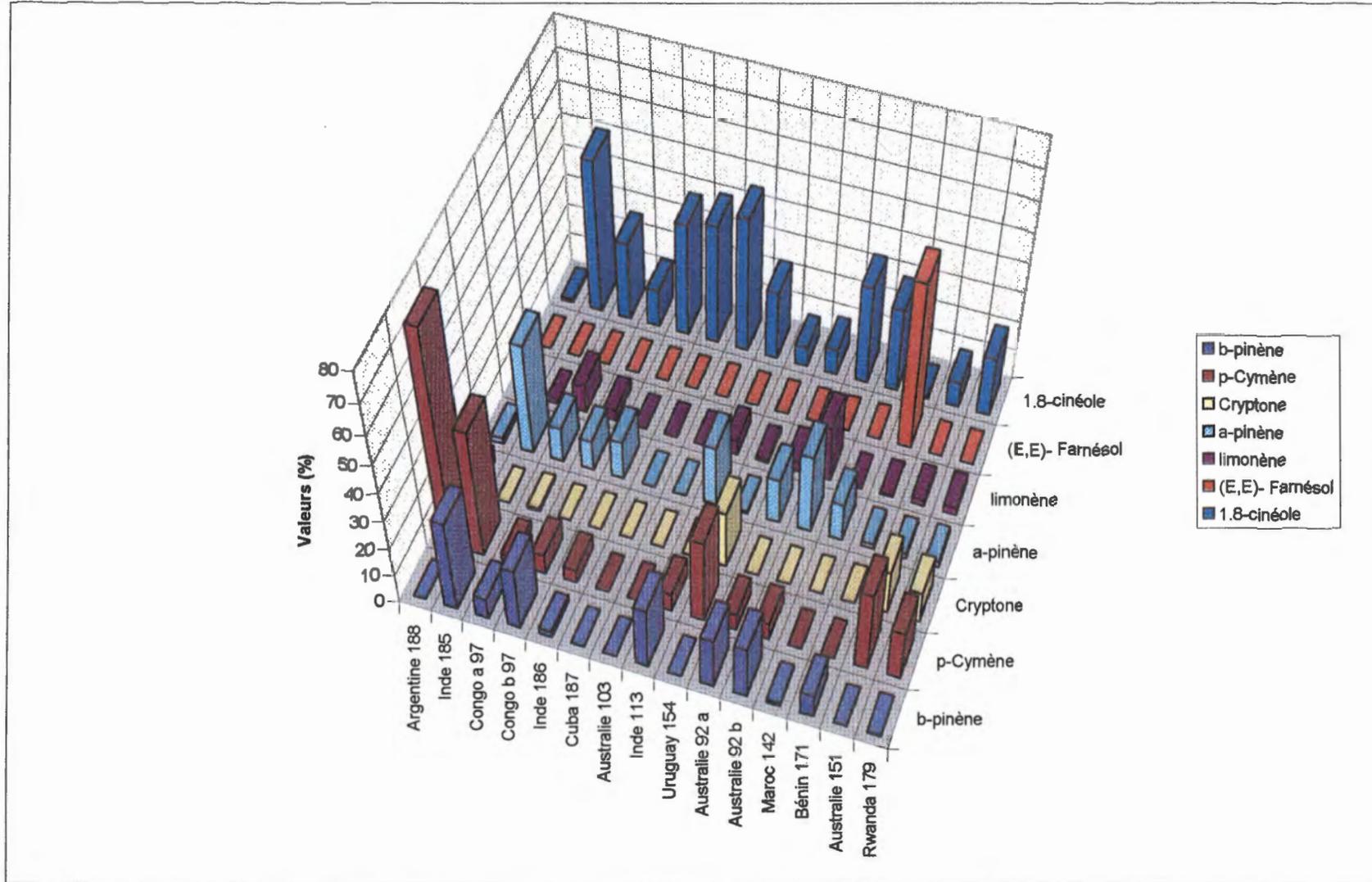
Dans ce chémotype, on remarque la présence d' α -pinène et de 1,8-cinéole respectivement dans les proportions de 10,3 et 12,4% pour le Congo (97), 15,47 et 8,60% pour celui d'Australie (92).

TABLEAU 31

Principaux constituants de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* décrits par les auteurs

Auteurs (Référence) Année	De Riscala (188) 1976	Shiva (185) 1984	Lamaty, Menut, Kiyabou (97) 1986		Panda (186) 1987	Miranda (187) 1987	Lassak (103) 1988	Mehra (113) 1988	Dellacassa (154) 1990	Boland (92) 1991	Zrira (142) 1992	Sohounloué (171) 1996	Bignel (151) 1996	Garry Chalchat (179) 1996	
Origine	Argentine	Inde	Congo		Inde	Cuba	Australie	Inde	Uruguay	Australie		Maroc	Bénin	Australie	Rwanda
Partie distillée	Feuilles	Feuilles	Feuilles (9/05/86)	Feuilles (10/05/86)	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles		Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles
α -Pinène	2	11,11-37,80	11,8	10,3	13,14	-	-	20,69	0,5	15,47	1-27	13,0	1,63	1,51	1,92
β -Pinène	-	11,87-31,49	7,1	21,4	2,0	-	-	21,24	-	17,21	0,1-18	1,0	7,83	0,12	0,45
p-Cymène	75	7,40-44,12	2,8	6,7	4,5	-	-	6,18	28,8	5,74	0,4-6	-	-	27,74	17,16
Cinéole-1,8	1	10,95-50,72	25,9	12,4	37,5	40	45	22,83	6,5	8,60	0,1-33	28,2	0,52	8,45	20,05
Limonène	-	-	9,5	3,5	-	-	-	4,76	0,9	3,53	4-19	-	0,65	2,06	2,53
Cryptone	5,5	-	0,9	-	-	-	-	-	19,5	-	-	-	-	14,95	10,77
Cuminaldéhyde	11	-	-	-	-	-	-	-	6,2	-	-	0,9	-	4,99	3,20
α -Phellandrène	5,5	-	-	-	-	-	-	12,78	-	0,25	1	0,5	-	-	1,85
α -Terpinéol	-	-	4,3	12,9	3,0	-	-	-	-	2,48	0,3-6	3,7	0,97	-	4,23
(Z,Z)-Farnésol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,42	-	-
(E,E)-Farnésol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56,51	-	-
(E,Z)-Farnésol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,56	-	-
(E,E)-Acétate de Farnésyle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,34	-	-

Graphe 20 : Principaux constituants de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* décrit par les auteurs



II-9- HUILE ESSENTIELLE D'*E. TERETICORNIS* DU BÉNIN : NOS TRAVAUX

II-9-1- TENEUR EN HUILE ET COMPOSITION CHIMIQUE

Notre étude a porté sur trois échantillons d'huiles essentielles d'*E. tereticornis* récolté sur trois sites (Pahou dans le sud, Agamey et Aplahoué dans le département du Mono à l'intérieur du pays). Des feuilles adultes ont été récoltées entre novembre et décembre 1997.

Après extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau, les teneurs obtenues sont respectivement de 1,4, 0,9 et 1,2%.

Le tableau 32a présente la composition des huiles essentielles obtenues sur les trois sites, 31 composés chimiques ont été identifiés.

On note une grande différence entre les compositions chimiques des huiles essentielles provenant de l'intérieur (Agamey et Aplahoué) et celle provenant de Pahou au sud.

Les huiles essentielles d'origine de Agamey et de Aplahoué sont caractérisées par la présence des dérivés de farnésol à un taux respectif de : (E-E)-farnésol 65,48 et 60,55%, (E-Z)-farnésol 10,65 et 11,25%, (Z-Z)-farnésol 4,82 et 6,24%, et (E-E)-acétate de farnésyle 3,43 et 5,66%. A eux seuls, ces composés représentent respectivement les 84,38 et 83,7% des constituants identifiés dans ces deux échantillons d'*E. tereticornis* de ces localités.

Le 1,8-cinéole (64,15%) est le composé majoritaire identifié dans l'huile essentielle d'*E. tereticornis* de Pahou. Il est suivi d' α -pinène (10,60%), de limonène (5,65%) et d' α -terpinéol (6,20%). La somme des teneurs en 1,8-cinéole, en limonène et en α -terpinéol constitue les 76% des composés identifiés dans cet échantillon de Pahou.

En lieu et place d' α -pinène pour les huiles de Agamey et d'Aplahoué, on trouve le β -pinène (5,69 et 5,97%), le limonène et l' α -terpinéol y sont en faibles proportions.

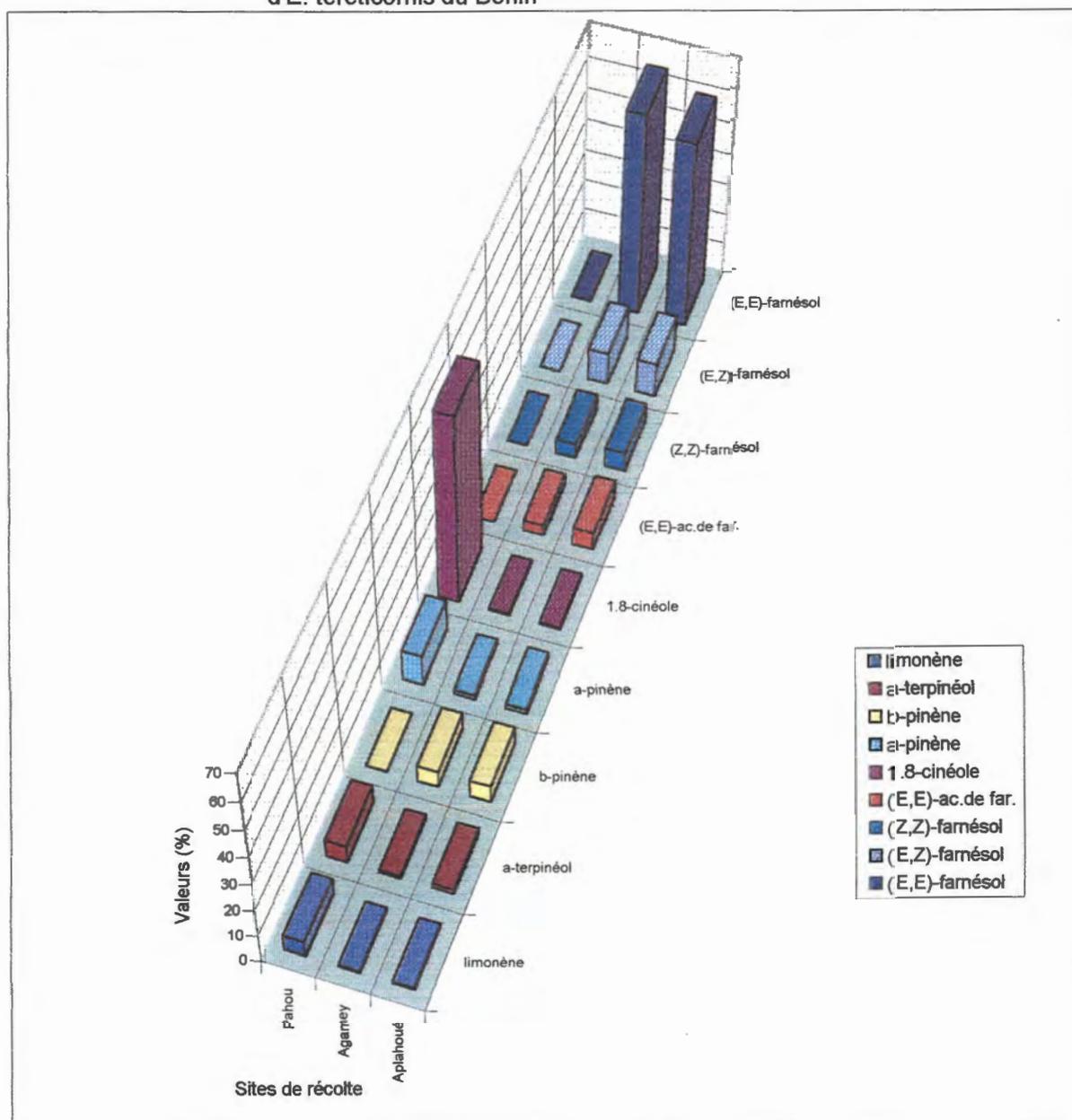
Tableau 32a: Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis*
du Bénin

Composés	Lieux de récolte		
	Pahou	Agamey	Aplahoué
α -thujène	0,18	tr	tr
α -pinène	10,6	1,35	1,53
α -fenchène	tr	tr	tr
camphène	0,15	tr	tr
β -pinène	0,10	5,69	5,97
myrcène	0,20	tr	tr
α -terpinène	tr	tr	tr
p-cymène	0,90	0,56	0,25
limonène	5,65	0,52	0,68
1,8-cinéole	64,15	0,65	0,52
(Z)- β -ocimène	-	0,52	0,62
γ -terpinène	0,40	-	-
terpinolène	0,10	tr	tr
α -phellandrène	1,50	0,10	0,10
fenchol	0,09	tr	tr
terpinèn-4-ol	0,09	0,10	0,10
α -terpinéol	6,20	0,83	1,70
γ -élémente	1,40	tr	tr
aromadendrène	0,40	tr	tr
alloaromadendrène	0,40	tr	tr
viridiflorol	1,29	tr	tr
T-nérolidol	-	1,47	1,73
spathuléol	0,40	tr	tr
épiglobulol	0,10	0,15	0,25
globulol	0,20	0,25	0,40
β -eudesmol	0,20	-	-
α -eudesmol	0,20	-	-
(Z,Z)-farnésol	tr	4,82	6,24
(E,E)-farnésol	tr	65,48	60,55
(E,Z)-farnésol	tr	10,65	11,25
(E,E)-acétate de farnesyle	tr	3,43	5,66
Rendements (%)	1,4	0,9	1,2

Tableau 32b: Composés majoritaires des huiles essentielles d'*Eucalyptus tereticornis* du Bénin

	limonène	α -terpinéol	β -pinène	α -pinène	1.8-cinéole	(E,E)-ac.de far.	(Z,Z)-farnésol	(E,Z)-farnésol	(E,E)-farnésol
Pahou	5.65	6.2	0.1	10.6	64.15	0.01	0.01	0.01	0.01
Agamey	0.52	0.83	5.69	1.35	0.65	3.43	4.82	10.65	65.48
Aplahoué	0.68	1.7	5.97	1.53	0.52	5.66	6.24	11.25	60.55

Graphe 21: Histogramme de comparaison des composés majoritaires des huiles essentielles d'*E. tereticornis* du Bénin



II-9-2- COMPARAISON DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DU BÉNIN AVEC CELLES DE LA LITTÉRATURE

Des trois échantillons analysés, seul l'échantillon de Pahou ressemble à celui de Mali (155) avec un taux en 1,8-cinéole, 64,15 contre 62%, d' α -pinène 10,6 contre 16% et d' α -terpinéol 6,20 contre 2,2%, le limonène ayant une teneur presque égale (5,65 et 5,8%).

Le même échantillon de Pahou se rapproche un peu de ceux de l'Inde (186), de Cuba (187) ou d'Australie (103) mais avec un taux en 1,8-cinéole plus élevé. L' α -pinène identifié dans l'échantillon béninois avec une teneur de 10,60% ne se retrouve pas dans les échantillons de Cuba (187) et d'Australie (103).

Les deux autres échantillons riches en isomères de farnésol sont spécifiques du Bénin. Il n'a été signalé qu'une seule fois, en 1996, par SOHOUNHLOUE and al. (171) et dans un seul échantillon béninois avec un taux en (E-E)-farnésol de 56,51% et celui des autres composés presque égaux.

II-9-3- CONCLUSION

Nos résultats analytiques sur la composition chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus tereticornis* du Bénin ont permis de mettre en évidence l'existence de deux chémotypes :

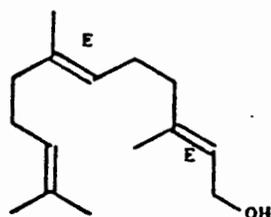
- à Pahou, le chémotype à 1,8-cinéole
- à Agamey et Aplahoué, le chémotype à (E, E)-farnésol dans cette espèce béninoise.

Nos résultats viennent confirmer celui obtenu par SOHOUNHLOUE et son équipe en 1996 (171) et prouve que l'*Eucalyptus tereticornis* à chémotype (E, E)-farnésol est une espèce de type béninois car jamais identifiée dans les autres pays jusqu'à présent.

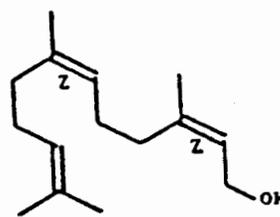
Notons qu'actuellement le farnésol est très utilisé dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

En effet, il entre pour 0,3% dans la préparation des poudres et déodorants masculins, ils inhibent la prolifération de certains germes bactériens responsables de certaines affections de la peau. Le farnésol est sans effet néfaste sur la flore cutanée. (DRAGOCO Report 1998, 2 (juin), 94, 95)

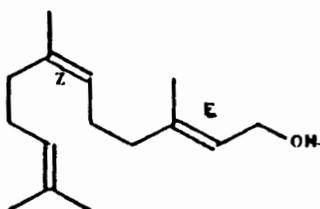
À titre d'illustration, voici les formules des isomères de farnésol et celle de (2 E, 6 E)-acétate de farnésyle.



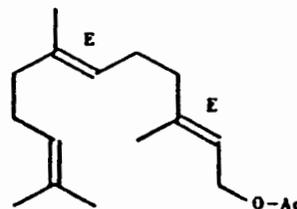
(2 E, 6 E)-farnésol



(2 Z, 6 Z)-farnésol



(2 E, 6 Z)-farnésol



(2 E, 6 E)-acétate de farnésyle

II-10- *EUCALYPTUS TORELLIANA* F. MUELL

II-10-1- ASPECT BOTANIQUE

L'*Eucalyptus torelliana* est un arbre pouvant atteindre 30m de haut. C'est une espèce bien adaptée au Bénin. Sa croissance est médiocre comparativement à celle d'*Eucalyptus camaldulensis*. Il a donc été suggéré de l'associer avec l'*Eucalyptus camaldulensis* en vue d'assurer la fermeture du couvert végétal.

Les feuilles d'*Eucalyptus torelliana* ont deux formes différentes selon leur âge : les jeunes (sont) larges et ovales dont les pétioles et les nervures portent de petits poils ; les feuilles adultes (sont) étroites, largement lancéolées et acuminées.

Les jeunes feuilles persistent sur la plante adulte.

Les inflorescences sont larges et terminales et les fruits sont globuleux ou ovoïdes.

II-10-2- EMPLOIS

Eucalyptus torelliana, comme la plupart des *Eucalyptus*, possède un bois dur et ferme. Il est utilisé dans la fabrication des wagons et plates-formes des ponts. Il est aussi utilisé pour la production de bois de feu et de charbon de bois. Il sert d'arbre ornemental au voisinage des maisons et aux bords des routes.

On extrait de ces feuilles une huile essentielle sans grande valeur commerciale.

Planche 7 : *Eucalyptus torelliana* du Bénin



II-10-3- HUILE ESSENTIELLE D'*EUCALYPTUS*. *TORELLIANA* : TRAVAUX DES AUTEURS

Peu de travaux ont été effectués sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus torelliana*.

En 1983, une étude faite par SINGH et coll. (113) sur cette espèce récoltée en Inde n'a donné qu'une analyse succincte de l'huile essentielle. Ils y ont trouvé un taux en 1,8-cinéole inférieur à 5%.

En 1991, BOLLAND et coll. (92) rapportent que l'huile essentielle d'*Eucalyptus torelliana* d'Australie est caractérisée par la présence d' α -pinène, de β -pinène, de p-cymène, d'ocimène et d'aromadendène.

En 1992, MENUT et KIYABOU (97) montrent que la composition chimique de la même espèce récoltée au Congo est en majorité constituée d'hydrocarbures monoterpéniques (54%) dont le plus important est l' α -pinène (49%).

En 1996, F.X. GARNEAU et coll. (171), en étudiant la composition chimique de l'essence des feuilles sèches d'*Eucalyptus torelliana* du Bénin, ont montré qu'elle contient principalement de l' α -pinène (19%), du p-cymène (14%) et du spathulénol (17%).

L. SIDIBÉ trouve, dans un échantillon du Mali (155), l' α -pinène à un taux de 50% ; le p-cymène, le limonène et le 1,8-cinéole sont en faibles proportions.

II-11- HUILES ESSENTIELLES D'EUCALYPTUS TORELLIANA DU BÉNIN : NOS TRAVAUX

Nous avons étudié trois échantillons d'huiles essentielles d'*Eucalyptus torelliana* provenant de Sèmè (sur la côte) et Lokossa et Azovê (à l'intérieur des terres). Le matériel végétal a été récolté en novembre et décembre 1997.

Les rendements en huiles essentielles sont respectivement de 1 ; 1,3 et 0,8%.

Les composés majoritaires des trois échantillons d'huiles essentielles sont le γ -terpinène (29, 22,5, et 20,7%), l' α -pinène (15,6, 15,9 et 15%), le p-cymène (12, 13,9 et 17,4%), le limonène (9,9, 10,9 et 9,9%) et enfin le 1,8-cinéole (7,2, 7,9 et 7%). Il faut noter une homogénéité de la composition chimique de ces huiles, 47 constituants chimiques ont été identifiés (figure 15, tableaux 33a et 33b, graphe 22).

En comparaison avec les travaux des auteurs, nos 3 échantillons d'huiles ne ressemblent pas à tous ceux qui avaient été rapportés dans la littérature. S'ils contiennent de l' α -pinène comme ceux du Congo (48,9%) (97) et du Mali (50%) (155), le taux de ce composé est beaucoup plus faible dans les échantillons du Bénin (15,4% en moyenne). Les échantillons du Bénin sont par contre caractérisés par la présence de limonène (10,2%), de p-cymène (12 à 17,4%) et de 1,8-cinéole (7,3%) que l'on ne retrouve qu'en faible quantité dans les échantillons du Congo (97) et du Mali (155).

Figure 15 :

Chromatogramme de l'huile essentielle de *E. torelliana* du Bénin

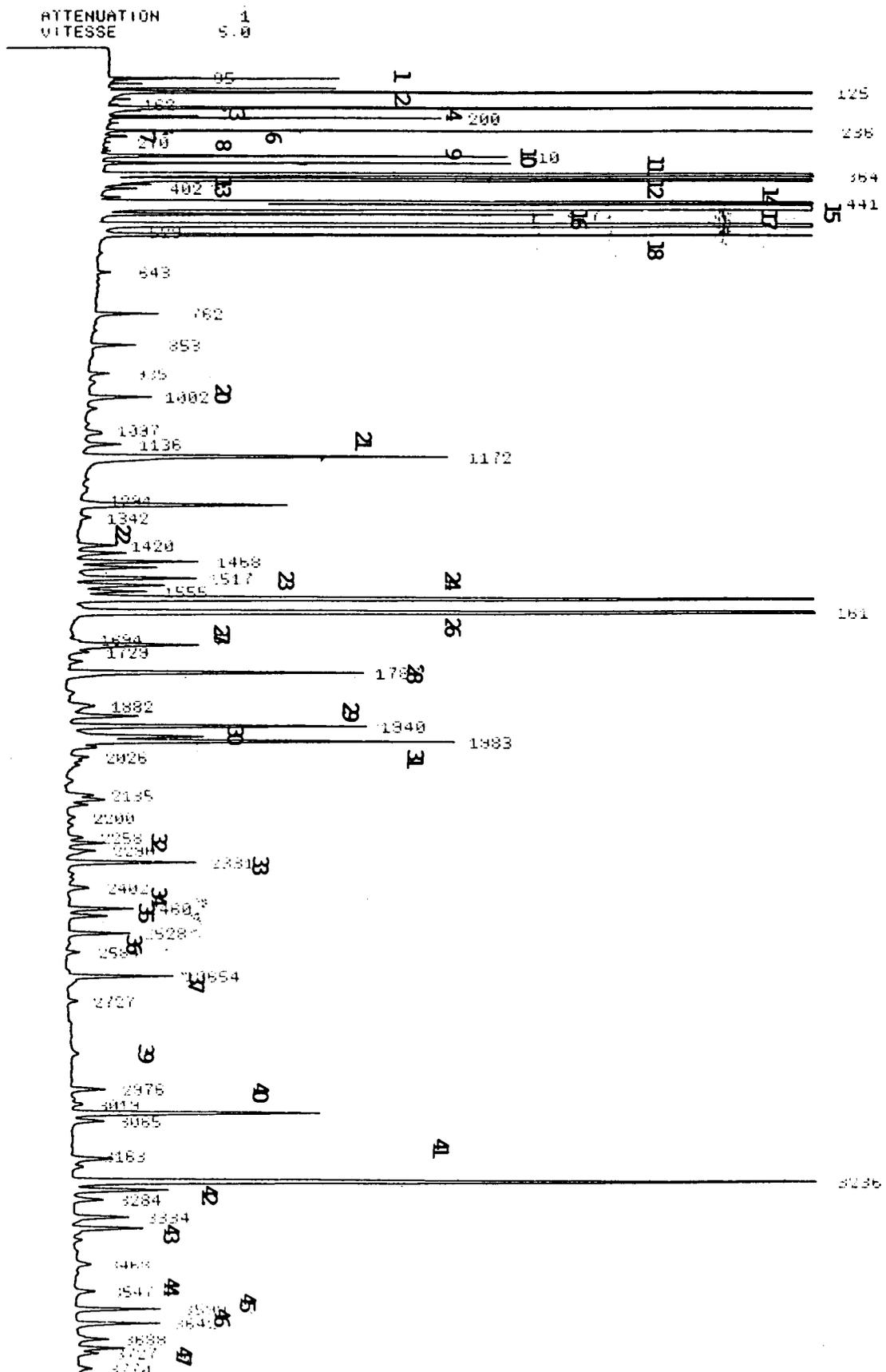


Tableau 33a:Composition chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus torelliana* du Bénin.

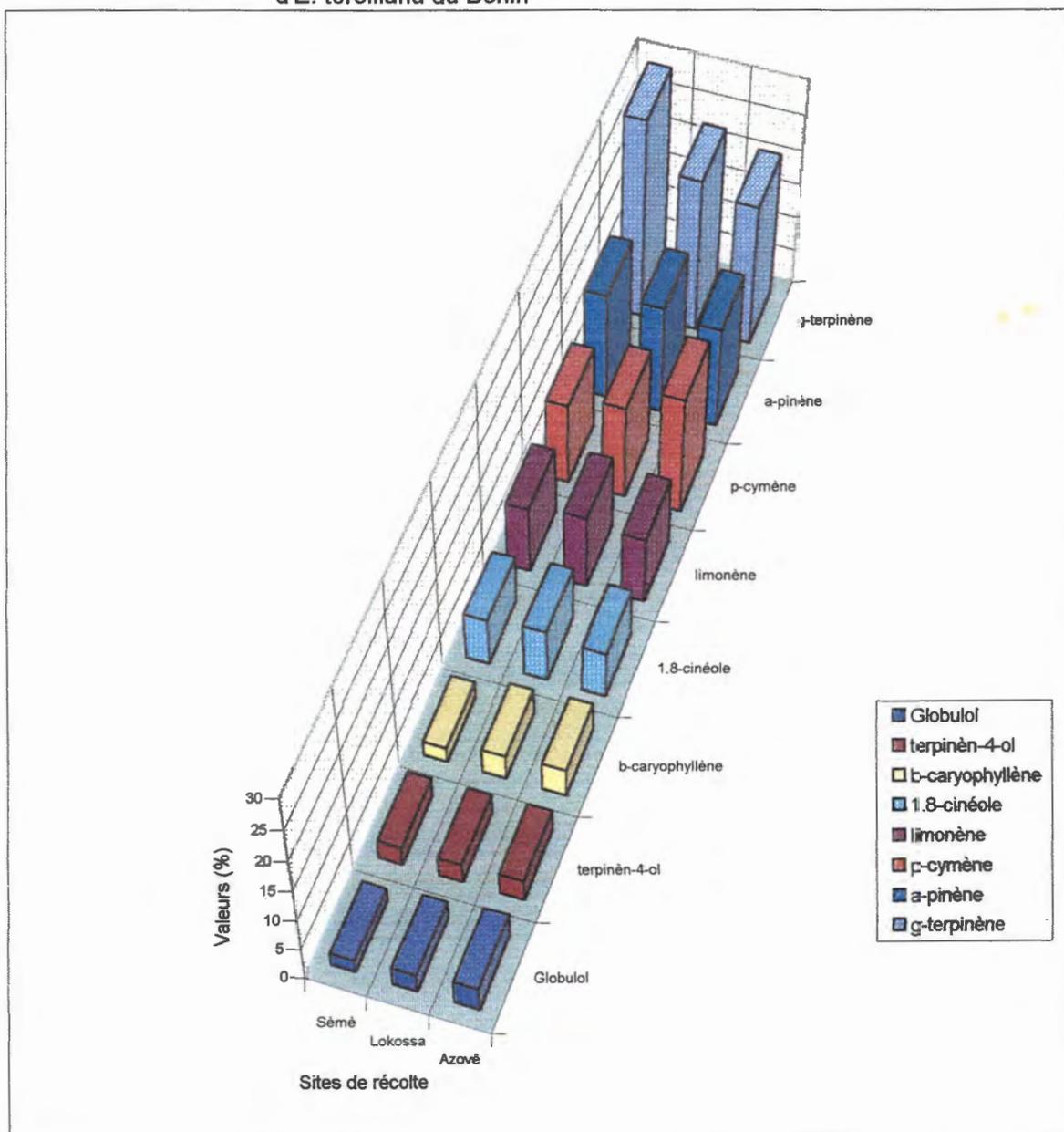
Composés	Sites de récoltes		
	Sèmè	Lokossa	Azovè
1-méthyl butanal	2,73	2,13	1,43
2-α-pinène	15,62	15,85	14,80
3- α -thujène	0,03	0,05	0,29
4-camphène	0,05	tr	0,05
5-isobutirate d'isobutyle	0,19	0,21	0,21
6- β -pinène	1,14	0,87	0,68
7-sabinène	0,03	0,02	0,05
8- α -phellandrène	0,54	tr	0,01
9-myrcène	0,39	0,33	0,26
10- α -terpinène	tr	0,23	0,15
11-limonène	9,87	10,87	9,88
12-1,8-cinéole	7,19	7,86	6,94
13-héxèn-2-al	0,06	0,06	0,05
14-(Z)- β -ocimène	2,15	1,63	1,25
15-γ-terpinène	29,10	22,46	20,67
16-(E)- β -ocimène	0,53	0,38	0,31
17-p-cymène	12,00	13,86	17,42
18-terpinolène	0,96	0,68	0,48
19-isovalérate d'isoamyle	0,2	-	tr
20-p-cyménène	0,14	0,14	0,16
21-camphre	0,06	0,24	tr
22-pinocarvone	0,09	0,07	0,08
23-fenchol	0,22	0,46	0,21
24-β-caryophyllène	2,29	3,74	4,21

25-aromadendrène	Tr	0,06	0,09
26-terpinèn-4-ol	2,91	3,09	3,29
27-alloaramadendrène	0,33	0,48	0,59
28-pinocarvéol	0,68	0,84	0,91
29- δ -cadinène	0,61	0,80	0,87
30-bornéol	0,1	0,39	0,44
31- α -terpinéol	0,31	0,96	1,15
32-myrténol	0,07	0,03	0,13
33-trans p-mentha-1(7)-8-dièn-2-ol	0,28	0,38	0,41
34-oxyde de phellandrène	0,14	0,19	0,31
35-trans carvéol	0,08	0,12	0,13
36p-cymèn-8-ol	0,12	0,19	0,24
37-cis carvéol	0,03	0,04	0,05
38-cis-mentha-1(7)-8-dièn-2-ol	0,21	0,29	0,34
39-oxyde de caryophyllène	tr	tr	tr
40-lédol	0,58	0,09	1,5
41-globulol	1,98	2,79	3,71
42-iridiflorol	0,21	0,28	0,39
43-spathuléol	0,16	0,22	0,28
44- γ -eudesmol	0,05	0,05	0,07
45-thymol	0,19	0,25	0,45
46-carvacrol	0,18	0,06	0,11
47- β - eudesmol	0,10	0,11	0,23
Rendements (%)	1	1,3	0,8

tr = trace

Tableau 33b : Composés majoritaires des huiles essentielles d'*Eucalyptus torelliana* du Bénin

	Globulol	terpinèn-4-ol	b-caryophyllène	1.8-cinéole	limonène	p-cymène	α -pinène	γ -terpinène
Sèmè	1.98	2.91	2.29	7.19	9.87	12	15.62	29.1
Lokossa	2.79	3.03	3.74	7.86	10.87	13.86	15.85	22.46
Azovè	3.71	3.29	4.21	6.94	9.88	17.42	14.8	20.67

Grphe 22 : Histogramme de comparaison des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*E. torelliana* du Bénin

CHAPITRE III

MELALEUCA QUINQUENERVIA

(Cav) S. T. BLAKE

SYN. *MELALEUCA LEUCADENDRON* LINN,

NOM FRANÇAIS : NIAOULI

INTRODUCTION

Melaleuca quinquenervia a été introduit au Bénin vers les années 1942 en vue de l'assèchement des plaines inondables de la rive méridionale du lac Nokoué et la stabilisation des bas-fonds mouvants de part et d'autre de l'axe routier Sèmè-Podji Porto-Novo.

Il y a quelques années, le peuplement s'étendait sur plus de 20 hectares. Il a été l'objet d'une destruction systématique par les paysans et les pêcheurs de la région et ne subsiste aujourd'hui que sous formes de 3 zones de faible densité :

- zone 1, carrefour Sèmè
- zone 2, Djrègbé
- zone 3, Kétonou, à quelques kilomètres avant le pont de Porto-Novo.

Des pieds, d'âge avancé, isolés en retrait, témoignent d'une extension passée plus grande.

Cette seule plantation, dont on ignore l'origine des semences (faute d'archives), est aussi connue sous le nom de Niaouli. Une infirme partie de la population le désigne par "petites feuilles pour la toux" (Kpen ma sin fini fini) en raison des propriétés antitussives qu'elle lui reconnaît.

III-1- GÉNÉRALITÉS

III-1-1 ORIGINE ET BOTANIQUE

Natif des Islands, *Melaleuca quinquenervia* ou Niaouli est un arbre qui pousse dans les régions tropicales et particulièrement en Australie, Indonésie, Malaisie, Nouvelle Calédonie et Madagascar.

Melaleuca quinquenervia est un arbre de 10 à 15m de hauteur, à port érigé, à écorce blanc-crème, liégeuse se détachant en feuillets papyracés.

Les feuilles sont simples, alternes, lancéolées, longues de 5 à 8 cm et larges de 1 à 2 cm, très courtement pétiolées, coriaces, odorantes au froissement, à nervation parallèle jusqu'au sommet du limbe.

Les fleurs blanches sont disposées en épis terminaux.

Du point de vue Botanique, la littérature de cette plante paraît confuse bien que des révisions aient été faites (CHERRIER, 1983) (189) spécialement sur le genre *Melaleuca* d'Australie (JONES et HAENKE, 1938; BLAKE, 1968; BYRNES, 1984) (190-192) et récemment sur celui de la Nouvelle Calédonie (DAWSON, 1992) (193).

Pour cela, différents noms sont utilisés pour l'identification botanique des arbres de Niaouli.

Selon la révision de BLAKE, il apparaît que le Niaouli en provenance du Madagascar doit s'appeler *Melaleuca quinquenervia* et, depuis , le nom *Melaleuca viridiflora* Gaertn donné par HUMBERT (1953) (194) et CABANIS et al. (1970) (195) est incorrecte. Les récentes investigations à ce sujet ont prouvé que le Niaouli du Madagascar est bien le *Melaleuca quinquenervia* (cav) S. T. Blake (196).

Il existe d'autres espèces de *Melaleuca* telles que les espèces *alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel, *linariifolia* Smith, *dissitiflora* F. Muell et *uncinata*

Planche 8 : *Melaleuca quinquenervia* du Bénin



III-1-2- ANATOMIE ET APPAREILS SÉCRÉTEURS

Des coupes anatomiques (HEGNAUER, 1969) (197) pratiquées dans tous les organes aériens de la plante ont permis de déceler deux types d'appareils sécréteurs :

- des poches et des poils à huile essentielle ;
- des cellules à tanins.

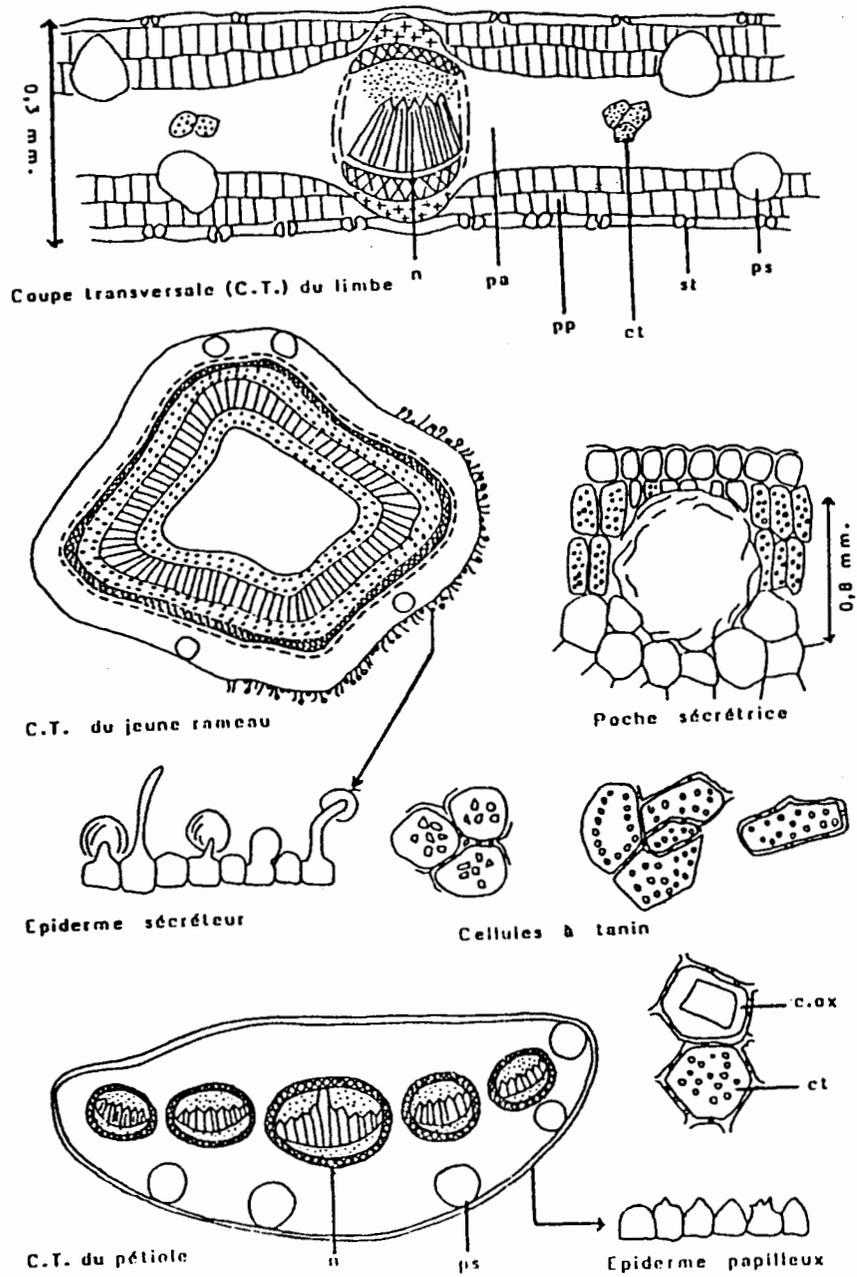
Le mésophylle renferme des poches sécrétrices lysigènes de 0,08mm de diamètre, à raison de 4 par mm² de limbe. Les mêmes poches se retrouvent dans le parenchyme cortical des pétioles et des jeunes rameaux, organes chez lesquels l'épiderme possède également la fonction sécrétrice :

- cellules papilleuses chez les premiers ;
- poils vésiculeux pourvus d'un pied unicellulaire plus ou moins long chez les seconds.

Dans la tige vieillissante, l'assise subéro-phellodermique située au niveau de la couche la plus profonde du parenchyme cortical, se met à fonctionner ; épiderme sécréteur et écorces seront éliminés. Le rameau âgé protégé par le liège, ne conserve plus de poches à essence.

Les parenchymes pétiolaires et caulinaires sont entièrement constitués de cellules tarinifères ; un grand nombre d'entre elles contiennent des cristaux prismatiques d'oxalate de calcium.

La présence abondante de poches à huile essentielle, de tanins et d'oxalate de calcium, révélée par l'étude anatomique, permet d'expliquer les nombreuses applications thérapeutiques de la plante telle que DESCHAMPS (1991) les indique (198).

Planche 9 :**Appareils sécréteurs de Niaouli**

Légende : c. ox : cellule à oxalate de calcium ; c. t : cellule à tanin ; n : nervure ;
p. p : parynchime palissadique ; p. r : parynchime rond ; poche sécrétrice.

III-1-3- USAGES

Les feuilles de *Melaleuca quinquenervia* macérées dans l'alcool de palme donnent une teinture parfumée employée contre la diarrhée, les hémorragies, la gonococcie, les infections urinaires.

L'eau végétale de la distillation des feuilles de Niaouli avec celle de *Crateva religiosa* s'emploie avec succès dans le traitement de la blennorrhagie. L'eau végétale des feuilles de quinquenervia très parfumée, se comporte comme un remède polyvalent contre les diverses affections microbiennes, pulmonaires, intestinales, urinaires et génitales (de SOUZA et coll. 1993) (199).

L'huile essentielle extraite des feuilles est utilisée pour le traitement des infections pulmonaires et la décongestion des voies respiratoires (DESCHAMPS) (198).

Une goutte d'huile, étalée sur le front, calmerait instantanément les céphalées.

III-1-4- COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES : TRAVAUX ANTÉRIEURS

Parmi la variété des huiles essentielles de Niaouli décrites, les investigations révèlent l'existence de plusieurs chémotypes :

III-1-4-1- CHÉMOTYPE À 1,8-CINÉOLE

Ce chémotype riche en 1,8-cinéole (> 40%) a été signalé par plusieurs auteurs comme : I. G. H. JONES al. en 1937 et 1938 (200, 190), O. E. GUENTHER et al. en 1950 (201), O. EKUNDAYO et al. en 1987 (202), M. TODOROVA et al. en 1988 (203),

O. MOTL et al. en 1990 (204), P. A. R. RAMANOELINA et al. en 1992 et en 1994 au Madagascar (205, 196) et par notre équipe (MOUDACHIROU and al.) en 1996 au Bénin (206).

III-1-4-2- TYPE À VIRIDIFLOROL

Des auteurs comme P. A. R. RAMANOELINA et al. en 1992 (205) et en 1994 (196), a Madagascar (viridiflorol 47,7 et 47,8%) et M. MOUDACHIROU et al. au Bénin en 1996 (206) ont identifié le type à viridiflorol (>40%).

III-1-4-3- TYPE À (E)-NÉROLIDOL

Cette variété a été décrite par M. F. BEYLIER en 1979 (207) et par P. A. R. RAMANOELINA en 1994 (196) au Madagascar (nérolidol 865,7%).

III-1-4-4- CHÉMOTYPE À METHYLEUGÉNOL ET CHÉMOTYPE À (E)-MÉTHYLISOEUGÉNOL

Ces deux chémotypes ont été publiés par BROPHY et LASSAK en 1988 (208).

III-1-4-5- TYPE À LINALOL ET À LINALOL + NÉROLIDOL

Ce type a été, depuis 1949 (49) et 1950 (201), décrit par E. GUENTHER et al.

III-1-4-6- CHEMOTYPE À 1,8-CINÉOLE + VIRIDIFLOROL

Cette variété à pourcentage égal en 1,8-cinéole et viridiflorol est identifiée par P.A.R. RAMANOELINA et al. en 1994 (196) a Madagascar ($\approx 20\%$) et au Bénin en 1996 ($\approx 30\%$) par M. MOUDACHIROU et al. (206).

III-1-5- VARIATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE ET DU RENDEMENT

Les travaux de SOUTHWELL en 1988 (209) et de BROPHY et al. en 1989 (210) ont montré que la composition chimique de l'huile essentielle de *Melaleuca* peut changer avec l'âge des feuilles.

En 1993, de SOUZA et coll. (199) ont trouvé dans les jeunes feuilles de *Melaleuca quinquenervia* acclimaté au Bénin l'élémane à un taux de 34% alors que les feuilles adultes (206) contiennent soit du 1,8-cinéole, soit du viridiflorol ou un taux égal de 1,8-cinéole et du viridiflorol.

III-1-6- LES AUTRES ESPÈCES DE MELALEUCA

L'huile essentielle de l'espèce *alternifolia* Cheel prend une part commerciale important (I. A. SOUTHWELL, 1988 et J. J. BROPHY et al, 1986) (209, 210)). Ceci est dû à l'activité antimicrobienne de la variété chimique riche en terpinène-4-ol. La variété riche en 1,8-cinéole n'est pas efficace pour cette application.

Trois autres espèces, *linariifolia* Smith, *dissitiflora* F. Muell et *uncinata*, souvent riche en 1,8-cinéole ont aussi des variétés riches en terpinène-4-ol (210, 211).

Une étude préliminaire est faite sur l'usage de l'huile essentielle de *Melaleuca linariifolia* riche en terpinolène (212).

Il a été rapporté que deux clones de *Melaleuca alternifolia* cultivé en Californie contiennent un taux en terpinolène supérieur à la normale (213) mais des controverses apparaissent sur l'originalité de cette espèce tant sur le plan morphologique (214) que chimique (215).

L'espèce *trichostachya* (Lindley) Benth. (connue comme l'espèce *linariifolia* var. *trichostachya*) (216) a été identifiée comme possédant des variétés riches en 1,8-cinéole (217) et en α -pinène (218).

I. A. SOUTHWELL et al. ont, en 1992 (219), trouvé des variétés de *trichostachya* et d'*alternifolia* riches en terpinolène (respectivement 39,2-54% et 21,9-45,6%) (205).

III-2- HUILES ESSENTIELLES DE *MELALEUCA QUINQUENERVIA* DU BÉNIN : NOS TRAVAUX

III-2-1- TENEUR EN HUILE

Pour cette huile, il existe une seule plantation répartie en trois zones. Les rendements en huiles essentielles, obtenus à partir des feuilles adultes séchées à l'ombre, varient, sur 12 mois de récolte, de 1,22 à 3,58%.

L'huile essentielle de Niaouli peut être obtenue tout au long de l'année avec un rendement moyen de 1,94%.

Les teneurs en huile, obtenues au cours du stockage à l'ombre des feuilles adultes de Niaouli varient entre 0,85 et 1,45%.

Les rendements en huiles essentielles obtenus par pieds d'arbres pris individuellement varient de 0,6 à 4,24% pour 300 échantillons d'huiles extraites.

Il en résulte que plusieurs facteurs (dont nous étudierons quelques uns) influencent le rendement en huile de Niaouli.

III-2-1-1- INFLUENCE DE LA PÉRIODE DE RÉCOLTE SUR LE RENDEMENT

Le tableau 34 présente les rendements en huile essentielle de Niaouli sur 12 mois entre octobre 1995 et septembre 1996 sur le seul site de Sèmè, Porto-Novo

Nous obtenons un rendement minimum de 1,22% en février, le rendement maximum (3,58%) est obtenu en juin (graphe 23). Les périodes de hauts rendements sont obtenues en

saisons de pluies (2,75, 3,58 et 2,87% pendant la grande saison puis 3,02% durant la petite). Par contre les périodes de faibles rendements correspondent aux saisons sèches (1,22, 1,28%).

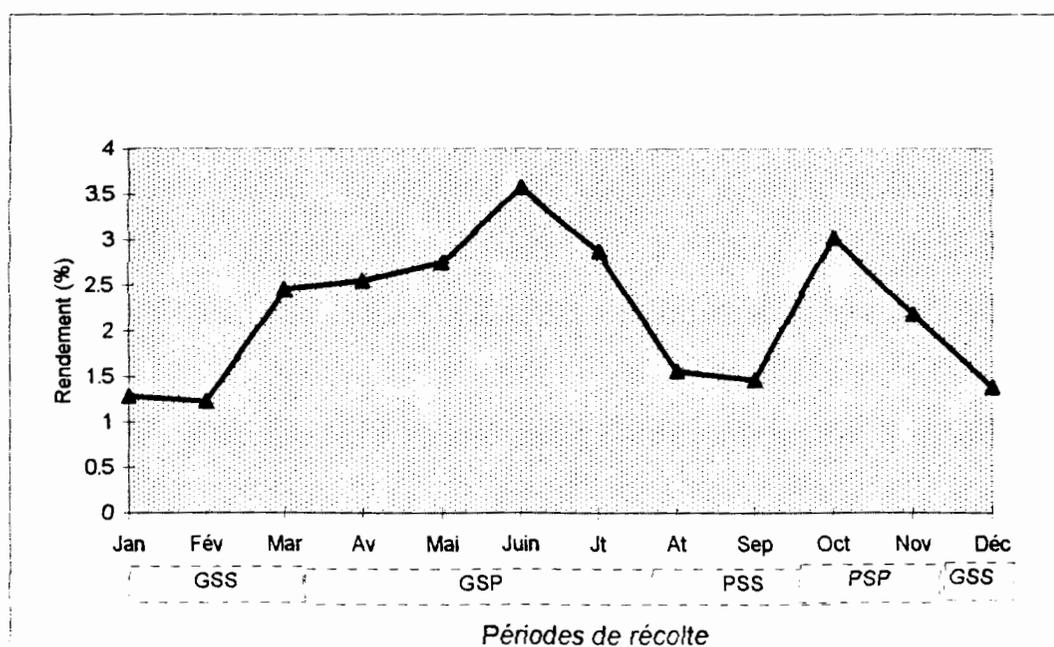
Tableau 34:

Variation du rendement en huiles essentielles de Niaouli entre octobre
1995 et septembre 1996

SAISONS	GSS		GSP					PSS	PSP		GSS	
MOIS	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Juin	Juill	Août	Sep	Oct	Nov	Déc
RENDEMENTS (%)	1,28	1,22	2,46	2,55	2,75	3,58	2,87	1,56	1,46	3,02	2,18	1,38

Graphe 23 :

Courbe de Variation du rendement en huiles essentielles de Niaouli entre octobre 1995 et septembre 1996



III-2-1-2- INFLUENCE DU STOCKAGE SUR LE RENDEMENT

Nous avons étudié l'influence du stockage sur le rendement en huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau entre août et octobre 1997.

On constate que le rendement qui est de 0,85% pour le végétal frais atteint son maximum (1,45%) après six jours de séchage et reste presque constant ($\Delta = 0,07\%$) jusqu'au 14^{ème} jour. On note ensuite une chute des rendements après le 14^{ème} jour puis de faibles variations entre le 20^{ème} et le 40^{ème} jour (graphe 24).

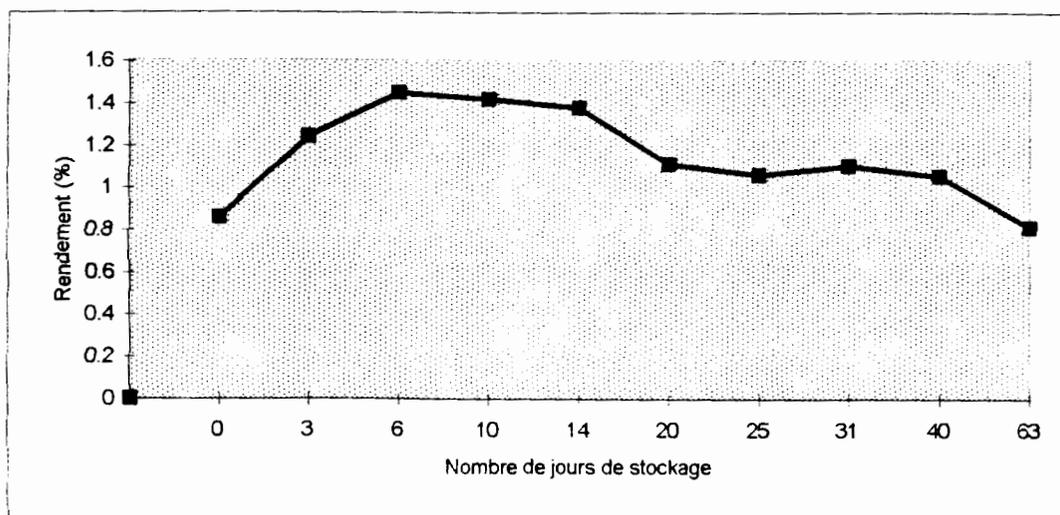
Tableau 35:

Variation des rendements en huile essentielle de Niaouli au cours du stockage entre Août et Octobre 1997

NOMBRE DE JOURS DE STOCKAGE	0	3	6	10	14	20	25	31	40	63
RENDEMENTS (%)	0,85	1,24	1,45	1,42	1,38	1,11	1,06	1,10	1,05	0,81

Graphe 24 :

Courbe de Variation des rendements en huile essentielle de Niaouli au cours du stockage entre Août et Octobre 1997



En somme, il n'y a pas de perte d'huile au cours du séchage jusqu'au 6^{ème} jour. 6 à 14 jours de stockage du végétal et une récolte pendant les saisons des pluies paraissent être les conditions optimales d'extraction pour de meilleurs rendements en huile essentielle de Niaouli d'origine béninoise. L'étude de la composition chimique nous donnera des précisions complémentaires.

III-2-2- PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES DU NIAOULI DU BÉNIN

Les huiles essentielles sont extraites par entraînement à la vapeur d'eau. Elles ont une couleur variable. Sur les 100 échantillons d'huiles essentielles soumis aux analyses physico-chimiques, 35 ont une couleur jaune très pâle, 20 une couleur jaune, 13 sont pâles, 9 sont incolores, 21 une couleur jaune claire, 1 teinté jaune et enfin 1 a une couleur jaune forte.

Du point de vue du pouvoir rotatoire obtenu à 22°C, 60% des huiles sont lévogyres (-0,35 à -6,11%) et les 40% restant sont dextrogyres (+0,69 à +5,01°).

Les indices de réfraction (n_D^{22}) varient entre 1,4741 et 1,4817 et les densités (d_{20}^{22}) de 0,882 à 0,947.

Les huiles sont souvent limpides avec une odeur douce et agréable et un arrière goût rafraichissant légèrement amère.

III-2-3- COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE NIAOULI DU BÉNIN

Afin de déterminer les variations de la composition chimique de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia*, 12 récoltes mensuelles, entre octobre 1995 et septembre 1996 puis une récolte en août 1997, ont été effectuées sur l'ensemble de la plantation béninoise.

Toutes les extractions ont été effectuées par entraînement à la vapeur d'eau. Les résultats analytiques donnent le 1,8-cinéole et le viridiflorol suivi de l' α -terpinéol et le limonène comme produits majoritaires.

III-2-3-1- INFLUENCE DE LA PÉRIODE DE RÉCOLTE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE NIAOULI

Le tableau 36a présente la variation de la composition chimique de l'huile essentielle de Niaouli sur une période de 12 mois successifs.

On remarque que la teneur en 1,8-cinéole de Niaouli d'origine béninoise varie entre 36,33 et 54,38%, celle du viridiflorol de 11,33 à 27,49%, suivi de l' α -terpinéol (9,83 à 14,03%) et de limonène (4,93 à 7,43%) (tableau 36a).

Les pourcentages maximums en 1,8-cinéole sont obtenus en juin (54,38%) et en octobre (52,9%) se situant tous en saison des pluies. Celui en viridiflorol (27,49%) est obtenu en février (grande saison sèche) correspondant à la période d'obtention des minimums (38,1 et 36,33%) en 1,8-cinéole (tableau 36b, graphe 25).

Tableau 36a:

Variation sur 12 mois, de la composition chimique de l'huile essentielle de la plantation de Niaouli du Bénin (octobre 1995-septembre 1996)

Composés chimiques	GSS		GSP				PSS		PSP		GSS	
	Jan	Fév	Mars	Avril	Mai	Juin	Juill	Août	Sept	Oct	Nov	Déc
α-pinène	6,40	4,83	5,50	6,40	3,36	3,31	3,23	4,09	6,93	6,45	5,52	5,50
β -pinène	1,80	1,27	1,60	1,80	1,67	1,33	1,99	1,89	2,66	1,72	1,33	1,60
myrcène	0,30	0,30	0,30	0,30	0,34	0,41	0,61	0,50	0,47	0,30	0,33	0,30
p-cymène	0,60	0,51	0,60	0,60	0,51	0,61	0,40	0,41	0,81	0,60	0,65	0,60
limonène	6,20	4,95	5,90	5,90	5,31	4,53	6,03	7,43	6,22	5,70	4,93	5,80
1,8-cinéole	38,1	36,3	42,7	42,7	51,4	54,4	50,8	46,7	47,8	52,9	48,7	42,4
γ -terpinène	0,70	0,72	0,60	0,60	0,44	0,40	0,61	0,43	0,55	0,50	0,49	0,70
linalol	0,16	0,42	0,17	0,17	tr	0,20						
terpinèn-4-ol	1,10	1,26	1,10	0,90	0,71	0,78	1,40	0,72	1,01	0,95	1,01	1,10
α-terpinéol	11,4	11,9	12,9	12,5	12,4	13,1	14,0	9,83	12,3	12,2	12,1	12,5
acétate d' α -terpényle	tr	3,05	0,15	tr	tr	-						
β - caryophyllène	0,09	0,39	0,10	0,10	0,20	0,12	0,28	0,32	0,21	0,10	0,23	0,10
α -humulène	0,10	tr	0,07	0,10	tr	tr	tr	tr	tr	0,10	tr	0,10
viridiflorène (lédène)	tr	0,34	tr	tr	0,30	0,21	0,18	0,32	0,26	tr	0,19	-
lédol	1,50	tr	1,30	1,40	tr	tr	tr	tr	tr	0,80	tr	1,30
t-nérolidol	tr	tr	tr	3,24	tr	-						
Spathuléol	2,50	tr	0,40	0,10	0,18	0,19	tr	tr	tr	tr	tr	3,55
oxyde de caryophyllène	0,70	1,63	0,70	0,20	1,06	0,99	0,82	1,06	0,91	0,40	0,96	0,75
viridiflorol	20,9	27,5	17,1	14,8	18,4	15,6	15,3	18,0	14,1	11,3	16,4	16,5
t-cardinol	0,3	0,70	0,20	0,20	0,47	0,45	0,29	0,38	0,25	0,08	0,34	0,20
α -cardinol	0,15	0,88	0,10	0,09	0,34	0,22	0,37	0,49	0,31	0,07	0,40	0,10
Total	93	95,9	94,3	94,5	98,4	97,9	97,1	96,2	95,9	94,0	94,8	93,3

D'une manière générale, on constate d'une part, que les teneurs en 1,8-cinéole varient en sens inverse avec celles en viridiflorol et d'autre part, que les pourcentages des autres composés varient très peu dans une certaine mesure au cours de l'année et tournent autour d'une moyenne respective de 5,6% pour l' α -pinène, 5,7% pour le limonène et 12,3% pour l' α -terpinéol (tableau 36b, graphe 25).

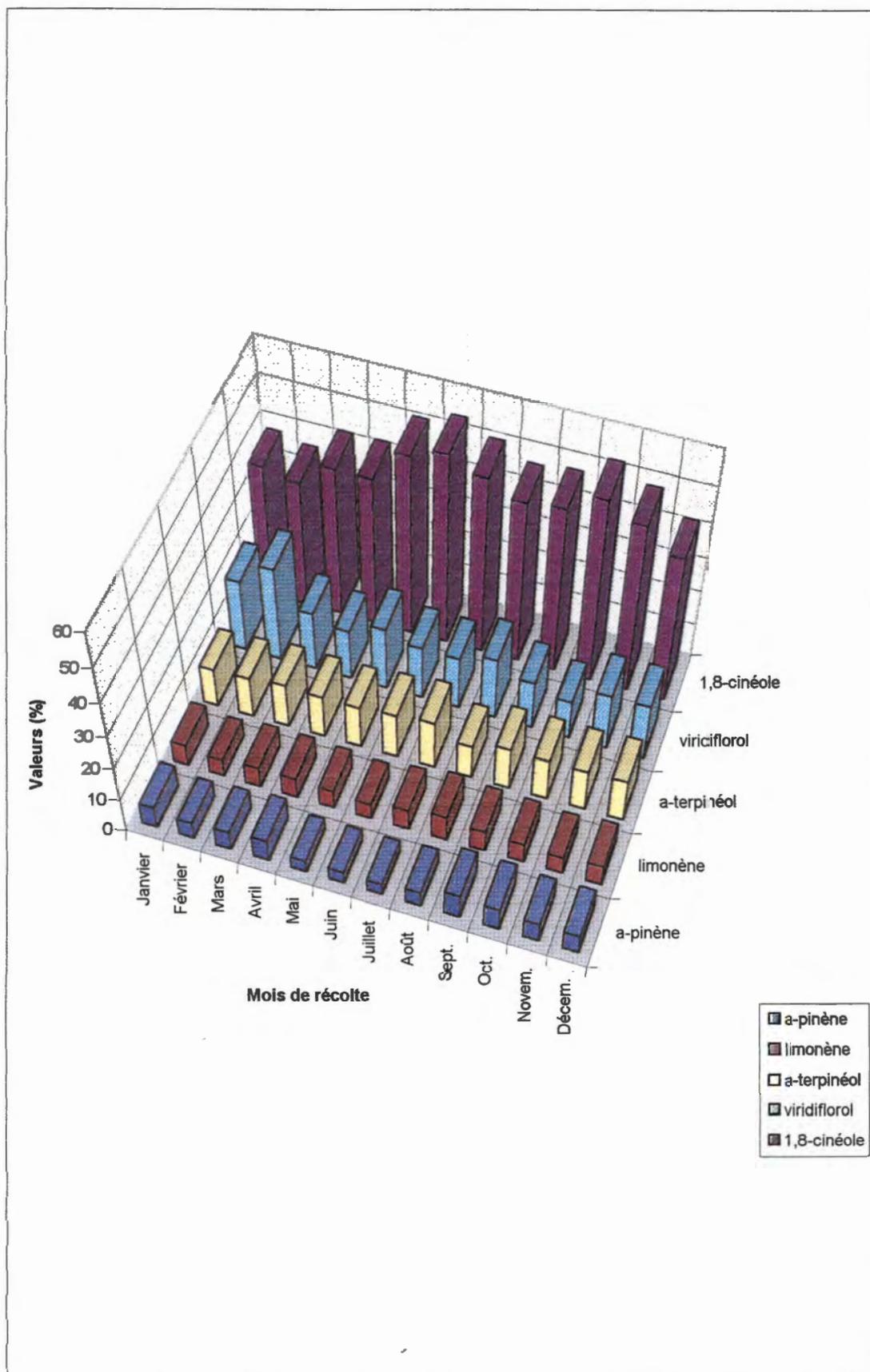
Au vu de ces premiers résultats, le peuplement de Niaouli du Bénin est à dominance 1,8-cinéole. Des précisions complémentaires nous seront également données par les analyses statistiques.

Tableau 36b:

Variation des pourcentages des composés majoritaires de l'huile de Niaouli

Composés Chimiques	GSS			GSP				PSS		PSP		GSS		% Moyens
	Jan	Fév	Mars	Avril	Mai	Juin	Juill	Août	Sept	Oct	Nov	Déc		
α-pinène	6,40	4,83	5,50	6,40	3,36	3,31	3,23	4,09	6,93	6,45	5,52	5,50	5,58	
limonène	6,20	4,95	5,90	5,90	5,31	4,53	6,03	7,43	6,22	5,70	4,93	5,80	5,72	
1,8-cinéole	38,1	36,3	42,7	42,7	51,4	54,4	50,8	46,7	47,8	52,9	48,7	42,4	46,5	
α-terpinéol	11,4	11,9	12,9	12,5	12,4	13,1	14,0	9,83	12,3	12,2	12,1	12,5	12,3	
viridiflorol	20,9	27,5	17,1	14,8	18,4	15,6	15,3	18,0	14,1	11,3	16,4	16,5	17,15	

Graphe 25 : Histogramme de variation des pourcentages des composés majoritaires de l'huile de Niaoul



III-2-3-2- INFLUENCE DU STOCKAGE SUR

LA COMPOSITION CHIMIQUE

Le tableau 37 présente la variation des pourcentages des principaux composés chimiques en fonction du stockage ; le graphe 26, quant à lui, montre l'histogramme de la variation des composés majoritaires.

En effet, la teneur en 1,8-cinéole atteint son maximum entre le 6^{ème} et le 10^{ème} jour (39,35 et 40,76%), elle chute entre le 14^{ème} et le 40^{ème} jour (36,73 à 33,41%) pour atteindre une plus faible valeur (28,08%) le 63^{ème} jour. Parallèlement, les taux en α -terpinéol et en limonène chute faiblement pendant la 1^{ère} période respectivement de 5,50 à 3,43% et de 5,15 à 3,96% pour remonter durant la seconde période de 7,2 à 12,72% pour l' α -terpinéol et de 4,25 à 11,82% pour le limonène. Dans la première période, le viridiflorol diminue légèrement de 22,50 à 19,51%, augmente ensuite pour garder une teneur de faibles variations jusqu'au 40^{ème} jour ($\Delta=1,34\%$) et chute enfin à 19,7% le 63^{ème} jour. L' α et le β -pinène gardent des proportions autour de 3 et de 1%, l'acétate de terpényle, quant à lui, évolue en sens inverse de l' α -terpinéol.

Par ailleurs, on observe la diminution des monoterpènes au profit des sesquiterpènes ce qui explique la présence d'autres produits comme le lédol, le spathuléol (isomères du viridiflorol) et l'oxyde de caryophyllène en proportions plus élevées.

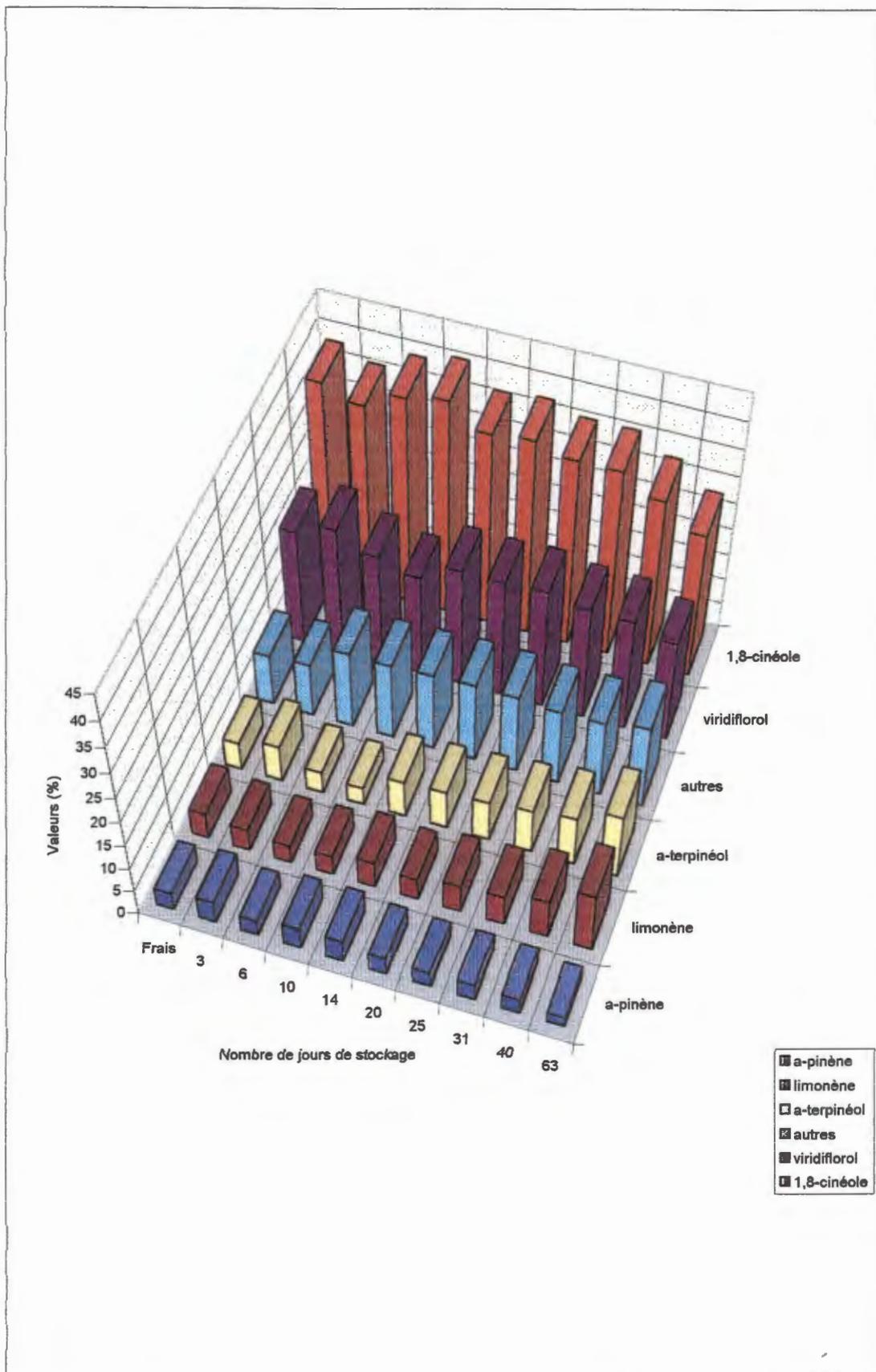
En somme, il apparaît que l'augmentation du volume, à une période bien déterminée lors du séchage est une réponse à l'activité métabolique de production de l'huile par les glandes sécrétrices continuant dans les feuilles même après la récolte (220-222). On n'observe aucun changement dans la composition chimique de l'huile (220, 221), mais seulement après, à cause de leur volatilité, la teneur des constituants diminuent plus ou moins dans le temps.

Tableau 37:

Variation, au cours du stockage, des principaux composés de l'huile essentielle de la plantation de Niaouli du Bénin (août-octobre 1997)

PRINCIPAUX COMPOSÉS	NOMBRE DE JOURS DE STOCKAGE									
	0	3	6	10	14	20	25	31	40	63
α -pinène	3,52	4,34	3,14	4,22	4,37	3,50	3,08	3,25	3,00	1,90
β -pinène	1,56	2,01	0,92	1,70	1,10	0,92	0,73	1,32	1,25	0,29
limonène	5,15	4,31	3,54	3,96	5,14	4,25	5,54	5,94	7,72	11,82
1,8-cinéole	38,45	36,20	39,35	40,76	36,73	37,41	35,73	35,76	32,41	28,08
terpinèn-4-ol	1,77	1,85	1,54	0,90	1,13	1,00	1,08	1,00	1,05	0,31
α -terpinéol	5,50	7,22	4,32	3,43	7,20	7,60	7,97	8,74	9,77	12,72
acétate d' α -terpényle	3,33	2,61	4,45	5,30	2,60	1,38	1,03	0,90	0,61	0,48
viridiflorol	22,20	24,63	21,53	19,51	22,97	22,80	23,13	21,98	21,79	19,7
lédol+spathuléol+ oxyde de caryophyllène (autres)	10	10,4	15,05	15,01	15,19	15,53	15,46	14,9	15	16,28
TOTAL	91,78	93,57	93,84	94,79	95,43	94,39	93,75	93,8	92,56	90,58

Graphe 26: Histogramme de variation, au cours du stockage, des principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de la plantation de Niaouli du Bénin (août-octobre 1997)



III-2-4- ANALYSES STATISTIQUES MULTIVARIÉES

L'analyse statistique multivariée permet de mettre en évidence l'existence de chémotype au sein d'un peuplement. Nous l'avons appliquée à l'espèce *Melaleuca quinquenervia* acclimatée au Bénin.

III-2-4-1- MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans le but de déterminer le chémotype dominant au sein de l'espèce *Melaleuca quinquenervia* du Bénin, nous avons choisi au hasard 25 pieds d'arbres par zone (3 zones) de peuplement ; 4 récoltes saisonnières ont été effectuées.

Les données sont transformées en variables centrées et réduites.

Dans un premier temps, les données sont constituées de 300 échantillons d'huiles essentielles extraites des feuilles adultes issues de 4 récoltes sur 75 arbres individuels de Niaouli et 40 constituants chimiques. 38 ont été identifiés sur une colonne de type DB-5 et de type Supelcowax ; en plus de ces 38 composés, deux autres ont été identifiés sur une colonne de type CP Wax 52 CB et confirmés par couplage CPG/SM (tableau 38, figures 16).

En utilisant l'Analyse par Composantes Principales (P.C.A.), les composés possédant des coefficients de corrélation élevés sont supprimés de l'analyse ; 21 variables (composés chimiques) sont retenus (en gras dans le tableau 38).

Dans un deuxième temps, en utilisant l'Analyse par Discriminant Factoriel (F.D.A.), les 300 échantillons d'huiles essentielles sont classées en 3 chémotypes. La relation échantillons-population est établie avec la distance critique des échantillons au centre de gravité.

Enfin, toujours en utilisant F.D.A., les échantillons sont classés en 4 groupes correspondant aux saisons climatiques du Bénin.

Figure 16-a :

Impact électronique de l'huile essentielle de Niaouli obtenu par couplage CPG/SM

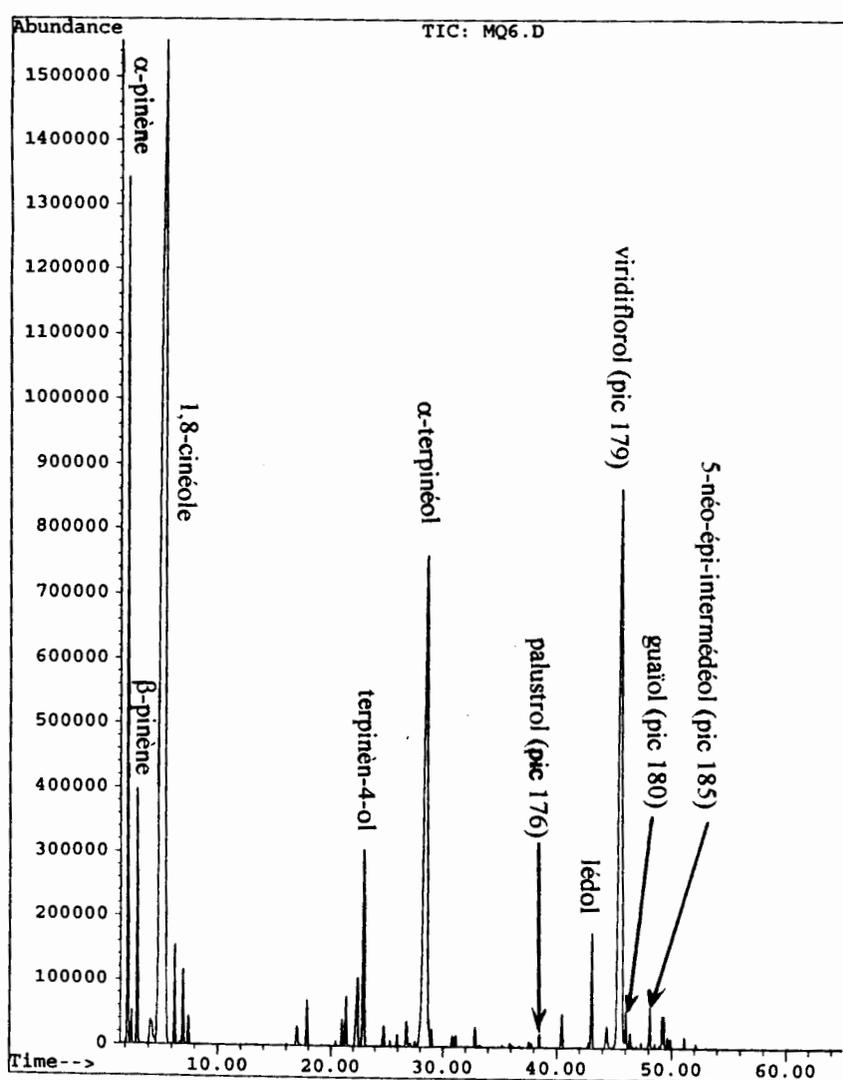


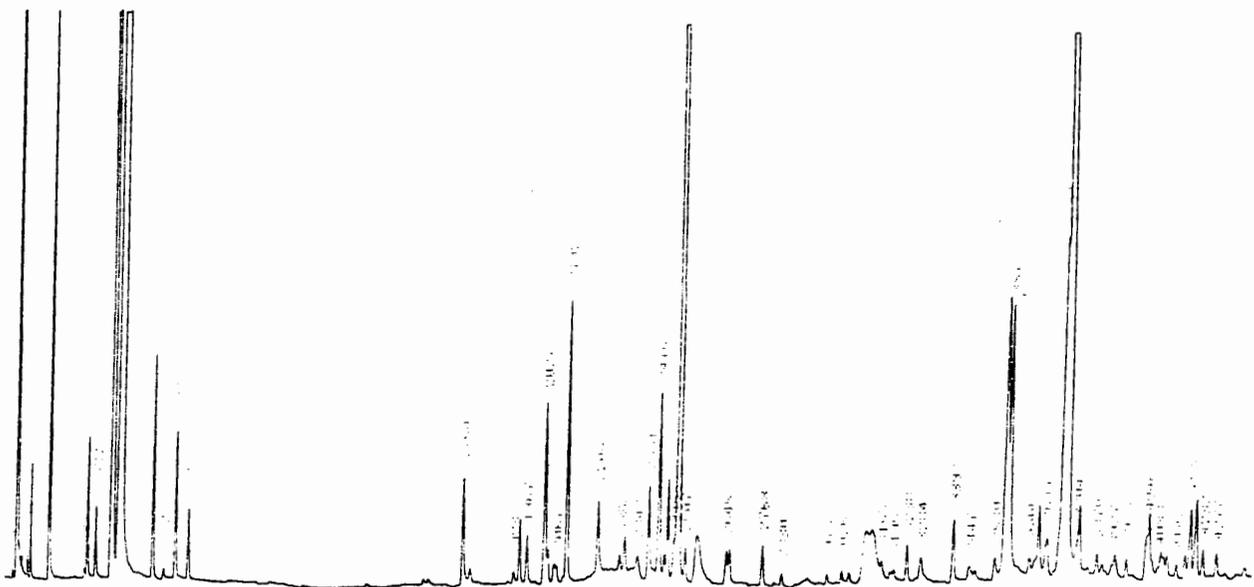
Tableau 38: Pourcentage minimal et maximal des composés chimiques de 300 échantillons d'huile essentielle de Niaouli du Bénin issue de 4 récoltes, par ordre d'élution sur une colonne de type DB-5.

N°-	COMPOSÉS	I.K. DB-5	POURCENTAGES			VARIATIONS
			MINIMUMS	MAXIMUMS	MOYENS	
1	α-pinène	940	1,50	12,5	5,08	11,90
2	camphène	953	0,80	0,20	0,12	-
3	benzaldéhyde	961	tr	0,15	0,02	-
4	β-pinène	979	0,66	2,66	1,53	2,00
5	myrcène	992	tr	0,80	0,38	0,80
6	α -terpinène	1018	0,10	0,20	0,12	-
7	p-cymène	1027	0,27	1,00	0,51	0,73
8	limonène	1032	1,55	7,56	5,30	6,01
9	1,8-cinéole	1034	2,55	59,96	35,87	57,41
10	(E)- β -ocymène	1050	tr	0,15	0,04	-
11	γ-terpinène	1062	tr	1,00	0,55	1,00
12	terpinolène	1088	0,13	0,30	0,20	-
13	α -phellandrène	1100	tr	tr	tr	-
14	linalol	1108	0,13	0,53	0,28	0,40
15	fenchol	1114	0,20	0,70	0,49	-
16	cis-thujan-4-ol	1133	0,20	0,30	0,23	-
17	camphre	1143	0,20	0,40	0,27	-
18	terpinèn-4-ol	1179	0,34	1,76	0,95	1,42
19	α-terpinéol	1190	1,12	15,03	9,83	13,91
20	acétate d'α-terpényle	1350	tr	4,40	0,49	4,4
21	β-caryophyllène	1420	tr	1,71	0,50	1,71
22	α -himachalène	1447	tr	0,30	0,05	-
23	α-humulène	1458	0,07	0,60	0,17	0,53
24	alloaromadendrène	1461	0,05	0,30	0,14	-
25	viridiflorène (lédène)	1501	0,15	1,08	0,42	0,93

26	γ 2-cardinène	1513	tr	1,01	0,06	-
27	δ -cadinène	1524	tr	0,10	0,05	-
28	lédol	1565	0,80	1,50	1,26	0,70
29	t-nérolidol	1568	tr	3,24	0,54	3,24
30	Spathulénol	1574	tr	3,55	1,09	3,55
31	Oxyde caryophyllène	1581	0,44	3,85	1,15	3,45
32	Viridiflorol	1593	10,50	62,7	27,32	52,20
33	guaïol*	1595	tr	0,21	0,16	-
34	γ -eudesmol	1630	tr	0,10	0,09	-
35	t-cardinol	1642	0,08	1,35	0,60	1,27
36	β -eudesmol	1649	0,10	0,40	0,23	-
37	α -eudesmol	1652	0,10	0,30	0,19	-
38	α -cardinol	1656	tr	2,10	0,65	2,10

Figure 16-b :

Chromatogramme sur colonne de type CPWax 52 CB de l'huile essentielle de
Niaouli



II-2-4-2- RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

III-2-4-2-1- COMPOSITION CHIMIQUE ET VARIATION DES POURCENTAGES DES COMPOSÉS IDENTIFIÉS

Le tableau 38 présente les 38 composés identifiés sur les colonnes DB-5 et Supelcowax par calcul de leurs indices de Kovats. Selon la bibliographie dont nous disposons (196, 201-204, 207, 208), deux nouveaux composés, en plus des 38 précédents, ont été identifiés sur une colonne CPWax 52 CB ; il s'agit du **palustrol** (IK DB-5: 2314) et du **5-épinéointermédéol** (5-épi-paradisiol) jamais signalés dans la littérature. Leurs structures sont confirmées par le couplage CPG/SM (figures 17-a et 17-b). Le **guaïol** (sous réserve), mais aussi confirmé par couplage CPG/SM, (figure 17-c) semble être également un nouveau produit non encore signalé dans la littérature.

D'autre part, le tableau 38 présente les variations et les moyennes des constituants identifiés dans les 300 échantillons d'huiles essentielles de Niaouli analysées.

Après une analyse statistique les noms en gras sont retenus.

Les différences entre taux minimums et maximums sont très grandes pour certains composés : C'est le cas des hydrocarbures comme l' α -pinène (1,50-12,50%) avec une teneur moyenne de 5,08%, le limonène (1,55-7,56%) avec 5,30% comme pourcentage moyen, dans une certaine mesure le β -pinène (0,66-2,66%), et l' α -caryophyllène (trace à 1,71%), et de certains produits oxygénés : 1,8-cinéole (2,55-59,96%) avec 35,87% de moyenne, α -terpinéol (1,12-15,03%) et viridiflorol (10,50-62,7%) avec 9,83 et 27,32% comme taux moyens respectifs. On peut également citer l'acétate d' α -terpényle (trace à 4,4%), le T-nérolidol (tr à 3,24%), le spathuléol (tr à 3,55%) et le trans-oxyde de caryophyllène (0,44-3,85%).

Par ailleurs, on remarque que les huiles essentielles de Niaouli d'origine béninoise sont très riches en composés oxygénés ; ils représentent les 83,95% en teneur de tous les 40 composés identifiés dont les principaux sont ceux cités précédemment, les hydrocarbures eux ne représentent que les 16,04% restants.

Figure 17-a :

Spectre de masse du palustrol

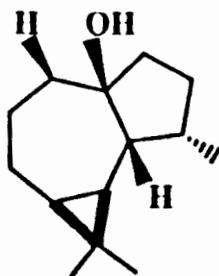
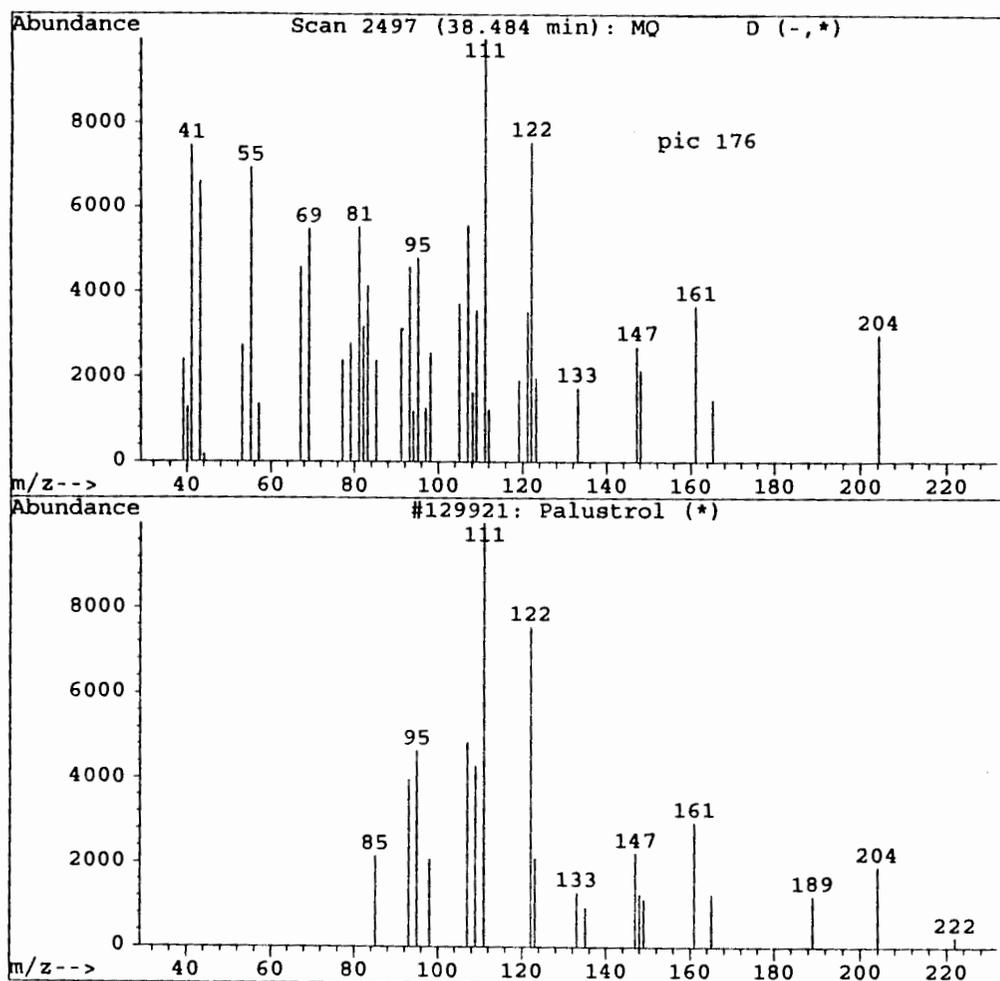


Figure 17-b :

Spectre de masse de 5-épi-paradisiol

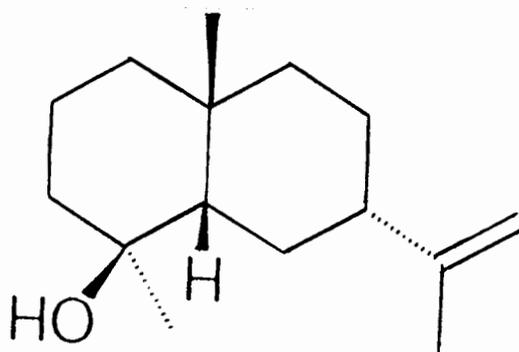
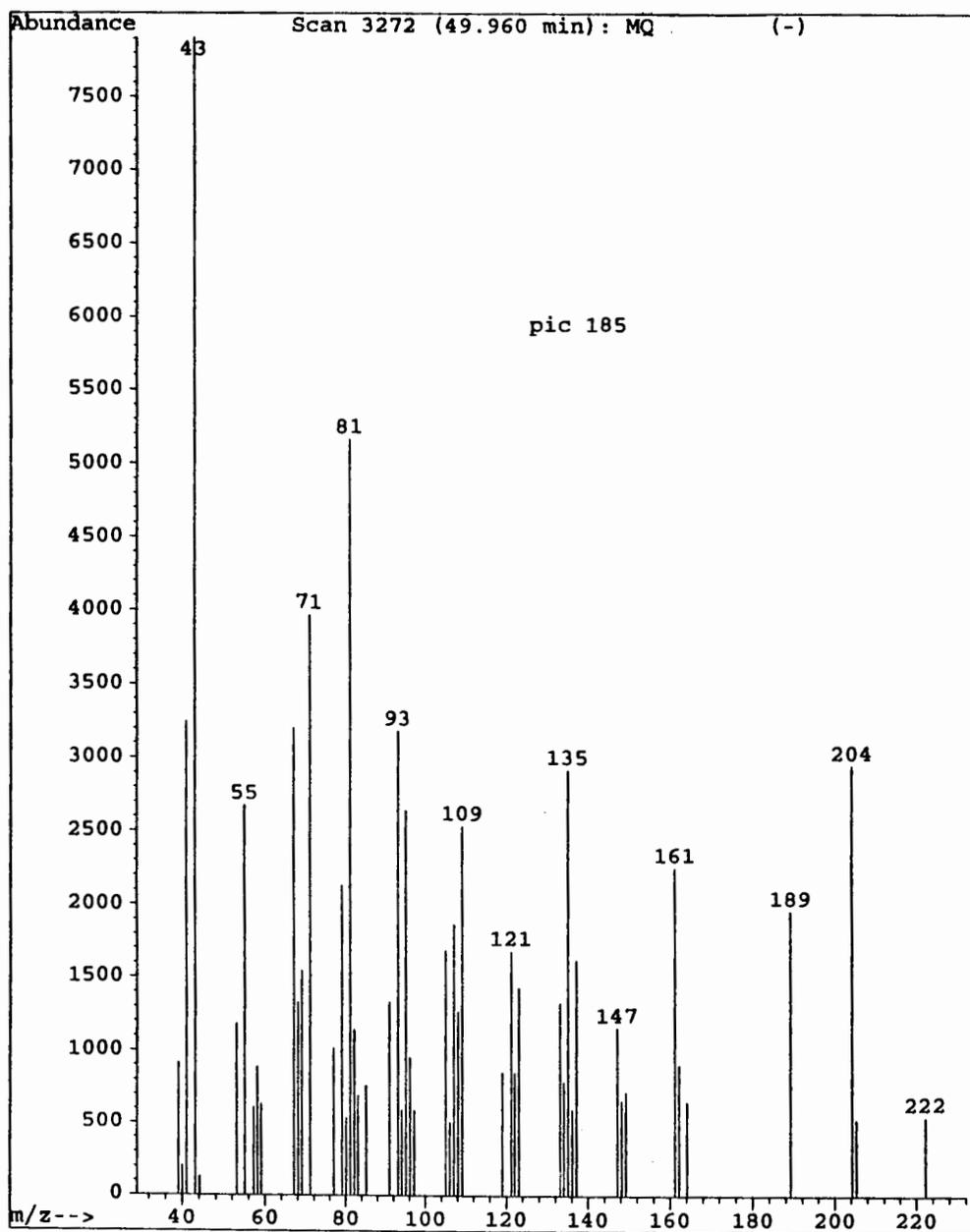
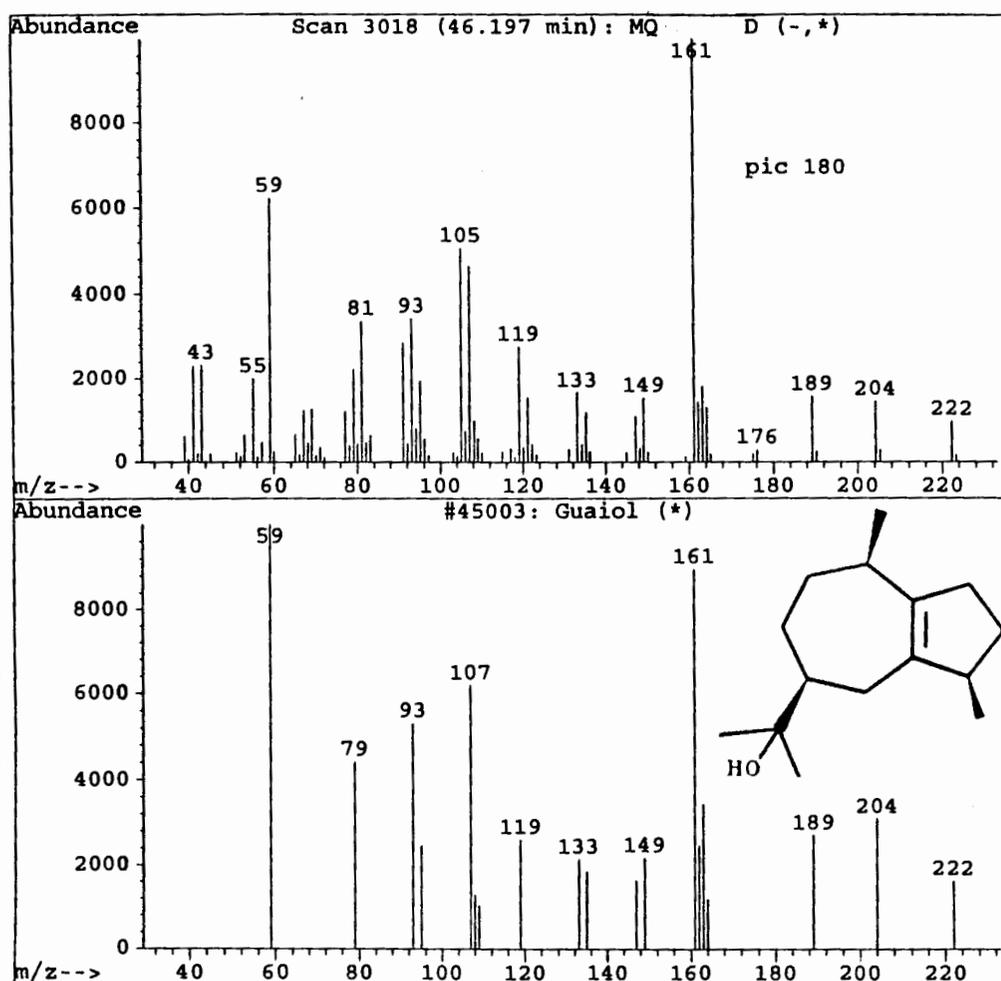


Figure 17-c :

Spectre de masse de guaïol



III-2-4-2-2- ANALYSES STATISTIQUES ULTIVARIÉES

Les 21 composés retenus sont présentés dans le tableau 39a par ordre de leur élution sur la colonne DB-5. Les figures 18 et 19 montrent respectivement la position des 21 constituants chimiques et des 300 échantillons dans l'espace réduit des deux (premières) composantes principales et suivant les deux axes discriminants. On constate que les coefficients de corrélation entre variables sont assez distincts et que les chémotypes sont bien différenciés en trois types.

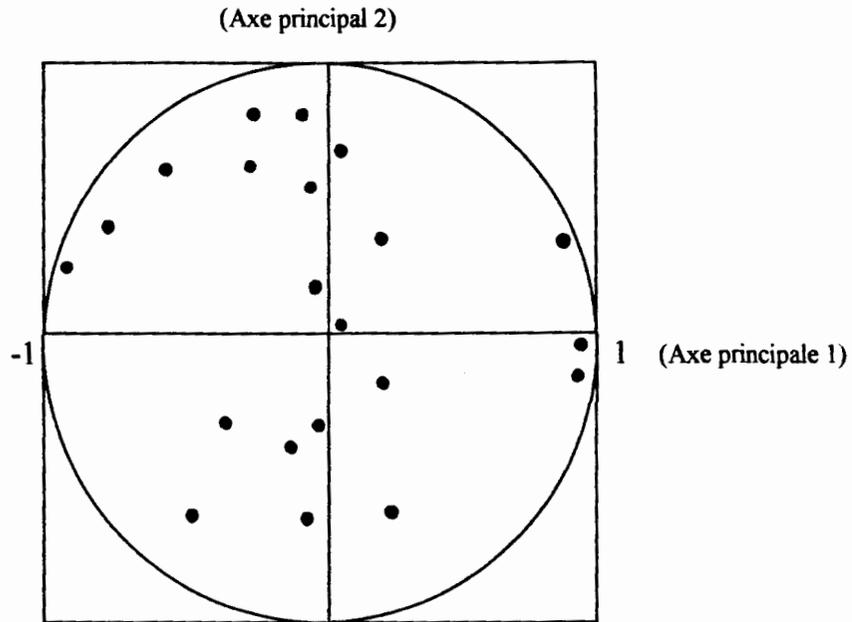
Tableau 39a:

Composition des différents types chimiques de *Melaleuca quinquenervia* du Bénin issus de 300 échantillons d'huile essentielle

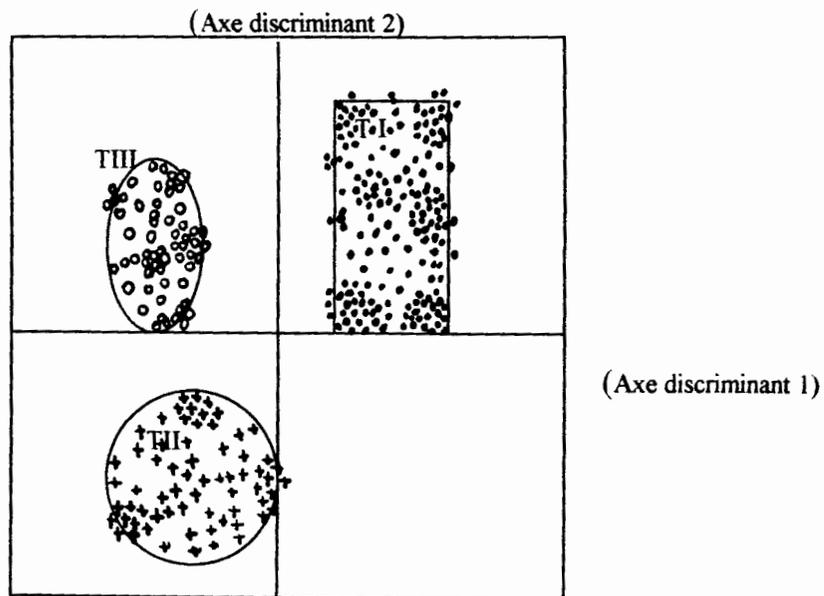
COMPOSÉS RETENUS	DIFFÉRENTS TYPES CHIMIQUES		
	TYPE I à 1,8-cinéole	TYPE II à 1,8-cinéole + viridiflorol	TYPE III à viridiflorol
α-pinène	5,30	5,49	5,94
β-pinène	1,35	1,42	1,58
myrcène	0,41	0,38	0,35
p-cymène	0,52	0,48	0,60
limonène	5,60	5,39	4,37
1,8-cinéole	49,64	33,18	12,40
γ-terpinène	0,56	0,65	0,82
linalol	0,21	0,25	0,28
terpinèn-4-ol	0,92	0,87	1,24
α-terpinéol	10,74	7,80	4,12
acétate d'α-terpényle	0,61	0,88	0,75
β- caryophyllène	0,23	0,76	0,96
α-humulène	0,10	0,17	0,21
viridiflorène (lédène)	0,62	0,945	0,74
lédol	1,06	1,49	1,26
t-nérolidol	0,45	0,54	0,49
Spathuléol	0,26	0,45	4,20
Oxyde de caryophyllène	0,73	1,25	1,78
Viridiflorol	16,48	31,97	50,31
t-cardinol	0,37	0,76	1,06
α-cardinol	0,33	0,46	0,67
TOTAL	96,48	95,58	94,41

Figure 18 :

Position des 21 constituants de l'huile essentielle de Niaouli du Bénin dans l'espace réduit des deux premières composantes principales

**Figure 19 :**

Position des 300 échantillons de l'huile essentielle de Niaouli du Bénin dans l'espace réduit des deux axes discriminants



1°- Type I avec un fort pourcentage en 1,8-cinéole (49,64%) suivi de viridiflorol (16,48%) comme second composé majoritaire, c'est le chémotype à 1,8-cinéole représentant 58% des échantillons (174 échantillons).

2°- Chémotype aux pourcentages approximativement égaux de 1,8-cinéole (33,18%) et de viridiflorol (31,97%). Il constitue le type II et représente 22% des échantillons étudiés (66 échantillons).

3°- Le type III est à viridiflorol (50,31%) et 1,8-cinéole (12,40%) comme deuxième composé majoritaire. Ce chémotype à viridiflorol représente les 20% restants (60 échantillons).

Dans tous les trois chémotypes, on trouve l' α -pinène à des teneurs presque égales (5,58%), le limonène (5,60 ; 5,39 et 4,37%) et l' α -terpinéol (10,74 ; 7,80 et 4,12%) (tableau 39b, graphe 27).

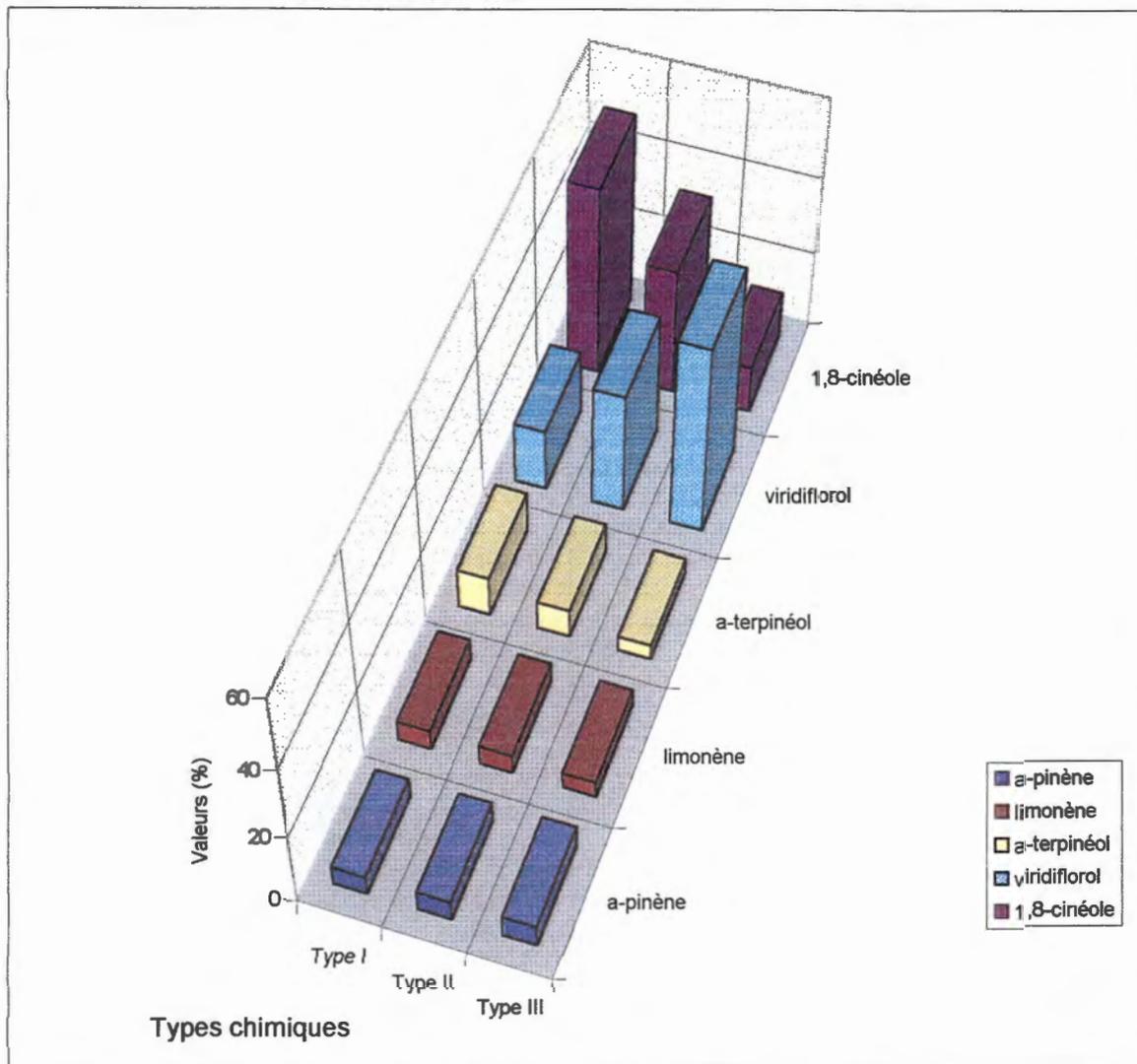
Il en résulte que la plantation de *Melaleuca quinquenervia* acclimaté au Bénin est à chémotype 1,8-cinéole dominant (58% de la population) (graphe28) accompagné des types II (22%) et III (20%).

Tableau 39b :

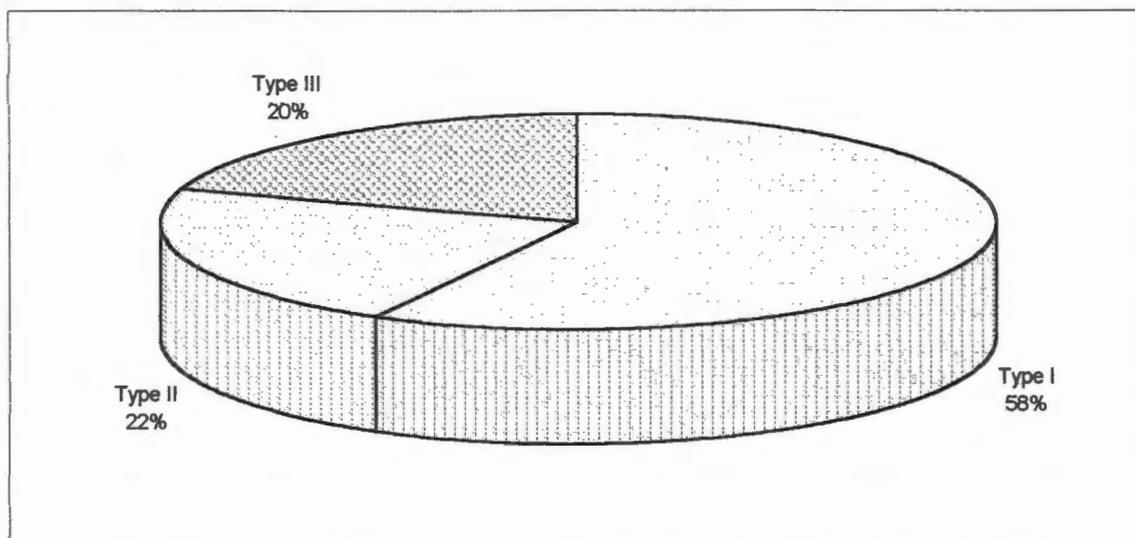
Constituants majoritaires des différents types chimiques d'huile essentielle de Niaouli du Bénin

COMPOSÉS RETENUS	DIFFÉRENTS TYPES CHIMIQUES		
	TYPE I à 1,8-cinéole	TYPE II à 1,8- cinéole+viridiflorol	TYPE III à viridiflorol
α -pinène	5,30	5,49	5,94
limonène	5,60	5,39	4,37
1,8-cinéole	49,64	33,18	12,40
α -terpinéol	10,74	7,80	4,12
viridiflorol	16,48	31,97	50,31

Graphe 27 : Histogramme des constituants des composés majoritaires d'huile essentielle de Niaouli au Bénin



Graphe 28: Pourcentages de répartition des types chimiques au sein de la plantation de Niaouli au Bénin



III-2-4-2-3- INFLUENCE DE LA SAISON SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DES TROIS CHÉMOTYPES

Comme la composition chimique peut être modifiée avec les conditions agroclimatiques, nous avons effectué des récoltes de feuilles adultes de Niaouli pendant chacune des 4 saisons existant au Bénin. Le tableau 40 présente la composition chimique des différents types chimiques durant les 4 saisons. L'étude a porté sur 75 échantillons par saison.

On constate d'une part (tableaux 40a et 40b, graphe 29), que le pourcentage des constituants majoritaires varie, d'une manière générale, très faiblement au sein de chaque type et pendant les quatre saisons ; ainsi, le tableau 41 en présente la récapitulation. Pour le β -pinène, les variations sont respectivement de 0,56 ; 0,16 et 0,39% et pour le lédol de 0,23 ; 0,23 et 0,83%. Aucune variation ne dépasse 4% pour les deux composés (1,8-cinéole et viridiflorol) permettant de déterminer les chémotypes. Au sein du type II, un seul composé secondaire, α -terpinéol, a une variation de 5% durant les saisons (tableau 41).

D'autre part, comme le montrent les figures 21 et 22, les 21 composés sont équidistants du centre et les 300 échantillons sont groupés autour de l'origine des 2 axes discriminant.

Enfin, on peut dire que les saisons climatiques n'ont presque pas d'influence sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* acclimaté au Bénin ; ainsi huile de Niaouli du Bénin demeure stable toute l'année. En effet, l'analyse en composantes principales (ACP) sur données brutes (matrice de variance covariance) et sur données centrées réduites (matrice de corrélation) donnent les mêmes résultats.

Variables	Moyennes	Écarts-types
PSP	4,577	8,9340
GSS	4,548	8,9723
GSP	4,619	8,8876
PSS	4,584	8,9439

Tableau 40a :

Variation de la composition chimique des différents types d'huiles essentielles de Niaouli du Bénin durant les 4 saisons climatiques (75 échantillons par saison)

Composés	PSP(octobre 1995)			GSS (février 1996)			GSP (juin 1996)			PSS (août 1996)		
	Type I	Type II	Type III	Type I	Type II	Type III	Type I	Type II	Type III	Type I	Type II	Type III
α-pinène	5,40	6,14	6,34	5,66	6,07	6,28	6,45	5,87	6,12	5,92	6,00	6,23
β -pinène	1,58	1,71	1,52	1,16	1,67	1,39	1,72	1,55	1,00	1,65	1,63	1,26
myrcène	0,41	0,37	0,27	0,38	0,37	0,23	0,30	0,34	0,10	0,35	0,35	0,19
p-cymène	0,52	0,58	0,80	0,54	0,60	0,70	0,60	0,66	0,40	0,56	0,62	0,60
limonène	6,00	5,49	5,07	5,92	5,50	5,08	5,70	5,53	5,10	5,85	5,51	5,10
1,8-cinéole	49,6	30,2	12,6	49,2	31,6	12,6	51,2	27,5	12,4	49,3	30,4	12,3
γ -terpinène	0,21	0,75	0,92	0,28	0,70	0,90	0,50	0,56	0,82	0,35	0,65	0,92
linalol	0,16	0,29	0,38	0,15	0,28	0,37	0,13	0,27	0,34	0,15	0,28	0,36
terpinèn-4-ol	0,92	1,03	1,52	0,94	1,07	1,44	0,95	1,22	1,20	0,93	1,12	1,36
α-terpinéol	11,5	11,2	4,31	11,7	9,89	5,30	12,2	15,1	8,10	11,8	11,6	6,30
acétate d' α -terpényle	0,82	1,38	1,52	0,89	1,32	1,50	1,10	1,17	1,45	0,96	1,27	1,48
β - caryophyllène	0,23	0,77	1,16	0,20	0,75	1,17	0,10	0,70	1,20	0,16	0,73	1,18
α -humulène	0,15	0,31	0,35	0,16	0,29	0,34	1,10	0,25	0,33	0,15	0,28	0,34
lédène	0,26	0,59	0,84	0,30	0,58	0,81	0,42	0,55	0,62	0,34	0,57	0,78
lédol	1,26	1,59	1,47	1,10	1,53	1,75	1,20	1,36	2,30	1,03	1,47	2,03
t-nérolidol	0,43	0,55	0,64	0,44	0,54	0,62	0,48	0,53	0,49	0,45	0,54	0,65
Spathuléol	0,21	0,52	0,83	0,23	0,52	0,79	0,31	0,52	0,57	0,26	0,52	0,75
oxyde de caryophyllène	1,05	1,88	2,46	0,88	1,84	2,18	0,40	1,75	1,34	0,72	1,81	1,90
viridiflorol	15,48	29,97	49,7	15,86	29,90	48,94	12,46	29,7	51,0	15,24	29,83	49,96
t-cardinol	0,39	0,77	1,10	0,30	0,76	0,95	0,40	0,74	0,50	0,24	0,75	0,80
α -cardinol	0,31	0,74	0,86	0,32	0,70	0,89	0,35	0,58	0,98	0,33	0,66	0,93
TOTAL	96,9	95,7	94,66	96,6	96,44	94,62	96,96	96,63	96,36	96,9	96,56	94,62

Tableau 40 b : Variation saisonnière des composés majoritaires des différents types chimiques d'huile essentielle de Niaouli du Bénin

	Type I				Type II				Type III			
	PSP	GSS	GSP	PSS	PSP	GSS	GSP	PSS	PSP	GSS	GSP	PSS
α -pinène	5.4	5.66	6.45	5.92	6.14	6.07	5.87	6	6.34	6.28	6.12	6.23
limonène	6	5.92	5.7	5.85	5.49	5.5	5.53	5.51	5.07	5.08	5.1	5.1
α -terpinéol	11.47	11.65	12.2	11.83	11.17	9.89	15.08	11.62	4.31	5.3	8.1	6.3
viridiflorol	15.48	15.86	12.46	15.24	29.9	29.9	29.7	29.83	49.7	48.94	51	49.96
1,8-cinéole	49.64	49.24	51.24	49.27	30.2	31.57	27.5	30.35	12.6	12.55	12.4	12.5

Graphe 29 : Histogramme de variation saisonnière des composés majoritaires des différents types chimiques d'huile essentielle de Niaouli du Bénin

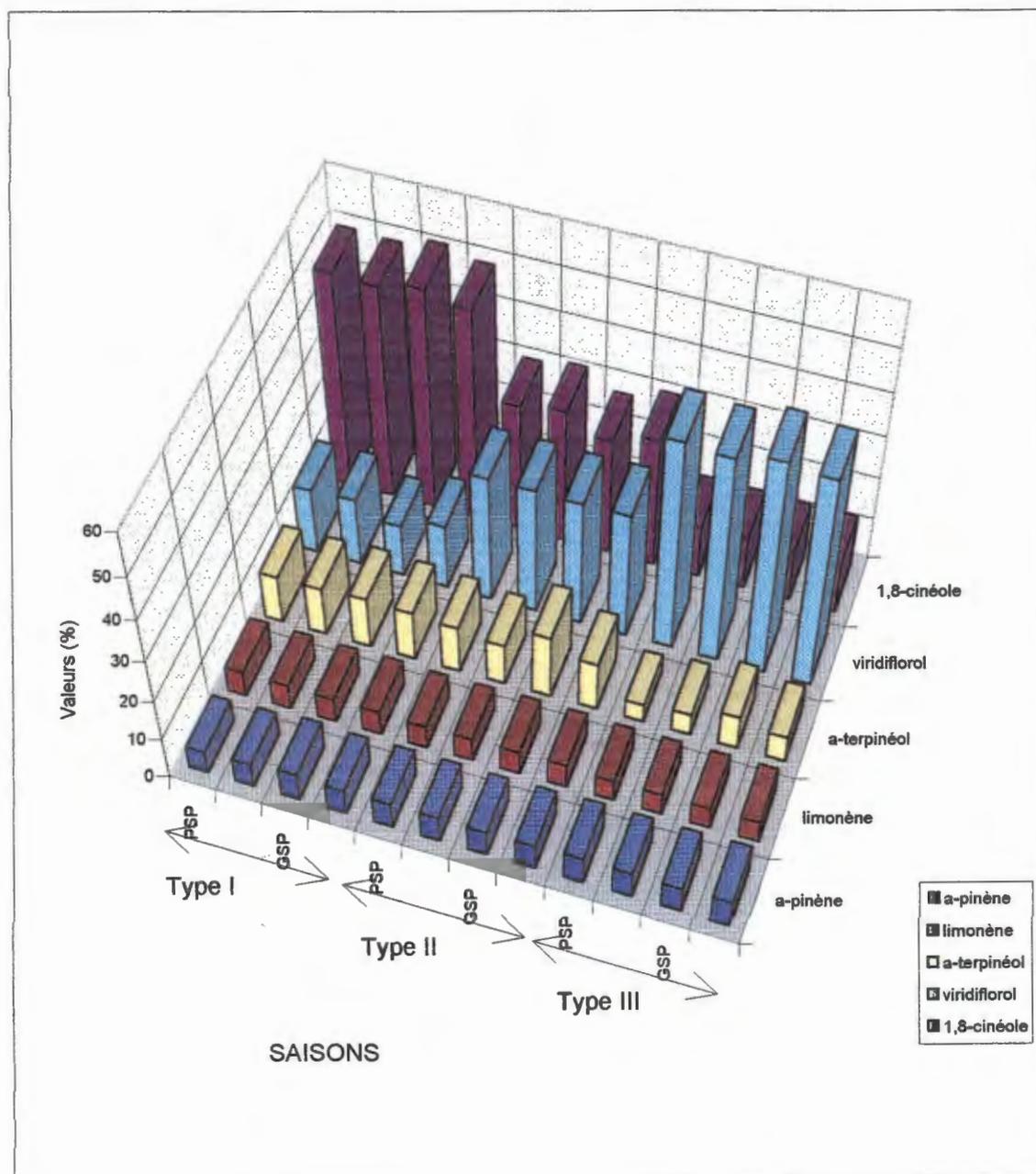
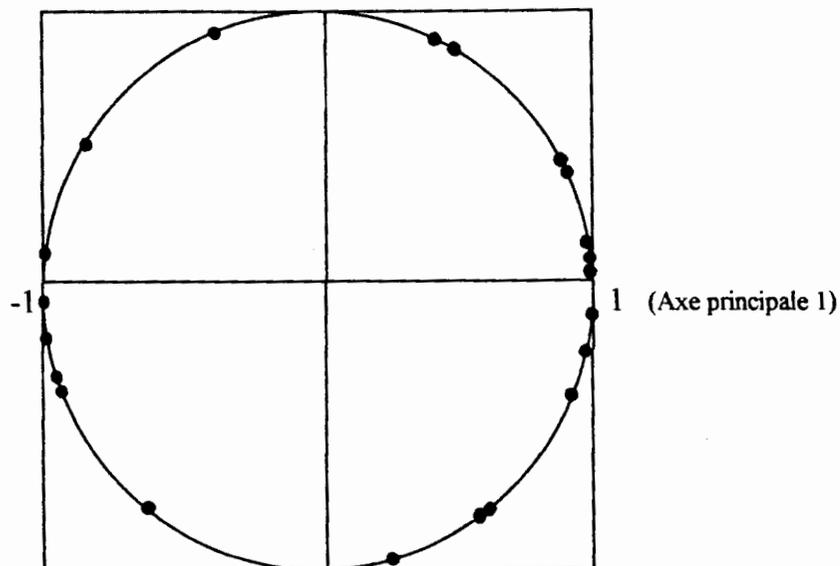


Figure 20 :

Position des 21 constituants de l'huile essentielle de Niaouli du Bénin dans l'espace réduit des deux premières composantes principales durant les 4 saisons climatiques

(Axe principale 2)

**Figure 21 :**

Position des 300 échantillons de l'huile essentielle de Niaouli du Bénin dans l'espace réduit des deux axes discriminants durant les 4 saisons climatiques

(Axe discriminant 2)

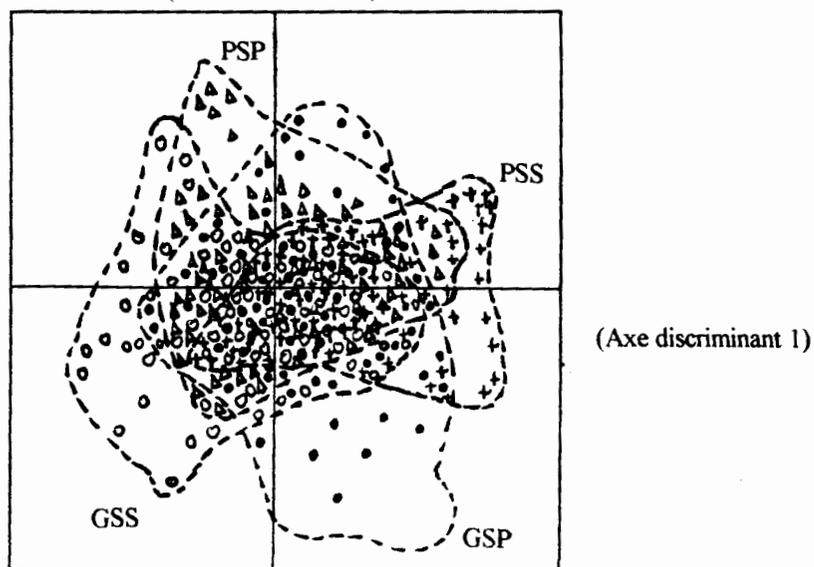


Tableau 41:

Variation (Δ) durant les 4 saisons climatiques des pourcentages des constituants majoritaires de Niaouli du Bénin

Constituants	Variation Δ (%)		
	TYPE I	TYPE II	TYPE III
α -pinène	1,05	0,27	0,22
limonène	0,3	0,04	0,03
1,8-cinéole	2	4,07	0,20
α -terpinéol	0,73	5,19	3,79
viridiflorol	3,4	0,2	2,06

III-2-5- COMPARAISON DE NOS RÉSULTATS AVEC CEUX DE LA LITTÉRATURE

Du point de vue variation du rendement au cours du stockage, nos résultats concordent avec ceux de :

- J. M. M. WHISH et R. R. WILLAMS (220) qui, sur *Melaleuca alternifolia* ont montré qu'il n'y a pas de perte d'huile essentielle au cours du séchage et que le volume en huile augmente la 1^{ère} semaine pour se stabiliser jusqu'à la 4^{ème} semaine.

- G. J. MURTAGH et A. CURTIS (221) qui révèlent qu'il n'y a pas perte de volume ni modification de la composition chimique après 2 semaines de séchage des feuilles de *M. alternifolia*.

- et parallèlement avec ceux de ZRIRA et BENJILALI (222) sur l'*E. camaldulensis* une myrtacée comme le Niaouli. Notons au passage qu'une étude similaire effectuée sur la

même espèce *Eucalyptus camaldulensis* acclimatée au Bénin par notre équipe a donné également les mêmes résultats.

En effet, le rendement de l'huile essentielle du Niaouli du Bénin augmente le 6^{ème} jour (1,45%) par rapport à celui du végétal frais (0,85%). Il se stabilise (presque) jusqu'au 14^{ème} jour ($\Delta=0,07\%$); chute le 20^{ème} jour (1,11% et $\Delta=0,34\%$) pour se stabiliser à nouveau entre le 20^{ème} et le 40^{ème} jour du stockage ($\Delta=0,06\%$) (graphe 24).

En ce qui concerne la composition chimique, nos résultats sont en accord avec ceux des auteurs précités qui n'observent pas de changement dans la composition chimique de l'huile essentielle au cours du stockage. Seules les proportions de certains constituants varient à cause de l'interconversion entre molécules (c'est le cas par exemple de 1,8-cinéole \longrightarrow α -terpinéol \longrightarrow limonène déjà signalé) et de la volatilité de certains produits au cours du temps, ce qui affecterait aussi le rendement.

Enfin, pour l'analyse statistique multivariée, nous obtenons 3 chémotypes (à 1,8-cinéole, à 1,8-cinéole et viridiflorol à teneur égale et à viridiflorol) parmi les 4 trouvés par P. A. R. RAMANOELINA et coll. (192) excepté celui à T-nérolidol. Egalement, comme ceux de P. A. R. RAMANOELINA et coll., nos résultats ont prouvé qu'il n'y a presque pas d'influence des saisons sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* d'origine béninoise.

III-2-6- CONCLUSION

L'étude de l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* acclimaté au Bénin révèle l'existence de trois types chimiques : type I (58%) à 1,8-cinéole, type II (22%) à pourcentage égal de 1,8-cinéole et de viridiflorol et type III (20%) à viridiflorol au sein de la plantation et par conséquent la plantation est à dominance 1,8-cinéole.

Tenant compte de la stabilité de la composition chimique de l'huile essentielle tout au long de l'année, une huile riche en 1,8-cinéole peut être produit en mai et juin (51,44 et 54,38%) et puis en octobre (52,9%) avec des rendements de 2,75, 3,58 et 3,02% et 6 à 14 jours de séchage suffisent pour obtenir une huile avec un bon rendement.

L'augmentation du rendement en une période au cours du séchage peut être une réponse à l'activité métabolique de production de l'huile par les glandes sécrétrices continuant dans les feuilles même après la récolte.

D'autre part,

- vu que les travaux de RAMANOELINA et coll. (192) ont permis de confirmer que les arbres de Niaouli à chémotype viridiflorol sont natifs de Madagascar parce que jamais décrit par d'autres jusqu'en 1994,

- vu que depuis 1996, sur un travail préliminaire effectué par notre laboratoire sur la plantation de Niaouli acclimaté au Bénin, ce chémotype à viridiflorol est identifié sur 20% des échantillons étudiés (202),

- considérant les résultats que nous venons encore d'obtenir (20% des arbres à chémotype viridiflorol),

nous sommes tentés d'affirmer (avec une toute petite réserve) que le *Melaleuca quinquenervia* acclimaté au Bénin est originaire de Madagascar : l'origine des semences béninoises étant ignorée, faute d'archives.

Par ailleurs, une bonne sélection des graines issues des arbres retenus au cours de notre analyse peut permettre d'avoir, avec un bon suivi, des arbres de Niaouli à 1,8-cinéole dominant ou à viridiflorol dominant actuellement prisé dans l'industrie pharmaceutique.

CHAPITRE IV

CHENOPODIUM AMBROSIOIDES

LINN.

IV-1- GÉNÉRALITÉS

IV-1-1- ORIGINE ET BOTANIQUE

Originnaire d'Amérique centrale (du Mexique), *Chenopodium ambrosioides* est répandue dans tous les continents, c'est une herbe d'aspect glabre fortement aromatique (223).

La tige ordinairement dressée, émettant de nombreux rameaux beaucoup plus minces qu'elle, atteint 20 à 100 cm de haut et a un diamètre à la base variant de 3 à 4 mm.

Les feuilles de la tige principale sont assez caduques, avec un pétiole de 0,5 à 1 cm de long et un limbe étroitement elliptique, longuement atténué vers le bas, grossièrement et irrégulièrement denté. Les feuilles des rameaux sont de plus en plus étroites et de moins en moins dentées.

Les inflorescences sont en panicule d'épis de glomérule, d'abord assez condensées puis de plus en plus amples, pouvant atteindre 40 cm de long, avec de très nombreux rameaux grêles, de 10 à 20 cm de long, naissant à l'aisselle d'une bractée

Planche 10 : *Chenopodium ambrosioides* du Bénin



A: tige florifère
B: feuille de la partie moyenne
C: fleur

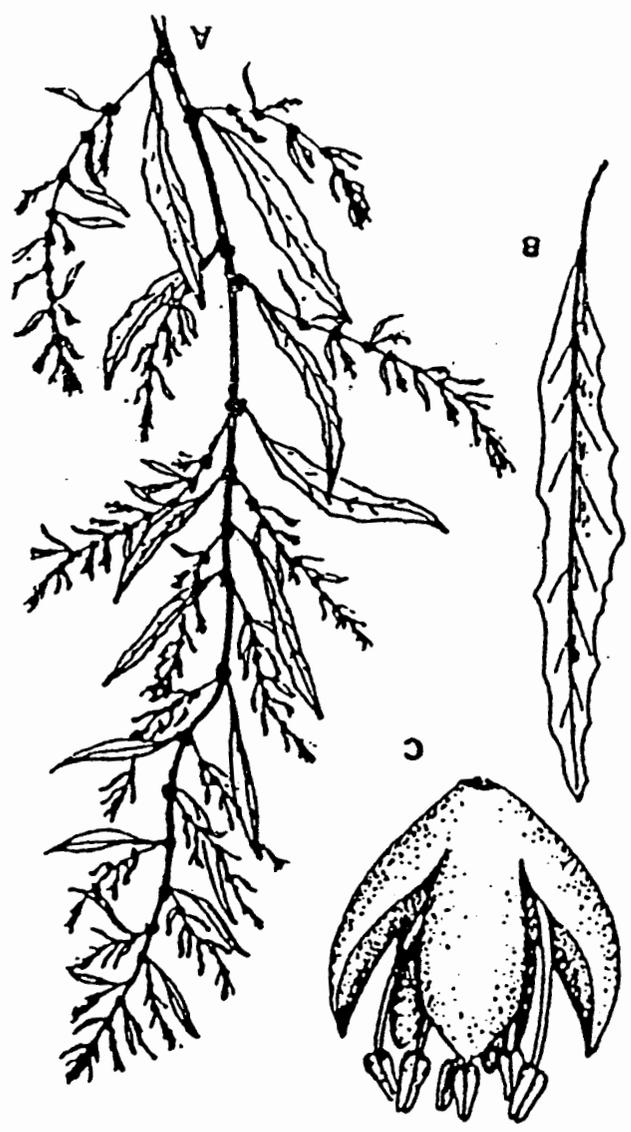


Planche 11 : *Chenopodium ambrosioides* (224)

étroitement elliptique, aiguë, de plus ou moins 20 mm de long, de 2 à 3 mm de large et produisant quelques rameaux tertiaires plus courts.

Les glomérules sont sessiles, puciflores et subsphériques. Les fleurs, de moins 1 mm de diamètre dont le péricarpe à 4-5 segments glanduleux, sont glabres, concaves, obtus et soudées à la base avec 4 –5 étamines. Les akènes, membraneux sont à péricarpe tandis que la graine est discoïde, de 0,7 mm de diamètre, rouge-foncée, lisse, brillante, présentant un réseau de très fins canicules (planche 11) (223, 224).

Il existe trois variétés intraspécifiques : *Chenopodium ambrosioides* var *anthelminticum* riche en ascaridol, *Chenopodium ambrosioides* var. *pubescens* riche en pinocarvéol et une autre variété riche en pinocarvone (225). Les études antérieures ont probablement porté sur le *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum*.

IV-1-2- USAGES

Riche en huile essentielle, *Chenopodium ambrosioides* est très utilisé en médecine populaire en Amérique comme stimulant, vermifuge, carminatif, antiasthmatique et emménagogue (226). L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum* est un puissant antihelminthique surtout contre les ascaris et les ankylostomes mais il est toxique à dose relativement faible par suite de son action dépressive sur le cœur (227).

Peu employé en médecine traditionnelle en Afrique (223), il est néanmoins utilisé au Rwanda comme vermifuge surtout pour les animaux (228).

Les recherches effectuées au Rwanda avec les extraits chloroformiques de la plante entière n'ont pas montré d'activité ascaricide (229).

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* est réputée avoir les propriétés insecticides, nématocides et antimicrobiennes (230-232).

C'est une plante diurétique, sudorifique expectorante et résolutive.

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides*, appelée huile de chénopode, "american wormseed oil", semble avoir été beaucoup utilisée avant 1900 pour ses propriétés antihelminthiques. Actuellement interdite par le Conseil de l'Europe de 1981 en industrie alimentaire à cause de sa toxicité (233), elle est néanmoins employée en très faible quantité en parfumerie (224).

La plante quant à elle est utilisée avec succès pour la guérison des ulcères atoniques. Le suc de feuilles fraîches pilées est conseillé *per os* dans les dermatoses cutanées ; le marc résiduel, imbibé d'huile de palme est utilisée pour masser le malade souffrant de névralgies intercostales.

IV-1-3- PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM AMBRSIOIDES VAR. ENTHELMINTICUM*

L'huile essentielle est généralement extraite par entraînement à la vapeur d'eau avec des rendements variables. La couleur de l'huile varie du jaune à jaune-or selon l'origine et a une odeur très forte et désagréable, parfois camphoreuse. Le tableau 42 indique quelques unes des constantes physico-chimiques des huiles d'origines différentes (234, 235).

Le rendement en huile essentielle des plantes d'origine américaine est très élevé (1,0-2,0%), cette huile est fortement lévogyre (pouvoir rotatoire -4 à -12°). Les huiles américaines et brésiliennes sont particulièrement riches en ascaridol (respectivement, 71 à 91% et 58 à 67%) tandis que celles qui proviennent de l'Inde contiennent beaucoup d'hydrocarbures (20,6%).

Tableau 41 :

Constantes physico-chimiques de l'huile de *Chenopodium ambrosioides* en fonction de son origine, d'après GUPTA et coll. (1972) (234)

	Huiles indiennes (mélanges)	Huiles indiennes (Kashmir)	Huiles indiennes (auteurs)	Huiles Nord-américaines	Huiles du Brésil
Rendement	0,17-0,24%	0,82-1,20%	0,37%	1,0-2,0%	0,3-0,5%
Couleur	jaune-claire	jaune-or	Jaune-or	jaune-pâle	-
Densité	0,800	-	0,889 (32°C)	0,937-0,99 (25°C)	0,981 (20°C)
Pouvoir rotatoire	-	-	+0,09°(32°C)	-4 à -12°	-0,20
Indice de réfraction	-	-	1,476 (32°C)	1,476 à 1,477 (20°C)	1,476 (20°C)
Solubilité dans l'alcool 70% v/v	-	-	6 à 7	2 à 12	3 à 7
Ascaridol (%)	25	7,2 à 13,4	20,2	71 à 91	58 à 67
Hydrocarbures (%)	45 à 50	-	20,6	15	-

IV-1-4- COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM AMBROSIOIDES*

Il ne nous a pas été possible d'avoir plus d'informations sur le mode d'extraction et d'analyse des huiles essentielles du Brésil (236), d'Argentine (238) et des Etats-Unis (227). Cette dernière est riche en ascaridol (60 à 70%) avec les composés suivants :

le p-cymène, le terpinolène, le p-menthadiène et le camphre qui ne sont pas quantifiés. Cette composition diffère de celle des huiles commerciales (tableau 42) (234).

L'huile du Brésil (236) contient de l'ascaridol (17,9%), du limonène (29,6%), du myrcène (19%), du β -pinène (3,6%) et un certain nombre de composés non identifiés (30,7%) ; tandis que l'huile qui provient d'Argentine (237), obtenue par entraînement à la vapeur d'eau de la plante entière, contient majoritairement le p-cymène (50%) à côté de l'ascaridol (20%). L'huile commerciale du Brésil (225) est plus riche en ascaridol (58,0 à 67,0%).

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* d'origine indienne (224) a été extraite par entraînement à la vapeur d'eau de la plante entière séchée à l'air avec un rendement de 0,4%.

Après l'avoir séparée en acides et en fraction neutre, elle a été analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice imprégnée de nitrate d'argent (15%) et par chromatographie sur couche mince d'alumine. Certains produits ont été identifiés par méthodes chimiques et par les méthodes spectrométriques.

L'ascaridol (25,0%), les isomères du xylène (24,1%), le p-cymène (23,0%) et les hydrocarbures C_{21} à C_{31} , dont les C_{29} , étant majoritaires ont été identifiés dans la fraction neutre. Les acides hexanoïque, heptanoïque, octanoïque et un acide inconnu de formule brute $C_5H_9-CO_2H$ ont été mis en évidence dans la fraction acide.

D'autre part, dans l'extrait indien obtenu par percolation à l'éther de pétrole, on a isolé l'alcool triacontylique, le heptadécane-14-one et le spinastérol (234).

L'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur des jeunes fleurs séchées à l'air de *Chenopodium ambrosioides* d'origine russe (238) est riche en hydrocarbures (36,0%) dont le limonène et le p-cymène. Cette huile contient également de l'ascaridol (39,1%), des alcools de formules brutes $C_{10}H_{18}$ (20,0%) dont le terpinéol, des esters (6,5%) tels que l'acétate de terpényle et le salicylate de terpényle ainsi que des aldéhydes (1,6%) non identifiés. La séparation des composés a été effectuée par distillation fractionnée et les produits identifiés par les méthodes chimiques.

Tableau 42 :Constituants de *Chenopodium ambrosioides* (travaux des auteurs)

Auteurs Références Années	Origine de la plante Partie de la plante étudiée Méthodes d'extraction (rdt)	Analyse identification	Produits isolés (%)
Fiester et coll. (237) 1951	-Argentine : Plante entière entrainement à la vapeur (rdt=0,2%)	?	p-cymène 50%, ascaridol 20%
Thukamoto et coll. (240) (241) 1953 1952	-Japon -plante entière séché à l'air -entrainement à la vapeur	?	(-) pinocarvone 57,1%, pinène 24%, aritasone 7,1%, ascaridol 1,1%
Nikolaev et coll. (238) 1955	-Russie -jeunes fleurs -entrainement à la vapeur sous pression (2,5atm)	Distillation fractionnée	Ascaridol 39,1%, hydrocarbures 36,0%, alcools 20%, esters complexes 6,5%, aldéhydes 1,6%
Gupta et coll (234) (235) 1972 1974	Inde (district d'Aligarh) - plante entière -entrainement à la vapeur (rdt=0,4%)	Séparation des acides de la fraction neutre. Etude de la fraction neutre par chromatographie sur colonne de d'alumine avec l'éther et le benzène comme éluant. Identification des constituants par méthodes chimiques et par RMN	ascaridol 25%, p-cymène 23% hydrocarbures 31% , acides carboxyliques 12,5%, alcool triancontilique heptadecan- 14 -one 7% spinastérol.
Opdyke (227) 1974	Nord Amérique	?	Ascaridol 60-70%, limonène, p-cymène, p-menthadiène, camphre
Kazuyasu (225) 1978	Japon plante entière -entrainement à la vapeur	Analyse des huiles par chromatographie gaz- liquide avec un appareil équipé d'une colonne remplie de PEG 20 M (30%) ; L=2.25m φ=2mm T : réglée de 100 à 200°C (2 °C /min.), gaz vecteur=hélium(2.3ml/mn)	Pinocarvéol 42,6%, α-pinène 31% pinocarvone 20,2% , β-pinène 0,1%, β -myrcène 0,2%, autre 5,7%

L'étude comparative (234) de l'huile extraite par entraînement à la vapeur de la plante entière et de l'extrait à l'éther de pétrole à chaud, a montré que par extraction à l'éther de pétrole l'huile présenterait un taux en ascaridol important (tableau 43).

De même, les huiles obtenues par extraction aux micro-ondes contiennent plus d'ascaridol que celles extraites par entraînement à la vapeur (239).

TABLEAU 43:

Composition chimique d'une huile essentielle et d'un extrait d'origine indienne en fonction du mode d'extraction (234)

Extraction	A la vapeur d'eau	A l'éther de pétrole (60-80°C)
Rendement	0,3%	0,2%
Isomère du xylène	24,2%	6,8%
p-cymène	13,0%	8,0%
Ascaridol	25%	83,5%
Hydrocarbures	12,5%	2,0%
tétradécanol	7%	

Des huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides* d'origine japonaise présentent des compositions variées :

Ainsi une première huile essentielle, obtenue par entraînement à la vapeur d'eau de la plante entière séchée à l'air, est composée de pinocarvone (57,1%), de pinène (24,0%), d'aritasone (7,1%), et d'ascaridol (1,1%) (240, 241).

La seconde huile contiendrait le pinocarvéol (42,6%), la pinocarvone (20,2%), l' α -pinène (31,0%), le β -pinène (0,1%) et le β -myrcène (0,2%) (225).

- La troisième, tableau 44, est très riche en pinocarvone (62,5 à 65,1%) (225)

Tableau 44:

Composition chimique de deux chémotypes de *Chenopodium ambrosioides*

Chémotype à	Pinocarvone		Pinocarvéol	
	Août 1978	Sept 1978	Août 1978	Sept 1978
Composés	P o u r c e n t a g e s			
α - pinène	33,4	30,3	31,4	32,1
α -pinène	0,3	0,2	0,2	0,1
pinocarvone	62,4	65,1	20,2	21,9
pinocarvéol	2,8	2,4	42,0	40,4
autres	1,2	1,6	5,7	5,2

Les acides gras et les protéines (241), les stérols (243, 244) dont le kampférol ont été extraits des feuilles et des graines de *Chenopodium ambrosioides* ainsi que d'autre composés non volatiles comme les sels et les acides oxalique et tartrique (245).

L'ascaridol, composé principal des huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides* commerciales, se trouve en faible quantité (7,5%) dans l'huile de *Chenopodium botrys* (246)

Des sesquiterpènes (sélinène, élémène), des sesquiterpénoïdes (sélinadiol, chénopodiol ($\alpha+\beta$), eudesmols (α,β,γ) et leurs acétates) sont les composés les plus importants dans l'huile de certaines jeunes plantes (247, 248).

Les eudesmols (α et β) sont également les composés majoritaires de *Chenopodium botrys* (249).

Des monoterpénoïdes tels que la fenchone, la pulégone, la thujone, la menthone, le camphre, le menthol, le linalol, le nérol et le terpinène-4-ol ont été identifiés à côté de l'ascaridol, du β -élémol et du β -eudesmol dans les huiles de *Chenopodium botrys* du Kazakhstan (250).

L' α -terpinène (70,5% et 72,7%) est le constituant principal de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* du Bénin et du Rwanda à côté du p-cymène (16,3 et 15,5%) et de l'ascaridol (7,4 et 7,2%) (M. A. AYEDOUN, 1995 et MUNAYIMANA, 1995) (149, 251).

Pour PARIS et coll. (1971), l'huile essentielle contient 20 à 30% d'hydrocarbures monoterpénique (p-cymène, limonène, α -terpinène) et 60 à 80% d'un peroxyde terpénique ; l'ascaridole, dont la teneur varie avec la période de récolte, très faible avant la floraison, est surtout dominant dans le fruit (252).

IV-1-5- ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNE, NÉMATOCIDE ET INSECTICIDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM AMBROSIOIDES*

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* inhibe la croissance de certains microorganismes. Avec la méthode de culture sur gélose, KELLNER et KOBERT (230) ont trouvé que l'huile est active contre *Escherichia coli*, *Salmonella thyphosa*, *Neisseira*, *streptococcus foecalis*, *Streptococcus pyrogènes* et *Corynebacterium diphtae*.

Cependant, Il a été rapporté que l'huile avait un effet bactériostatique moyen contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candidas albicans* mais qu'elle était par contre efficace sur 23 microbes phytogènes sans spécification de leurs identités (227).

Outre l'activité anthelminthique observée, l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* serait efficace contre les larves et les adultes des nématodes du sol (232).

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* possède également une activité insecticide. Elle est active contre les larves d'un moustique appelée *Colex* sp. et autres insectes qui se nourrissent de feuilles. Les esters d'acides, notamment hexanoïque, arachidonique et octadécanoïque, extraits des feuilles, seraient efficaces contre les insectes des graines en stocks (253).

IV-1-6- AUTRES PROPRIÉTÉS DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM AMBROSIOIDES*

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* est à ce jour utilisée en faible quantité en cosmétologie et en parfumerie aux Etats-Unis (227). Le tableau 45 donne les pourcentages usuels et limites dans ces produits.

Tableau 45 :

Concentrations (%) usuelles et limite des huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides*
dans les parfums et cosmétiques

	Savons	Détergents	Crèmes-lotions	parfums
Concentration normale	0,001 à 0,1	0,001	0,005	0,04
Concentration limite	0,1	0,01	0,03	0,4

Une autre étude a montré que l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* augmentait fortement le pouvoir de pénétration des substances polaires tel que le fluorescil à travers la peau (254). Cette découverte pourra-t-elle déboucher sur de nouvelles perspectives ?

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* serait allélopatique : le p-cymène et l'aritasone empêcheraient la germination et la croissance de jeunes mauvaises herbes (255).

IV-1-7- L'ASCARIDOL DANS L'HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM AMBROSIoidES*

La biosynthèse de l'ascaridol partirait de l' α -terpinène, elle serait catalysée par les iodo-peroxydases.

JONHSON et CROTEAU (256) ont réalisé in vitro la synthèse de l'ascaridol à partir des exudats des feuilles et fruits de *Chenopodium ambrosioides* riches en α -terpinène avec la peroxydase en présence d'eau oxygénée et d'iodure de sodium.

Ils ont constaté que la synthèse de l'ascaridol était optimale à pH 4 et que la biosynthèse était inhibée par les catalases et les réducteurs chimiques tels que les cyanures.

L'ascaridol a été longtemps recherché pour sa puissante activité contre les vers intestinaux chez les animaux (257-262).

IV-1-8- CONCLUSION

Les constituants intéressants de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* var *anthelminticum* rapportés dans la littérature sont l'ascaridol dont les pourcentages varient de 18,% à 71% selon l'origine et certains hydrocarbures en l'occurrence le p-cymène, le limonène, le myrcène, et l' α -pinène. Selon le procédé d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau ou à l'éther de pétrole), la composition chimique de l'huile ou de l'extrait obtenu diffère.

Deux chémotypes de *Chenopodium ambrosioides* ont été mis en évidence au Japon : le *Chenopodium ambrosioides* var. *pubescens* riche en pinocarvone et le *Chenopodium ambrosioides* riche en pinocarvéol (225). Les deux chémotypes sont aussi riches en α -pinène.

L'ascaridol, longtemps recherché pour son activité anthelmintique, étant toxique pour l'homme, l'huile essentielle peut être mise en valeur pour ses propriétés nématocides, insecticides et antigermminatives ou pour utilisation en parfumerie ou en dermatologie.

La composition chimique de *Chenopodium ambrosioides* diffère de celle de *Chenopodium botrys* qui, en général, est riche en sesquiterpènes.

IV-2- HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM* *AMBRSIOIDES* DU BÉNIN : NOS TRAVAUX

Petite plante, le *Chenopodium ambrosioides* est une plante introduite au Bénin à une date inconnue. Elle se rencontre, de nos jours, sous tous les tropiques en saison des pluies, surtout près des lieux habités et dans certains jardins. Cette espèce est très répandue au Bénin.

IV-2-1- MATÉRIEL ET MÉTHODES

Agonvy et Porto-Novo sont les deux sites retenus. Quatre récoltes successives (espacées chacune de trois mois) de la partie aérienne de la plante ont été effectuées par site en 1996 et une récolte à Porto-Novo en février 1998. Les extractions ont été effectuées par entraînement à la vapeur d'eau. Les huiles obtenues sont analysées par chromatographie en phase gazeuse et les composés identifiés par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

IV-2-2- RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les figures 22-a et 22-b représentent les chromatogrammes CPG et SM d'un échantillon d'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* du Bénin, le tableau 46 donne les pourcentages des produits identifiés dans les échantillons d'huiles.

Les rendements sont généralement faibles, ils varient de 0,4 à 1,1% pour le site Porto-Novo et de 0,53 à 0,9% pour le site d'Agonvy.

Les produits majoritaires sont: p-cymène (27 à 43,4%), oxyde d'ascaridol (27,4 à 45,1%), trans-ascaridol (4,3 à 6,6%), cis-ascaridol (2,1 à 3,1%) et élémol (1,1 à 3,7%) pour le site d'Agonvy (tableau 45a).

Figure 22:

- a- Chromatogramme de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* du Bénin
 b- Impact électronique de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* du Bénin obtenu par couplage CPG/SM

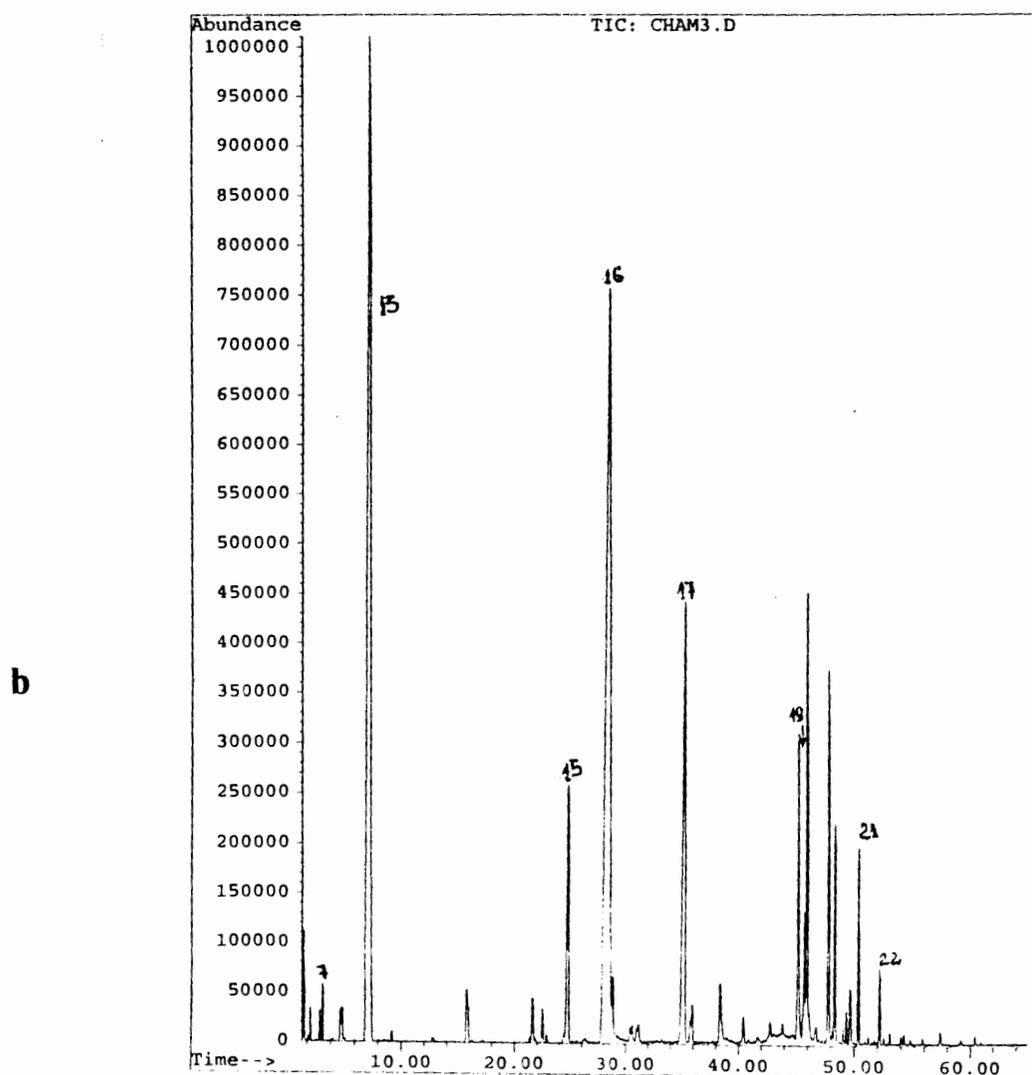
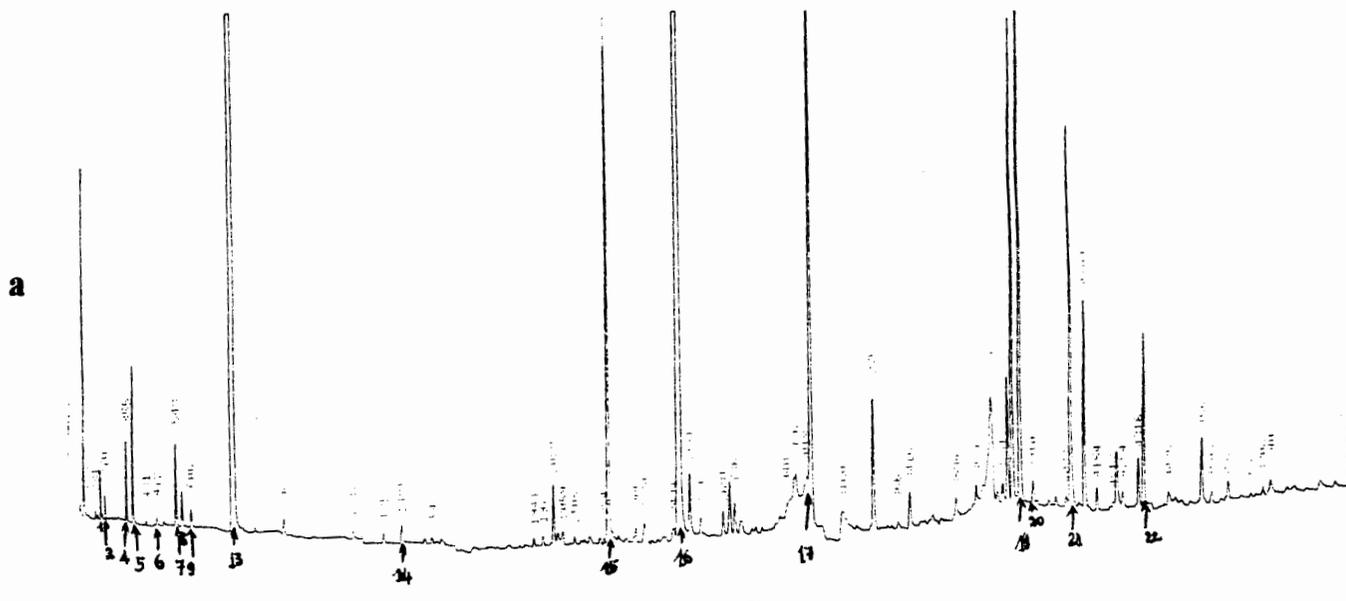


Tableau 45a :Composition chimique de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* du Bénin

CONSTITUANTS	AGONVY				PORTO-NOVO			
	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
1- α -pinène	0,13	Tr	tr	0,17	0,32	0,25	0,40	tr
2- α -thujène	tr	Tr	-	-	tr	-	0,45	tr
3- camphène	-	Tr	0,20	tr	-	-	tr	-
4- β -pinène	tr	Tr	0,40	0,30	0,09	tr	tr	tr
5- sabinène	tr	Tr	tr	tr	0,04	tr	0,14	tr
6- myrcène	tr	Tr	0,30	tr	0,17	0,10	0,50	0,07
7- α-terpinène	0,27	0,23	0,16	3,20	42,87	30,58	17,90	2,7
8- limonène	0,37	0,20	-	tr	0,24	0,65	1,10	0,20
9- 1,8-cinéole	1,10	0,20-	0,60	tr	0,46	0,26	0,70	0,30
10- (z)- β -ocimène	-	-	-	-	-	-	0,25	0,09
11- γ -terpinène	2,10	-	2,60	1,01	0,43	0,12	1,00	0,30
12- (É)- β -ocymène	-	-	-	-	-	-	0,25	0,09
13- p-cymène	43,1	30,80	43,40	27,05	25,30	32,5	13,00	5,20
14- p-cyménène	0,20	0,10	0,10	0,15	0,17	0,24	0,10	0,10
15- cis-ascaridol	2,10	3,10	3,10	3,02	2,60	2,30	5,90	16,70
16- oxyde d'ascaridol	29,30	45,10	27,40	42,79	15,03	14,40	41,60	50,70
17- trans-ascaridol	4,30	6,60	4,50	5,89	6,12	5,20	5,80	9,70
18- p-cymèn-8-ol	-	-	-	-	tr	0,16	tr	-
19- élémol	2,60	1,10	3,40	3,73	0,79	2,70	0,90	3,10
20- cavacrol	-	-	0,10	-	0,50	1,50	tr	-
21- spathulénol	1,70	1,60	1,10	1,91	0,86	1,34	0,50	1,70
22- oxyde de 1,3-épi-manoyle	0,3	0,20	1,03	1,71	0,31	1,44	0,20	0,20
RENDEMENT	0,60	0,53	0,89	0,67	0,73	1,1	0,81	0,42

A la différence du site d'Agonvy, le site de Porto-Novo est caractérisé par une forte teneur en α -terpinène (2,7 à 46,4%) avec des produits majoritaires comme p-cymène (5,2 à 32,50%), oxyde d'ascaridol (14,4 à 50,7%), trans-ascaridol (5,2 à 9,7%), cis-ascaridol (2,3 à 16,7%) et élémol (0,9 à 3,1%). Le γ -terpinène est très faible dans les deux échantillons.

D'autre part, on constate que sur le site de Porto-Novo, la teneur en α -terpinène diminue avec le stade végétatif de la plante, alors que celles des cis et trans-ascaridol augmentent de même que celle de l'oxyde d'ascaridol. Quant au site d'Agonvy, on constate presque une absence d' α -terpinène (trace) sur les 4 récoltes mais une forte présence de p-cymène (27 à 43,4%) (tableau 45b, graphe 30).

Ces constats prouvent que l' α -terpinène est le précurseur de l'ascaridol et du p-cymène (256) dans les graines d'où sont extraites généralement les huiles commerciales.

Il est à se demander si le processus de biosynthèse pourrait évoluer vers la formation prépondérante de l'ascaridol en fonction du stade végétatif de la plante et/ou de la nature du sol.

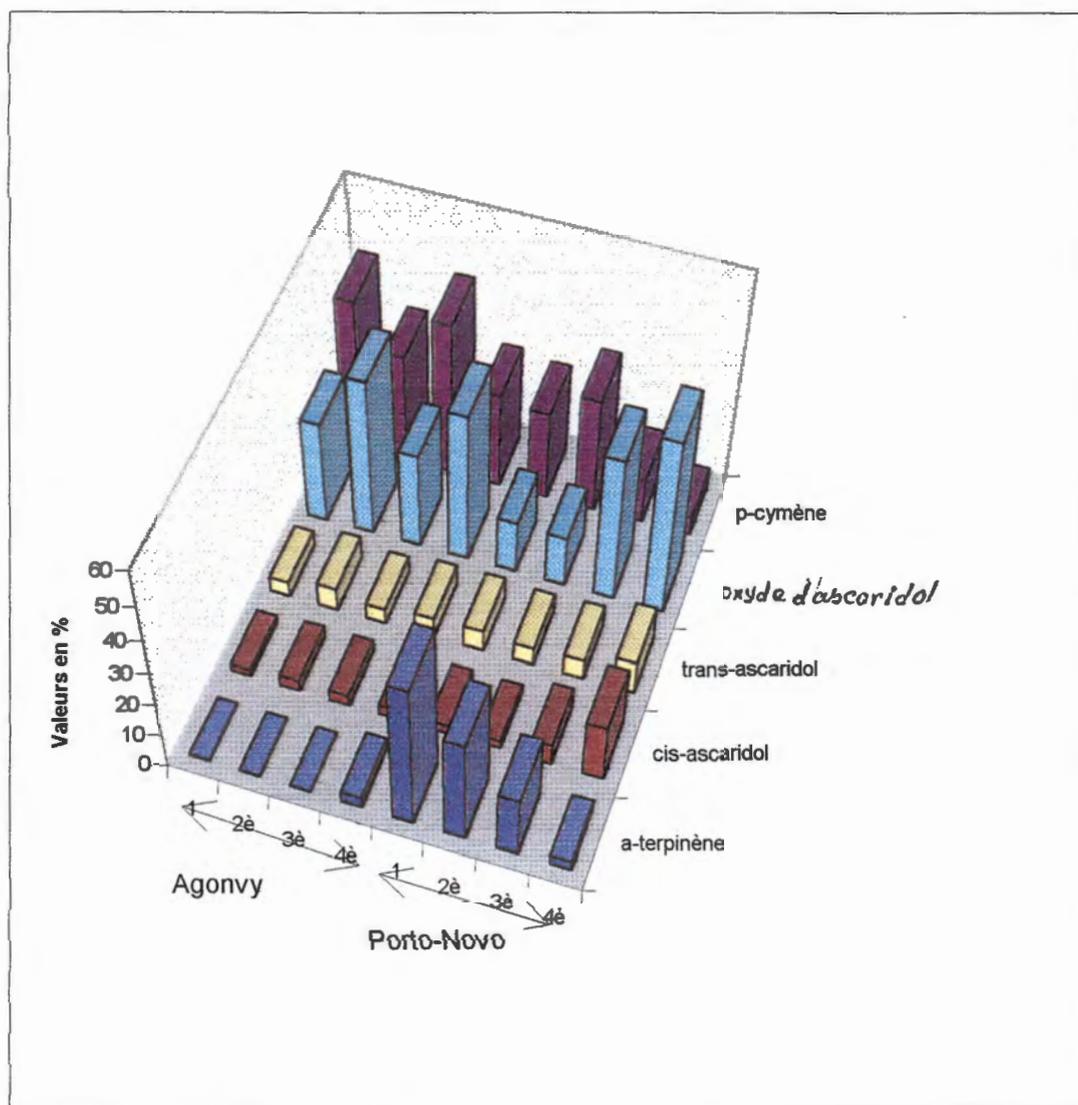
Cette transformation pourrait être assimilée à une autoxydation de l' α -terpinène en ascaridol en présence de l'oxygène de l'air. Pour nous en rendre compte, nous avons effectué un autovieillissement d'un échantillon d'huile de Porto-Novo.

Par ailleurs, remarquant que le constituant dominant de tous les échantillons en général est l'oxyde d'ascaridol, nous l'avons isolé et caractérisé pour une confirmation, car il semble être un nouveau produit jamais signalé dans la littérature.

Tableau 45 b : Composés majoritaires de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* du Bénin

	1	2è	3è	4è	1	2è	3è	4è
a-terpinè	0.27	0.23	0.16	3.2	42.87	30.58	17.9	2.7
cis-asca	2.1	3.1	3.1	3.02	2.6	2.3	5.9	16.7
trans-asc	4.3	6.6	4.5	5.89	6.12	5.2	5.8	9.7
ox-asc	29.3	45.1	27.4	42.79	15.03	14.4	41.6	50.7
p-cymèn	43.1	30.8	43.4	27.05	25.3	32.5	13	5.2

Graphe 30 : Histogramme des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* du Bénin



IV-2-3- AUTOXYDATION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM AMBROSIoidES* DU BÉNIN

En vue de vérifier la bioconversion de l' α -terpinène en ascaridol, nous avons soumis un échantillon d'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* à l'autoxydation naturelle.

En effet, 5g d'huile essentielle placée dans un flacon blanc ouvert a été soumise à l'action de l'oxygène de l'air et de la lumière à la température ambiante.

Pendant 75 jours d'exposition du 1^{er} mars au 16 mai 1998, on observe une augmentation de la coloration (coloration jaunâtre) et de la viscosité en fonction du temps.

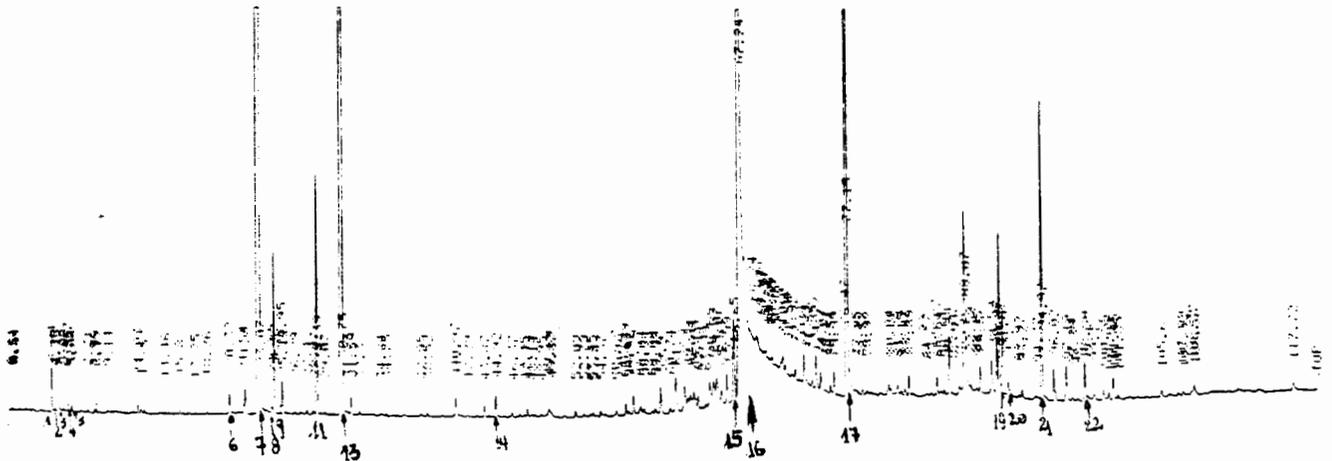
On constate une perte de masse importante (3,06g) et la modification du profil chromatographique est importante (figures 23 et 24). On remarque la disparition des monoterpènes due à leur évaporation à l'air libre expliquant ainsi la perte de masse et l'apparition de composés oxygénés.

Les résultats chromatographiques sont consignés dans le tableau 46.

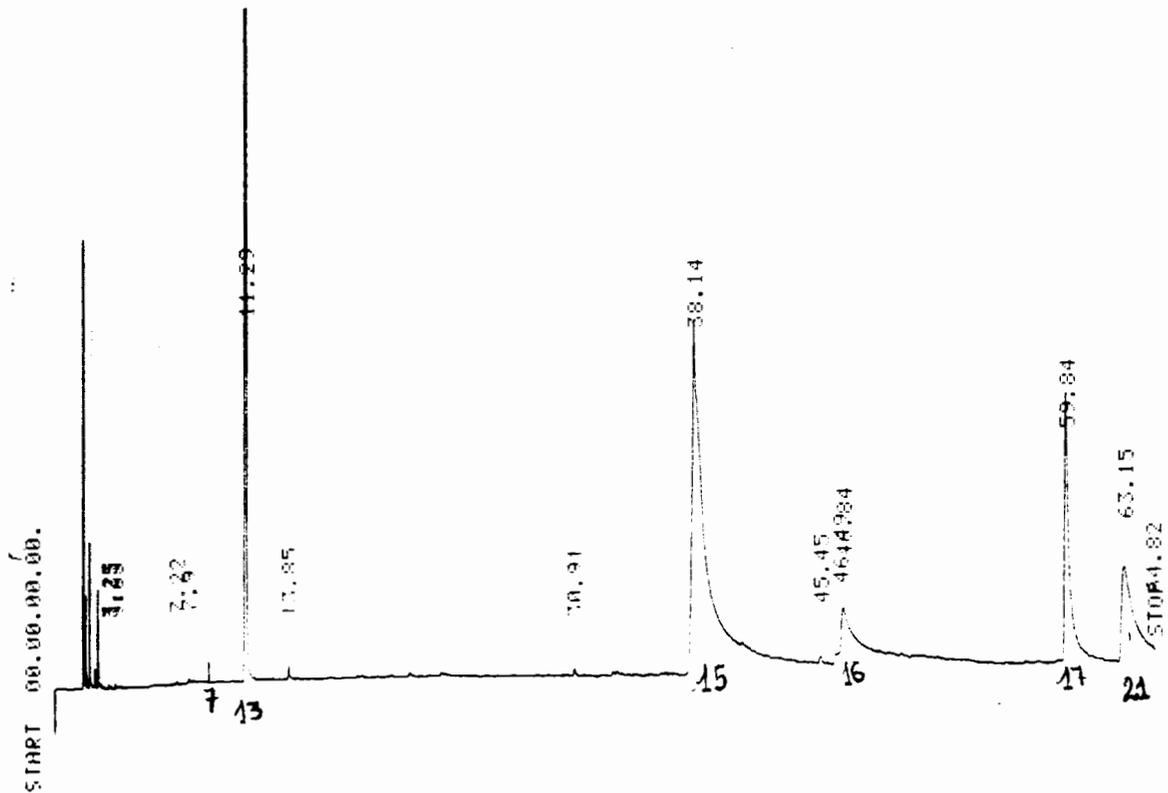
De l'analyse de ce tableau, il résulte que le taux d' α -terpinène diminue de 44,4% à 0,05% soit une disparition totale, alors que celui du cis-ascaridol passe de 0,4 à 39,08% et celui de trans-ascaridol de 8,26 à 13,2%. Il apparaît donc une augmentation de la teneur en ascaridol (43,62%) compensant la disparition d' α -terpinène. Des composés oxygénés comme l'élémol, le cavacrol et le spathuléol passent de 2,2 à 11,12%. Paradoxalement la teneur en oxyde d'ascaridol diminue de 14,5% alors que celle de p-cymène augmente de 10,23%.

Figure 23 :

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides*
non autoxydée (site de Porto-Novo)

**Figure 24 :**

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides*
autoxydée (site de Porto-Novo)



Nous pouvons dire que l' α -terpinène est le précurseur de l'ascaridol. L'oxygène de l'air provoque donc l'altération des monoterpènes et intervient dans son état fondamental triplet; c'est pourquoi on peut qualifier cette oxydation "d'autoxydation naturelle" où la lumière a seulement joué le rôle d'amorceur. Les réactions sont radicalaires et conduisent à une racémisation des produits formés ainsi qu'à leur polymérisation responsable de l'augmentation de la viscosité.

Nous proposons un schéma plausible de cette réaction d'autoxydation.

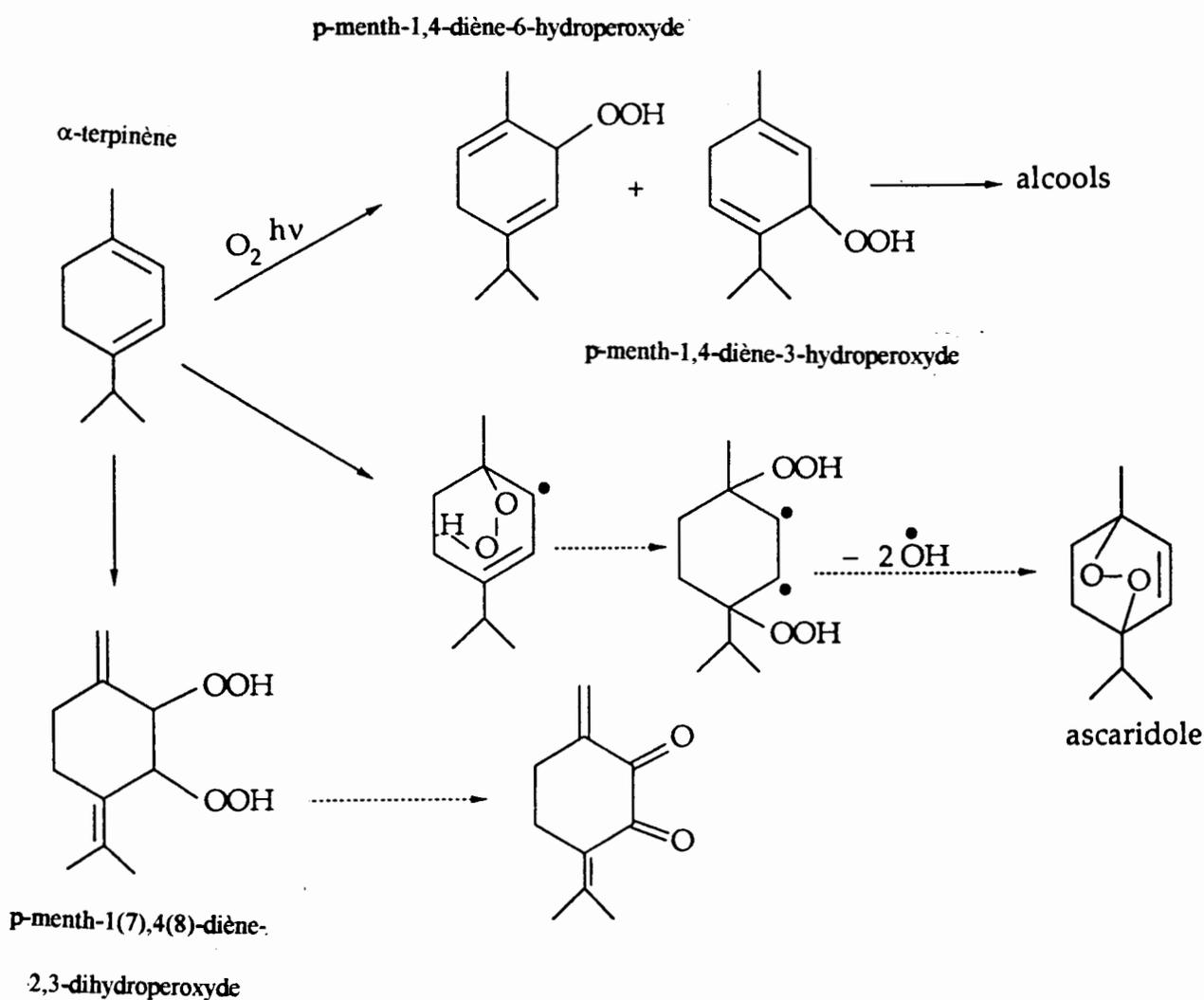


Tableau 46 :

Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides* non autoxydée et autoxydée

COMPOSES	Huile initiale non autoxydée	Huile autoxydée
1- α -pinène	0,29	Tr
2- α -thujène	-	Tr
3- camphène	0,07	Tr
4- β -pinène	0,25	tr
5- sabinène	-	tr
6- myrcène	0,17	tr
7- α-terpinène	44,40	0,05
8- limonène	0,43	-
9-1,8-cinéole	0,09	-
10- (z)- β -ocimène	-	-
11- γ -terpinène	0,68	-
12- (É)- β -ocymène	-	-
13- p-cymène	20,76	30,90
14- p-cyménène	0,06	0,18
15- cis-ascaridol	0,40	39,08
16- oxyde d'ascaridol	19,03	4,50
17- trans-ascaridol	8,26	13,20
18- p-cymèn-8-ol	0,07	-
19- élémol	0,88	
20- cavacrol	0,46	11,12
21- spathuléol	0,86	
22- oxydede1,3-épi-manoyle	0,13	0,15

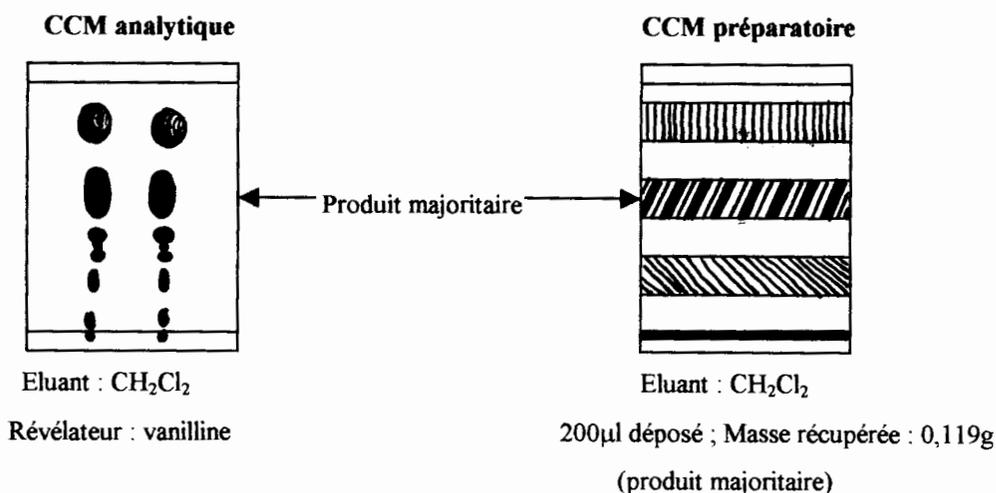
IV-2-4- SÉPARATION ET CARACTÉRISATION DU CONSTITUANT MAJEUR DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM AMBROSIODES* DU BÉNIN

Afin de confirmer la structure du composé majeur identifié dans les échantillons d'huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides* du Bénin, une grosse quantité d'huile essentielle a été extraite et soumise à la chromatographie sur couches minces (C.C.M) analytique et préparative et à la chromatographie sur colonne pour l'isolement du produit. Le produit obtenu est ensuite soumis aux différentes techniques chromatographiques (C.P.G., C.P.G/S.M., R.M.N. de H-1 simple et à double dimension, R.M.N. du C-13 et l'Infra-Rouge).

IV-2-4-1- LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES (C.C.M.)

Utilisée comme méthodes analytique et préparatoire, elle nous a permis de connaître quels absorbant et solvant utiliser dans la chromatographie sur colonne. De tous les solvants utilisés, seuls le chlorure de méthylène (CH_2Cl_2) ou le chloroforme (CHCl_3) ont permis de réaliser une bonne séparation car tous les deux sont polaires.

Par contre, aucune séparation n'est constatée avec l'hexane qui, lui, est apolaire. Cependant, dès qu'on ajoute de l'acétate d'éthyle (polaire à cause de $\text{O}=\text{C}-\text{O}$) à l'hexane, les différents constituants de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* sont séparés



IV-2-4-2- CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Pour une bonne séparation et compte tenu que le produit est récupéré rapidement avec le chlorure de méthylène nous avons utilisé des mélanges d'hexane (C₆H₁₄) et d'acétate d'éthyle (CH₃COOC₂H₅) à des proportions différentes (10, 15%, etc...).

Deux colonnes ont été utilisées pour la séparation. La première colonne est constituée d'une portion (0,4g) d'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* dans une colonne ouverte de silice flash (50g), la deuxième colonne est constituée de 100g de silice et de 1g d'huile essentielle. Les deux colonnes ont été éluées avec le mélange retenu et à des proportions différentes.

Les résultats sont consignés dans le tableau 47.

Tableau 47 :

Résultats des chromatographies sur colonne.

	COLONNE 1			COLONNE 2		
Masse de départ (g)	0,4			1		
Fractions	1	2	3	1	2	3
Masse obtenue (g)	0,1400	0,1400	0,0377	0,1400	0,3705	0,270
Rendement (%)	35	35	9,42	14	37	2,7
Pureté (%)	-	13	-	79	43	-
Remarques	Pas de produit isolé	Un produit isolé à déterminer par C.P.G.	Pas de produit isolé	Un produit isolé à déterminer	Un produit isolé	Pas de produit isolé

Calcul du rendement réel du constituant majoritaire de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides*

- 1^{ère} colonne

Nous avons 0,14g de constituant principal après évaporation. Le solvant est présent à 81% dans l'échantillon, le rendement réel est de $0,14 - (0,14 \times 0,81) / 0,4 = 7\%$

- 2^{ième} colonne

Produit pur à 43%

Rendement réel : $0,37 \times 0,43 / 1 = 16\%$

IV-2-4-3-CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Le chromatogramme de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* étudiée (figure 25) présente trois pics principaux qui correspondent aux trois produits majoritaires de l'huile essentielle. Nous avons pu isoler deux (la fraction 1 de la colonne 2 et la fraction 2 des deux colonnes). Le tableau 48 donne uniquement les concentrations de ces trois produits

Tableau 48 :

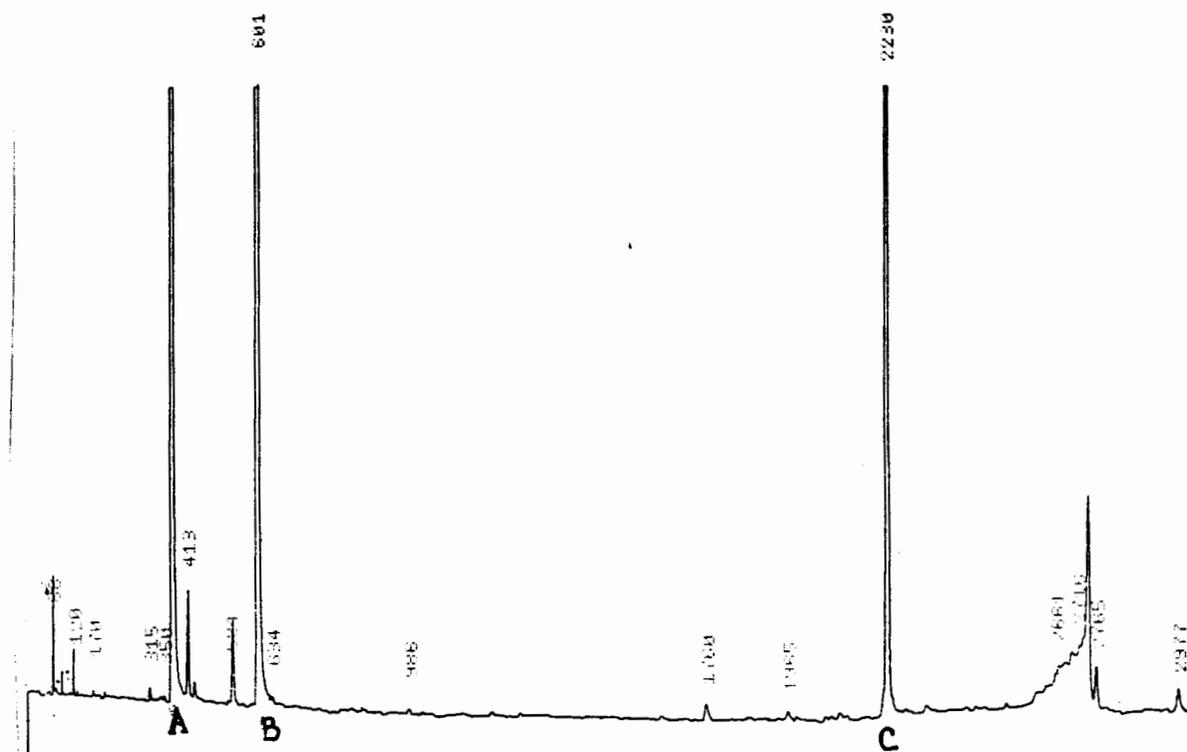
Concentration des différents constituants

Principaux pics	A	B	C
Pourcentage	43,5	36,8	16,7

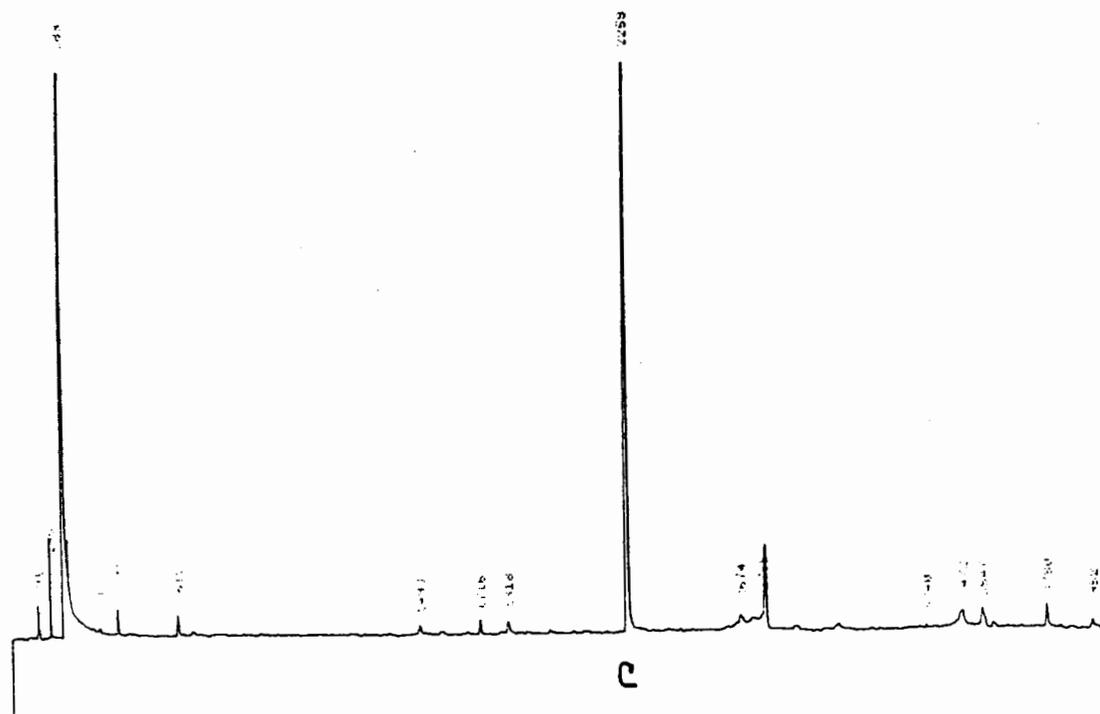
La figure 26 présente le chromatogramme du produit de la 2^{ème} fraction de la colonne 1. Le temps d'apparition d'un pic est le même en comparant les deux chromatogrammes, il en résulte que c'est le même produit qui est élué pendant cet instant. Ainsi, le produit B correspond au produit de la fraction 1 de la colonne 2 et le produit C correspond au produit de la fraction 2 des deux colonnes. La 2^{ème} fraction de la colonne 1 est soumise aux différentes analyses spectrales.

Figure 25 :

Chromatogramme de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* étudiée.

**Figure 26 :**

Chromatogramme du produit de la 2^{ème} fraction de la colonne 1



IV-2-4-4- IDENTIFICATION PAR RMN ^1H et ^{13}C INFRA-ROUGE ET SM

Les figures 27, 28 et 29 présentent les différents spectres analytiques et les résultats des analyses sont consignés dans les tableaux 49 et 50.

Figure 27 : Spectre RMN ^1H du produit C isolé

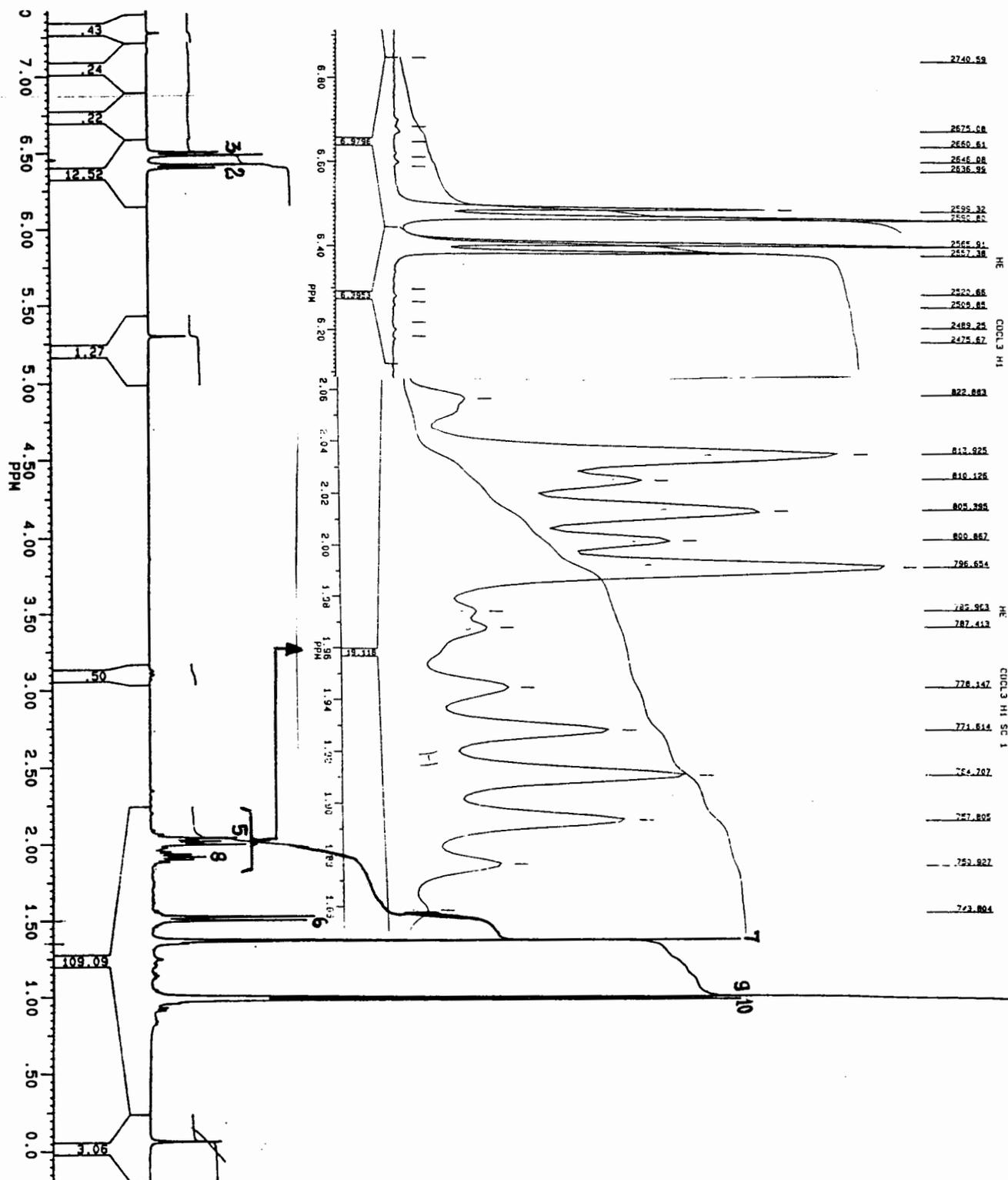


Figure 28 : Spectre RMN 1H à deux dimensions du produit C isolé

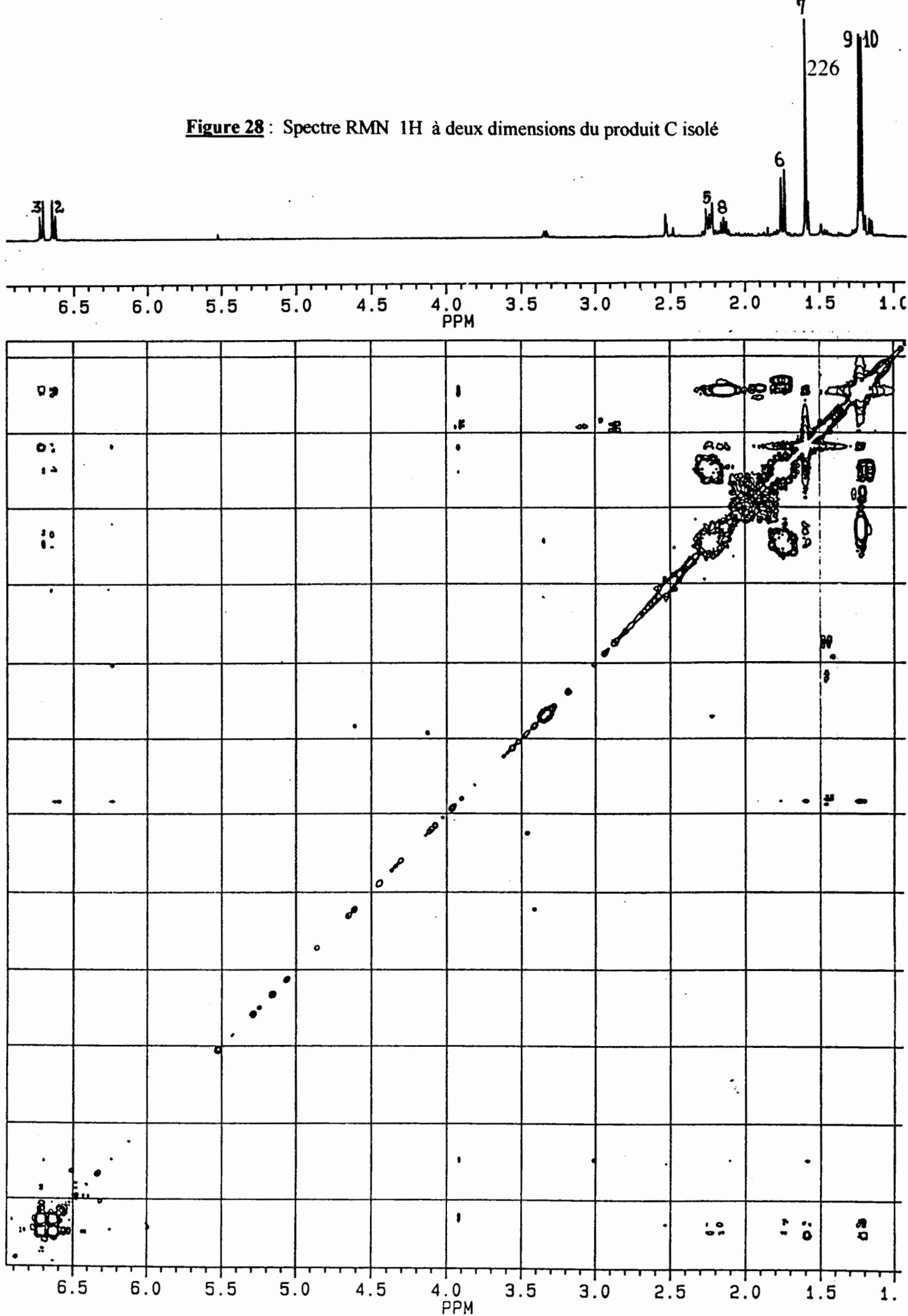
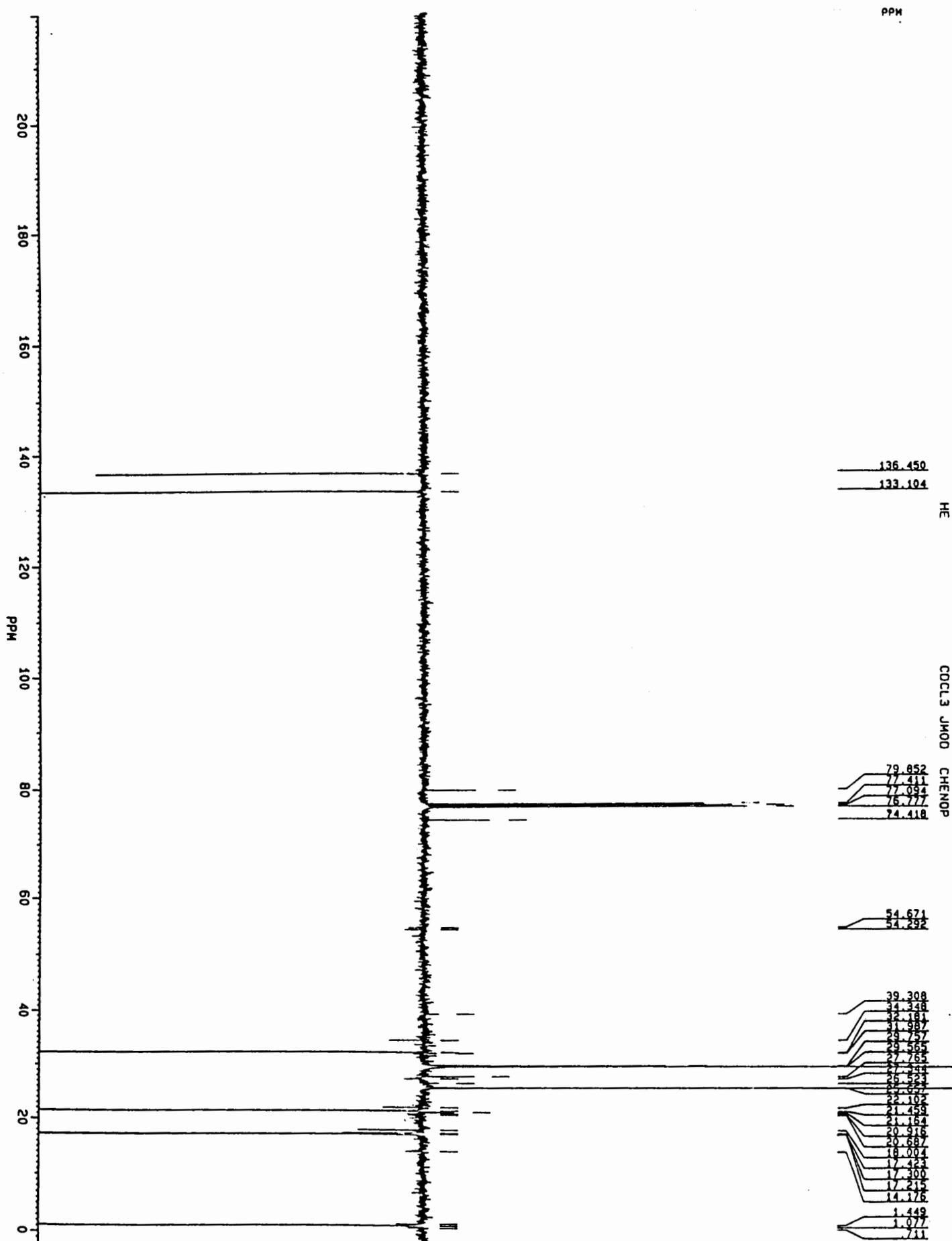


Figure 29 : Spectre RMN ^{13}C du produit C isolé

Du spectre RMN ^1H , nous dénombrons 16 atomes d'hydrogène

Tableau 49 :

Interprétation du spectre RMN ^1H du produit C

δ (ppm)	Signal	Nombre d'hydrogène	Proton correspondant
1	2 singulets	6	CH_3 (9) et CH_3 (10)
1,36	1 singulet	3	CH_3 (7)
1,55	1 doublet apparent	2	CH_2 (6)
1,909	1 septuplet	1	CH_2 (8)
2,01	1 multiplet (8 pics)	2	CH (5)
6,45	2 doublets	2	CH (2) et CH (3)

Le spectre RMN ^1H à double dimension (figure 28) fait apparaître les différents couplages qui existent entre les protons confirmant ainsi les résultats de la RMN ^1H à une dimension.

Nous dénombrons 10 atomes de carbone à partir du spectre RMN ^{13}C

Tableau 50 :

Interprétation du spectre RMN ^{13}C du produit C

δ (ppm)	17,25	21,5	25,67	29,43	32	74,43- 79,86	133,12	136,47
Type du carbone	$\text{C}_{(9) \text{ et } (10)}$	$\text{C}_{(7)}$	$\text{C}_{(6)}$ $\text{C}_{(5)}$	$\text{C}_{(8)}$	$\text{C}_{(1) \text{ et } (4)}$	$\text{C}_{(2)}$ $\text{C}_{(3)}$		

Le spectre IR (figure 30) effectué en analyses complémentaires, présente : deux fortes bandes à $914,7 \text{ cm}^{-1}$ et à $735,2 \text{ cm}^{-1}$ caractérisant respectivement de la liaison peroxyde O-O et de la liaison époxyde C-O, une faible bande à $1112,1 \text{ cm}^{-1}$ caractéristique de la liaison C-O-O.

Figure 30 :

Spectre Infra-Rouge du produit C isolé

Y: 1 scan, 2.0cm-1

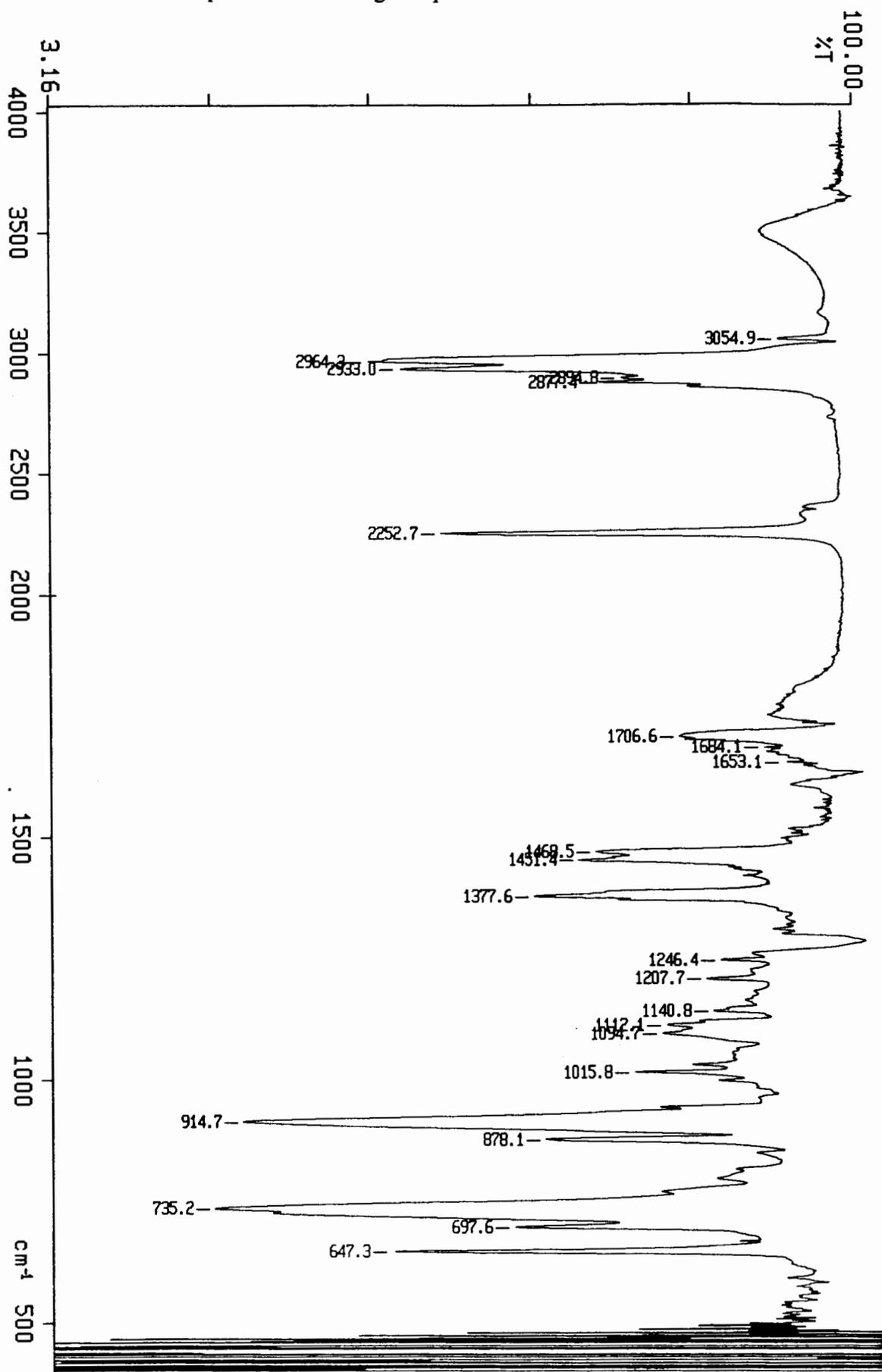
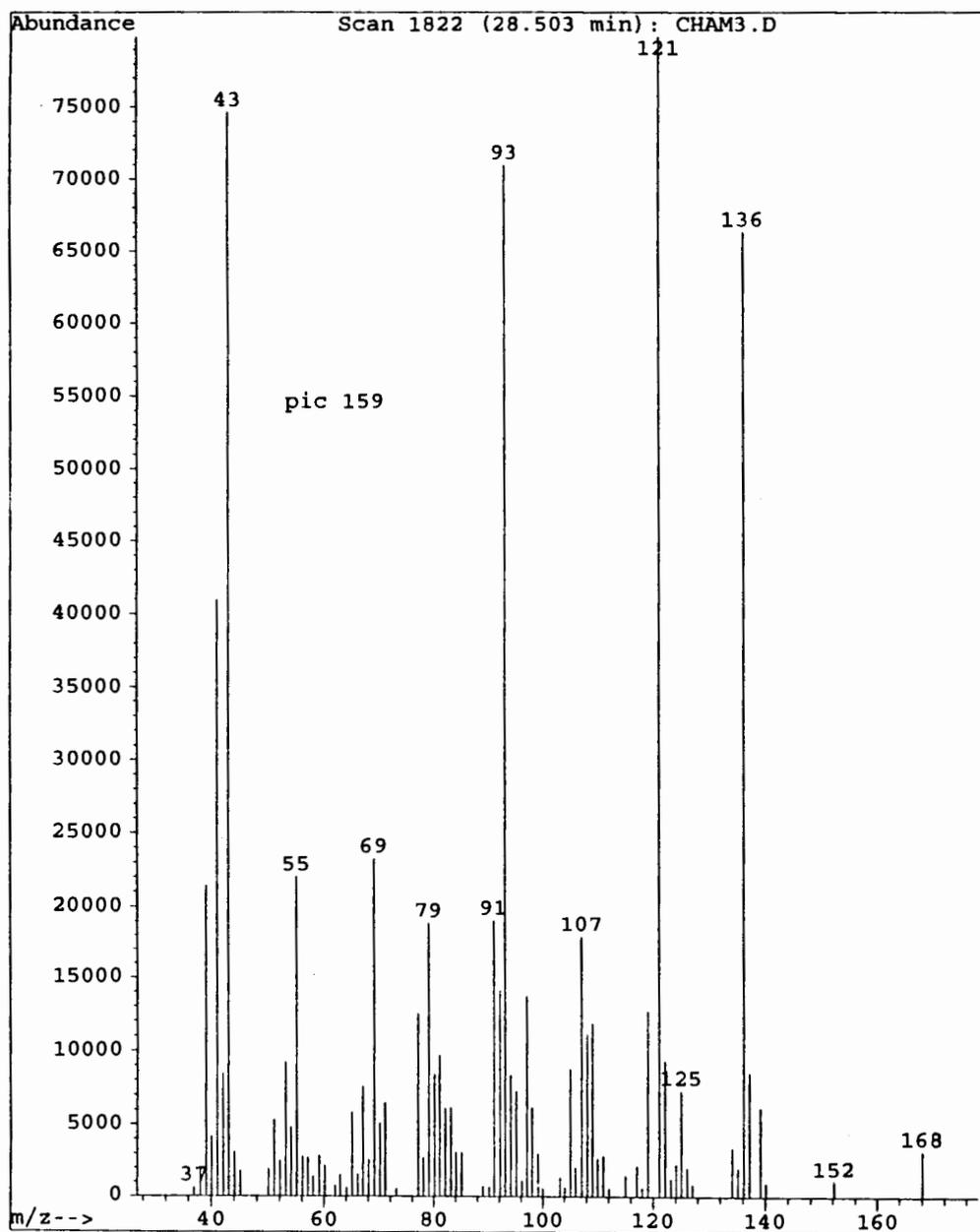


Figure 31 :

Spectre de masse du produit C isolé

**Tableau 51 :**

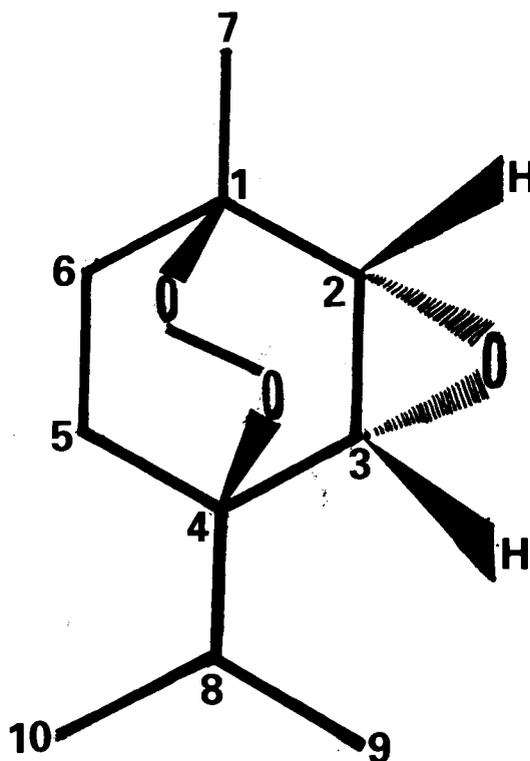
Interprétation du spectre de masse du produit isolé (pic moléculaire est non visible)

PIC	168	136	121	93	43
Fragment cédé	O^+	O_2^+	CH_3^+	$C_2H_4^+$	$C_4H_2^+$
masse	16	32	15	28	50
Fragment restant	$C_{10}H_{16}O_2$	$C_{10}H_{16}$	C_9H_{13}	C_7H_9	C_3H_7

Au vu de tout ce qui précède, nous proposons comme formule brute du produit isolé



et pour formule développée



DEUXIÈME PARTIE

PROPRIÉTÉS

PHARMACODYNAMIQUES

DE QUELQUES HUILES

ESSENTIELLES BÉNINOISES

INTRODUCTION

Les huiles essentielles ou essences aromatiques, principes odorants de certaines substances naturelles, sont obtenues en général par entraînement à la vapeur d'eau (263). Elles présentent des propriétés physiologiques variées qui leur ont valu de nombreuses applications en médecine traditionnelle (264).

Les huiles essentielles sont également utilisées dans certaines préparations pharmaceutiques et dans l'industrie alimentaire comme excipients et substances aromatisantes, en parfumerie et en cosmétologie comme agents de fragrance et désinfectants (264-269).

Dès la découverte des microorganismes par Pasteur à la fin du XIX^{ème} siècle, on s'est aperçu que les huiles essentielles pouvaient, soit inhiber la croissance des bactéries et des champignons, soit exercer un effet létal sur ces germes et de nombreuses techniques ont été proposées pour mesurer cette activité (270, 271).

Dans cette partie, nous indiquons les principales méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique en insistant sur leurs avantages et leurs inconvénients. Nous décrivons ensuite une microtechnique de dilution en série, en milieu liquide, que nous avons utilisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles des plantes médicinales d'origine béninoise préalablement décrites chimiquement dans la première partie.

I.- GÉNÉRALITÉS : TRAVAUX DES AUTEURS

I.1.- QUELQUES DÉFINITIONS (266, 269-274)

I.1.1.- ASEPSIE (270)

Ensemble des mesures propres à empêcher tout apport exogène des microorganismes ou de virus non pas dans le but de détruire les germes qui sont déjà en contact avec l'organisme mais de protéger ce dernier contre un risque d'infection microbienne.

I.1.2.- ANTISEPSIE (270)

Opération ou résultat momentané qui permet au niveau des tissus vivants et ceci dans la limite de leur tolérance d'éliminer ou de tuer les microorganismes ou d'inactiver les virus en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération, qui est lié à l'utilisation d'agents chimiques et des substances naturelles d'origine végétale ou minérale est limité aux microorganismes et aux virus présents au moment de l'opération.

I.1.3.- DÉSINFECTION (270)

Opération ou résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et d'inactiver les virus indésirables supportés par le milieu inerte contaminé en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est également limité aux microorganismes ou virus présents au moment de l'opération.

I.1.4.- DÉSINFECTANTS ET ANTISEPTIQUES

Les antiseptiques sont des substances utilisées en thérapeutique c'est-à-dire à l'intérieur de l'organisme humain ou animal. Ils se distinguent des désinfectants qui sont utilisés en hygiène et destinés à détruire les germes pathogènes où ils se trouvent en dehors des êtres vivants ; sur les surfaces inertes et dans les milieux extérieurs : eaux, air, locaux, objets, linges...

Les désinfectants se sont imposés en tant qu'agents conservateurs, additionnés à des préparations médicamenteuses et d'autres produits biologiques ainsi qu'aux produits alimentaires industriels en vue de les protéger contre une contamination spontanée ou accidentelle susceptible d'entraîner leur altération.

Ils sont de plus en plus employés en cosmétologie et en parfumerie.

I.1.5.- EFFETS BACTÉRIOSTATIQUE ET BACTÉRICIDE (270, 271)

L'étude de l'activité antimicrobienne d'une substance selon la concentration à laquelle elle agit et sa durée d'action implique deux processus :

- Le premier se traduit par un arrêt de multiplication des germes sans qu'il y ait nécessairement une destruction. Il s'agit d'une inhibition parfois réversible de quelques fonctions biologiques nécessaires aux métabolismes du germe, à sa croissance et à sa multiplication sans que toutes les fonctions vitales ne se trouvent atteintes. Ce processus met en jeu l'activité bactériostatique ou fongistatique d'une substance.

- Le deuxième processus se traduit par une destruction définitive du microbe à plus ou moins longue échéance, destruction liée à une lésion irréversible rendant impossible toute prolifération ultérieure. Cette action létale est dite bactéricide, fongicide ou virulicide selon le germe en cause et l'efficacité reste liée au facteur temps.

Il y a **effet bactériostatique** à un temps donné lorsque le nombre de bactéries en présence d'une concentration définie de substance antibactérienne est égale ou supérieure au nombre de bactéries existantes à l'ensemencement au début de l'expérience mais inférieure à un témoin de croissance totale sans antibactérien.

Il y a **bactéricidie** à un temps donné lorsque le nombre de bactéries viables est inférieur au nombre initial dans l'inoculum.

Il faut distinguer ici l'**action antibiotique**. L'antibiotique s'oppose à la croissance des microorganismes et s'oppose par essence à la vie. Selon leurs degrés d'action, les antibiotiques peuvent être classés comme bactériostatique ou comme bactéricide.

I.1.6.- AROMATHÉRAPIE : NOTION D'AROMATOGRAMME

L'emploi des "arômes et aromates" dans la thérapeutique ou "aromathérapie" (266, 268, 272, 273) nécessite un diagnostic préalable de la sensibilité des germes à traiter vis à vis de ces substances. L'aromatogramme est une méthode qui permet de repérer in vitro le pouvoir bactériostatique et bactéricide de plusieurs huiles essentielles et de comparer leurs actions vis-à-vis d'un germe donné.

Cet examen équivaut à l'antibiogramme, où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles.

Le principe de l'aromatogramme consiste à ensemencer un milieu de culture solide (gélose) par un germe responsable d'une infection.

On dépose ensuite sur la surface des disques de papier filtre imbibés d'huiles essentielles.

On mesure, autour de chaque pastille, après un temps et à une température donnée d'incubation selon les germes, les diamètres d'inhibition, en millimètre, de la culture microbienne.

Dans cette zone où il n'y a pas de croissance visible des souches, on prélève une petite quantité du milieu qu'on repique sur un milieu nutritif neuf dépourvu d'antiseptique.

On obtient ce qu'on appelle une subculture si les germes sont seulement inhibés tandis qu'on n'obtient aucune culture s'ils sont tous tués.

On détermine ainsi les concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) correspondant respectivement à la plus faible concentration d'une substance pouvant inhiber la croissance visible des microorganismes étudiés et à celle qui les tue de façon irréversible.

Les nouvelles techniques d'aromatogramme en milieu liquide sont les plus intéressantes car elles permettent une meilleure répartition des produits de l'huile essentielle et leurs contacts avec les germes. Elles sont plus reproductibles, permettant ainsi une bonne comparaison entre les différents résultats.

I.2.- TECHNIQUES D'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

Les techniques microbiologiques appliquées à l'évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles sont nombreuses et sont décrites en fonction du développement chronologique de leur mise en application

I.2.1.-TECHNIQUES D'ÉTUDE EN PHASE VAPEUR

I.2.1.1.- PROCÉDÉ AU FIL

Ce procédé fut mis au point par KOCH en 1881 (274). Des fils imprégnés de suspensions bactériennes sont suspendus au centre de tubes à essai stérilisés fermés par du coton. Ces fils effleurent la surface (3 cm) de l'essence (1 ml) introduite dans le fond de chaque tube. Après incubation à 37°C de durée variable, les fractions des fils sont placées à la surface d'un milieu de culture pour mettre en évidence le développement des bactéries ayant survécues. C'est une technique ancienne et peu précise.

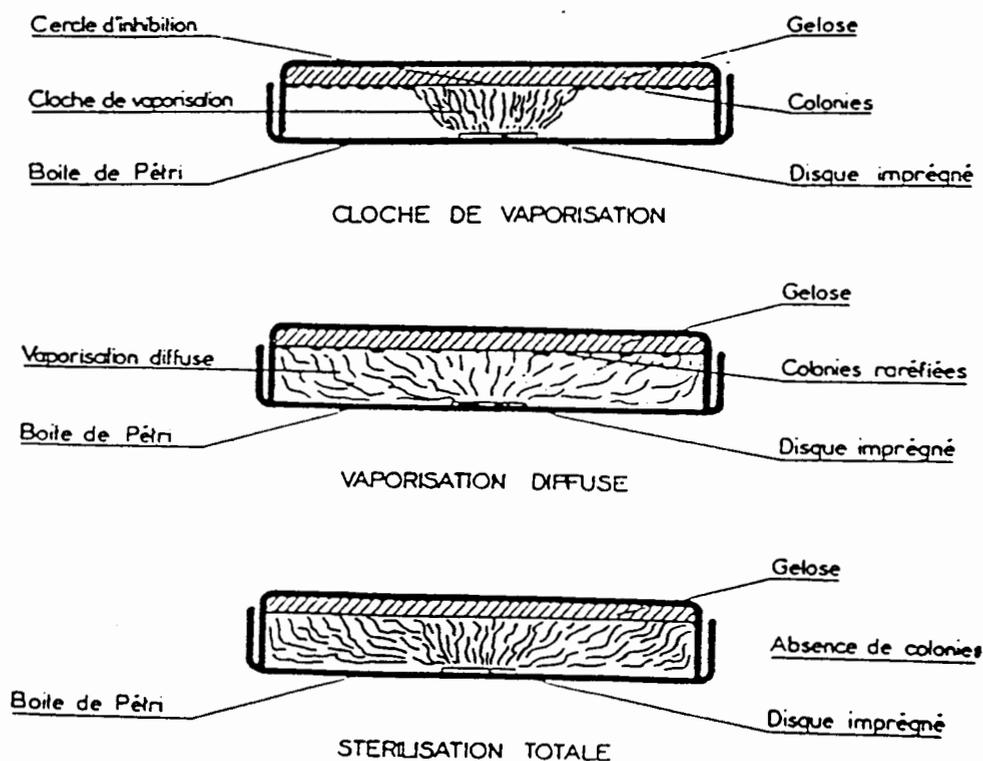
I.2.1.2- TECHNIQUES DES MICROATMOSPHERES

Mise au point par KELLNER et KOBERT en 1954 (275), elle permet d'évaluer l'activité antibactérienne des essences diffusant dans une microatmosphère close contenue entre le couvercle et la gélose.

Dans une boîte de Pétri contenant une gélose sur laquelle un germe donné a été ensemencé, un disque de papier filtre, imbibé d'essence est déposé au centre géométrique du couvercle. La boîte est ensuite fermée et incubée à l'étuve à 37°C, couvercle en bas. Au bout de 18 heures environ on note les résultats soit par appréciation des modifications du nombre et de la dimension des colonies (275), soit par la mesure des zones d'inhibition de la culture (276, 277) (Figure 32).

Figure 32

Action d'une huile essentielle au cours de la méthode des microatmosphères



L'avantage de cette technique, ne mettant en jeu que des essences pures non diluées, serait d'éviter le problème de leur solubilisation.

Une réduction du nombre de colonies par rapport à la culture témoin après 24 heures d'incubation correspond à une bactériose transitoire (278). Si on enlève le papier filtre supportant l'antiseptique, il est possible d'évaluer, après 48 heures de remise à l'étuve, une bactériostase définitive par comparaison avec le résultat précédent (278).

En réduisant l'application du disque au centre géométrique du couvercle de la boîte, SARBACH apprécie d'une part la modification de culture et obtient d'autre part une estimation chiffrée par mesure, en millimètre, des zones d'inhibition de la culture (277).

Enfin, seule l'activité de la fraction volatile de l'essence est déterminée, ce qui représente un intérêt pour les produits destinés à agir par évaporation comme les aérosols et les agents de contrôle des atmosphères dans les hôpitaux.

Néanmoins cette méthode ne permet d'évaluer qu'une partie de l'activité antiseptique, les produits non volatiles pouvant être responsables d'une certaine activité, échappent à l'expérimentation.

I.2.2.- TECHNIQUES DE DIFFUSION

La diffusion est un phénomène physique au cours duquel une force physique s'irradie autour d'un point en champ sphérique en réalisant un gradient dégressif de concentration. Ce principe a été utilisé avec de nombreux dispositifs techniques pour étudier l'activité des substances antimicrobiennes.

La méthode de diffusion sur agar en milieu solide a eu un large succès pour le dosage des antibiotiques et est citée par plusieurs auteurs (270, 279).

I.2.2.1.- TECHNIQUES DE DIFFUSION EN MILIEU SOLIDE

Les méthodes les plus utilisées dérivent de celle de VINCENT (1944) (280), technique officielle utilisée pour les antibiotiques. On dépose à la surface d'une gélose préalablement ensemencée de germe-tests des disques de papier filtre imprégnés de 0,02 ml d'essence. On peut également découper des cupules dans la gélose qui recevront les produits à tester (278, 281). Après 24 heures d'incubation à 37° C, on observe l'apparition d'une zone claire autour des disques ou des cupules n'ayant pas de colonies microbiennes, appelée zone d'inhibition (Figure 33). Certains auteurs ont utilisé jusqu'à quatre disques par boîte de Pétri mais il est conseillé d'utiliser très peu de disques par boîte pour éviter les interactions de synergie entre huiles essentielles.

La méthode de diffusion en milieu solide permet de déterminer, pour une substance donnée, son pouvoir antiseptique par contact. Ce dernier est proportionnel au diamètre d'inhibition.

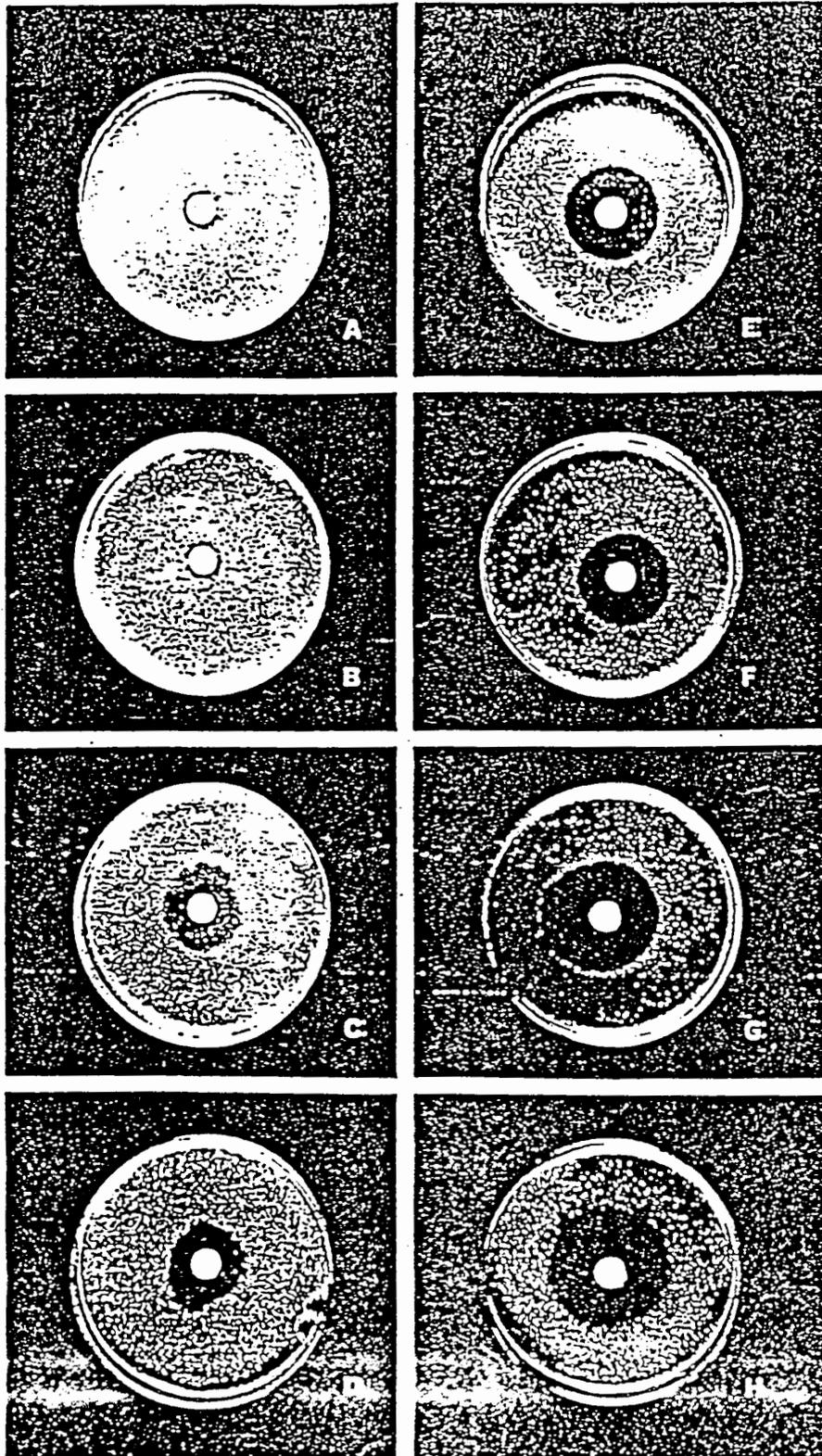
La technique, facile à mettre en oeuvre, permet d'apprécier avec précision le pouvoir inhibiteur de l'essence et une comparaison avec l'action des antibiotiques usuels dans les conditions expérimentales analogues. Cependant les résultats dépendent de nombreux facteurs tels que la nature du milieu (taux d'hydratation, composition, pH...) et la composition des essences dont les paramètres de diffusion sont difficiles à maîtriser (270, 271) ; les constituants des huiles essentielles étant hétérogènes, peuvent migrer séparément, le plus actif n'étant pas nécessairement celui qui migre le plus.

L'effet antibactérien recherché dépend de la quantité de substance au niveau de la source. En plus d'une migration différentielle des constituants de l'essence, il existe une perte à la source de l'antimicrobien par absorption sur le papier filtre d'une partie d'essence.

L'examen de la littérature montre que les diamètres des disques, la quantité d'huile déposée, la méthode d'ensemencement de la gélose et le temps d'incubation peuvent varier d'un auteur à l'autre. Cela entraîne un manque de standardisation et une comparaison difficile des résultats obtenus (270, 279, 280-282, 284).

Figure 33

Formation d'une zone d'inhibition des microorganismes en fonction du temps d'incubation dans la méthode de diffusion sur agar



On a constaté que la méthode n'exploitait pas exclusivement le pouvoir de diffusion de l'huile essentielle mais aussi sa vaporisation car en dehors du cercle d'inhibition par contact direct, on observe une réduction globale du nombre et de la dimension des colonies sous l'influence de la vaporisation de l'essence

I.2.2.2.- TECHNIQUES DE DIFFUSION EN MILIEU LIQUIDE

Encore appelées méthodes des disques, elles ont été mises au point par SARBACH (277). Des disques imprégnés de 0.02 ml d'huile essentielle sont disposés au fond des tubes à essai stériles dans chacun desquels on ajoute 6 ml d'un bouillon de culture contenant un nombre donné de germes à tester. Une agitation mécanique continue, à l'étuve et à 37°C, assure le contact entre l'inoculum et l'essence. On effectue des prélèvements pour subculture afin de déterminer le pouvoir bactéricide du produit, après des temps variables.

L'agitation continue, permet un meilleur contact entre les principes actifs de l'huile avec les germes. Toutefois il est difficile de chiffrer la concentration finale du principe actif libéré à partir du disque vers le milieu liquide.

Cette méthode, permettant d'évaluer l'activité bactéricide des huiles en fonction du temps par subculture et comptage des survivants variables selon les huiles, est peu citée dans la littérature.

Les techniques de diffusion présentent des inconvénients tels que la diffusion des essences ne s'effectue pas dans des conditions parfaitement définies. En outre, les huiles essentielles sont composées de nombreux constituants qui peuvent diffuser en migrant séparément, de telle sorte que ce n'est pas forcément le plus actif qui diffuse le mieux.

I.2.3.- TECHNIQUES DE DISPERSION

On entend par dispersion, la fine division d'une substance dans une autre substance qui constitue une phase continue, de manière à obtenir une suspension de particules (270).

La difficulté principale, rencontrée pour l'étude des huiles essentielles réside dans leur immiscibilité dans l'eau, constituant principal des matériaux biologiques. Pour rendre optimale la dispersion des huiles essentielles dans les milieux de culture microbienne, certains auteurs ont eu recours aux solvants organiques, d'autres aux tensioactifs ou surfactants.

La technique de dispersion permet d'étudier l'activité d'un agent antimicrobien à des concentrations croissantes ou décroissantes permettant ainsi une meilleure appréciation de la plus petite concentration ne donnant pas de croissance visible des germes (concentration minimale inhibitrice ou CMI) à un temps donné, et à partir d'un inoculum de titre choisi. Certains auteurs parlent de technique de dilution en série.

I.2.3.1.- TECHNIQUES UTILISANT LES SOLVANTS ORGANIQUES

MOREL et ROCHAIX (285) ont utilisé des solutions d'huiles essentielles dans l'alcool à 60%; MARUZELLA (276), MORRIS (284) et SIMEON DE BUOCHBERG (270) des solutions d'essence dans l'alcool à 95°. DABBAH et Coll. (286) ont tenté de réaliser des émulsions d'huiles essentielles directement dans le milieu nutritif en agitant le mélange pendant 10 minutes aux ultrasons. L'évaluation de l'activité antimicrobienne est effectuée en milieu solide par subculture.

Les auteurs, utilisant les méthodes de solubilisation des huiles essentielles dans les solvants organiques, ne se sont pas interrogés sur les interférences des solvants et des huiles essentielles et de l'effet de solvant sur les souches. Ainsi SARBACH (277), a montré que le pouvoir antibactérien de certaines huiles essentielles augmentait en utilisant l'alcool isopropylique comme solubilisant. MOREL et ROCHAIX (285), en remplaçant l'alcool par l'eau distillée, ont constaté que l'huile essentielle à l'état moléculaire dans l'alcool était plus active qu'à l'état colloïdal en suspension dans l'eau. Les solvants ont été abandonnés au profit d'émulsifiants.

I.2.3.2.- TECHNIQUES UTILISANT LES ÉMULSIONS

Bien longtemps, certains auteurs ont réalisé les aromatoigrammes en milieu solide en utilisant des émulsions d'huiles essentielles.

CHAMBERLAND (287), réalisa, une émulsion d'essence en ajoutant des saponines (1%) à une solution d'huiles essentielles (1/5) dans l'alcool absolu.

MILLER (288) préconisa l'emploi d'un mélange constitué de glycérine (31%) d'eau (31%), d'alcool (31%) et de savon (6,6%).

FABRE et Coll. (289) proposèrent d'incorporer l'essence dans un milieu semi liquide contenant 2 à 3 g/l de gélose pour éviter la séparation des phases de densités différentes.

ALLEGRIINI et SIMEON DE BUOCHBERG (290, 291) sont les premières à utiliser, dans les tests antimicrobiens, les émulsionnants chimiques. Les tests pouvant être effectués en milieu liquide ou en milieu solide.

Les Tween 20 et 80 (74, 270, 279, 292) se sont montrés inertes vis-à-vis des germes et des essences testées. Ces derniers composés étaient utilisés auparavant comme émulsifiants dans les parfums et les cosmétiques (294, 295).

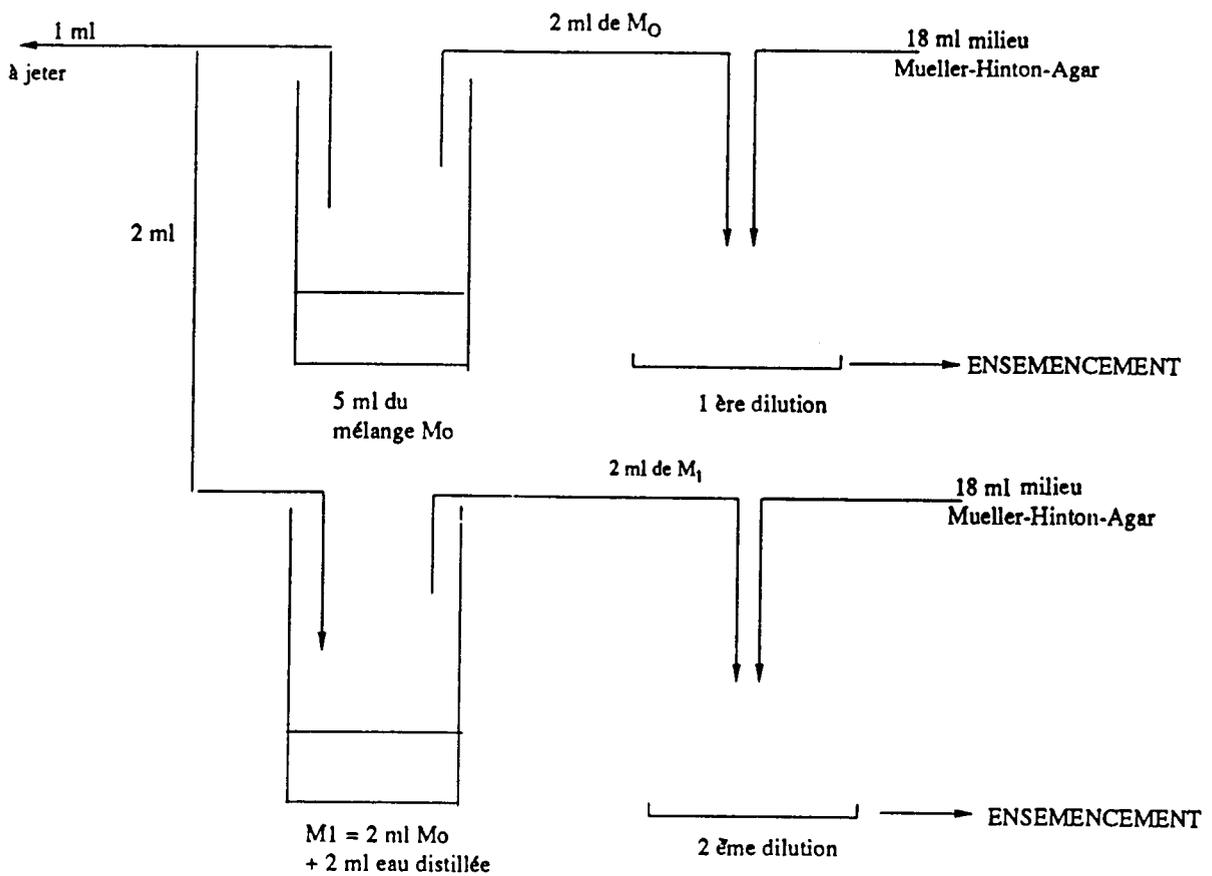
I.2.3.2.1.- TECHNIQUES UTILISANT LES ÉMULSIONS EN MILIEU SOLIDE

La méthode proposée par ALLEGRIINI et SIMEON DE BUOCHBERG (290, 291) consiste à préparer les solutions-mères d'huiles essentielles (1/20) par suspension dans l'eau distillée contenant l'émulsionnant (Tween 20 ou Tween 80) 10%. Les dilutions décroissantes d'essence, de raison géométrique d'ordre deux, sont ensuite effectuées dans l'eau distillée. Les émulsions stables sont obtenues par agitation mécanique ou aux ultra-sons. Deux millilitres de chaque émulsion d'huile sont mis en contact avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton-Agar (fondu et ramené à 45°C) contenus dans des boîtes de Pétri stériles. On laisse refroidir à la température de la pièce tout en agitant afin d'obtenir une répartition homogène des substances actives dans le milieu.

Enfin, on ensemence en surface à la pipette de Hatley un inoculum contenant 10^6 germes par ml. Les lectures sont effectuées après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37°C pour déterminer les CMI (Figure 34).

Figure 34

Méthode de dilution des huiles essentielles d'après SIMEON DE BUOCHBERG (270)



M_0 = Mélange huile essentielle- tween 80- eau distillée
 M_1 = Première dilution de M_0 dans l'eau distillée

I.2.3.2.2.- TECHNIQUES UTILISANT LES ÉMULSIONS EN MILIEU LIQUIDE

I.2.3.2.2.1.- MÉTHODES CLASSIQUES OU MACROMÉTHODE

La technique mise au point par ALLEGRINI et SIMEON DE BUOCHBERG (270, 271) permet de préparer les émulsions-mères d'essence par dispersion des huiles essentielles dans un mélange eau /Tween 80 (10%) à partir desquelles on réalise, dans une série de tubes, une gamme de dilutions convenablement choisies. On ajoute à 1 ml de chaque dilution 9 ml de bouillon nutritif préalablement ensemencé de germes de manière à obtenir une concentration bactérienne finale égale à 10^6 germes/ml. Les CMI sont appréciées à l'oeil après 18 à 24 heures d'incubation à l'étuve tandis que la bactéricidie est évaluée par subculture après différents temps de contact entre l'agent antiseptique et le germe.

Les auteurs ont pu établir les courbes de croissance des microorganismes testés par mesure de la turbidité à intervalle régulier des milieux de culture des microorganismes et calculer les concentrations minimales de quelques composés terpéniques commerciaux (Tableau 52) (270).

On constate que, parmi des composés linéaires, le géraniol a une plus forte activité (CMI = 0,25 à 0,50 mg/ml pour *S. aureus* (G⁺), *E. coli* et *K. pneumoniae* (G⁻). Le linalol est 2 à 3 fois moins actif que le géraniol pour l'ensemble des bactéries.

L' α -terpinéol, terpinéol-4 et le trans-thujanol, composés cycliques non aromatiques ont une activité sensiblement équivalente avec une sensibilité plus grande pour *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Le thymol et le carvacrol ont une activité antimicrobienne très élevée (CMI = 0,125 à 0,250 mg/ml), même vis-à-vis de *P. aeruginosa* (CMI = 1,00 à 2,00 mg/ml) plus résistant aux autres composés testés. Le p-cymène est 8 fois moins actif que les autres composés aromatiques.

L'activité bactériostatique des acétates d'alcools traités est environ deux fois moindre que celle des alcools correspondants.

Tableau 52

CMI (mg/ml) de certains constituants des huiles essentielles d'après SIMEON DE BUOCHBERG (270)

microorganismes	<i>S. aureus</i> IP 54146	<i>S. aureus</i> ATCC 53156	<i>S. aureus</i> ATCC10537	<i>S. aureus</i> ATCC 9144	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>E. coli</i> IP 5530	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>P. aeruginosa</i> IP 6352
composés										
géraniol	0,25	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	4,00
acétate de géranyle	0,50	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	4,00	4,00	4,00
linalol	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	8,00
acétate de linalyle	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	2,00	2,00	4,00	4,00	4,00
α -terpinéol	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	0,50	1,00	1,00	4,00
acétate de α -terpinéyle	2,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00	4,00
terpinéol-4	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,00
acétate de 4-terpinéyle	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	1,00	2,00	4,00	4,00	5,00
(E)-thujanol	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	4,00
p-cymène	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
thymol	0,13	0,25	0,25	0,13	0,25	0,13	0,25	0,13	0,13	1,00
carvacrol	0,25	0,25	0,25	0,13	0,25	0,13	0,25	0,25	0,25	2,00

YOUSSEF et TAWIL (283), ont repris cette méthode de dilution de l'huile essentielle en préparant des solutions-mères d'essence au 1/8. En ensemençant 2,5 ml de chaque dilution avec 0,1 ml de suspension bactérienne, ils ont déterminé les CMI et CMB de certaines huiles essentielles. Les lectures ont été effectuées après 48 heures d'incubation à 37°C (Tableau 53) pour les bactéries et 8 jours pour les champignons. Les CMB sont obtenues par subculture.

L'huile de cannelle est fortement active contre tous les germes testés; l'huile de *Chenopodium* est active envers *C. albicans* tandis que les huiles de citronnelle et d'Eucalyptus sont inactives.

De nombreux auteurs ont proposé plusieurs variantes de la méthode de dilution. Nous avons décrit la méthode mise au point par l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie et le Laboratoire de Chimie des Huiles Essentielles de l' Université BLAISE PASCAL de Clermont en collaboration avec la Pharmacie du Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand (74).

Une émulsion-mère est préparée en ajoutant 40 ml d'huile essentielle et 10 ml de Tween 80 dans 4 ml de bouillon de culture Mueller Hinton stérile coloré au rouge de phénol (0,1%) et en utilisant une agitation mécanique avec un appareil électrique Vortex. A partir de cette solution on réalise, dans une série de tubes de 18 ml contenant 2 ml de bouillon de culture stérile, des dilutions de raison géométrique 2.

Deux millilitres de la solution initiale huile/Tween sont prélevés au moyen d'une pipette stérile et introduit dans le deuxième tube. Après agitation, 2 ml de cette dernière solution sont dilués dans le troisième tube et ainsi de suite. On prépare ainsi des émulsions Huile/Tween/bouillon de culture allant de 20 à 0,07 mg/ml (Figure 35).

Tableau 53

Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles (CMI, CMB: mg/ml) (283)

huile commerciale		Cannelle	Chenopodium	Citronnelle	Eucalyptus
<i>Escherichia coli</i>	CMI	0,39	63	500	63
	CMB	0,39	130	500	63
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMI	0,39	130	500	63
	CMB	0,39	130	500	63
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMI	0,39	130	63	130
	CMB	0,39	500	250	130
<i>Aspergillus niger</i>	CMI	0,78	7,8	63	15,6
<i>Candida albicans</i>	CMI	0,25	0,25	63	15,6

Chaque tube est ensuiteensemencé par 2 ml d'un bouillon de culture contenant 10^6 germes/ml environ. Les gammes sont lues de façon visuelle après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37°C.

La multiplication des bactéries entraîne l'acidification du milieu induisant un virage du rouge de phénol du rouge au jaune ou bien à l'orange. Le maintien de la couleur rouge limpide signifie une absence de croissance microbienne. Le rouge de phénol, à la concentration utilisée, est inerte vis-à-vis des germes.

L'utilisation du rouge de phénol ne convient pas pour la culture de *P. aeruginosa* et des champignons (variation de pH différent). L'évolution de leurs cultures se traduit par l'apparition d'un trouble ou d'un dépôt dans le tube. La vérification de l'inhibition peut être effectuée par subculture.

I.2.3.2.2.2.- MICROTECHNIQUE DE DILUTION EN SÉRIE

La technique précédente, nécessitant l'emploi d'une verrerie importante pour une huile essentielle, est longue et très coûteuse en matériel lorsqu'il faut étudier plusieurs huiles essentielles. Les efforts se sont déployés pour miniaturiser et parfois automatiser le processus (271, 296-298).

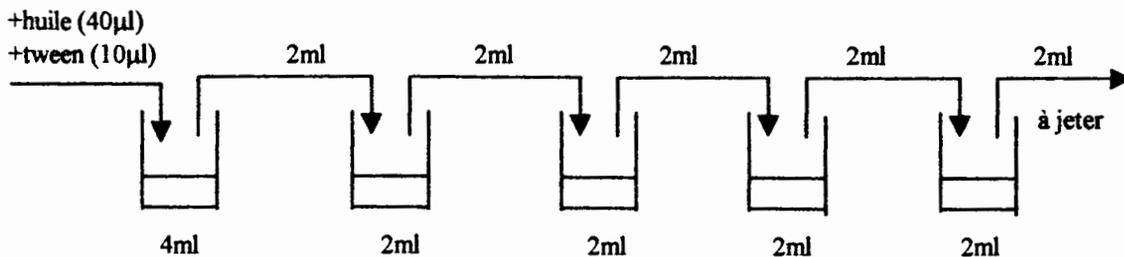
Ces microméthodes préconisent une lecture des résultats après 18 heures voire 3 à 4 heures d'incubation. La lecture précoce entraîne l'usage des milieux nutritifs plus enrichis, notamment en glucose. La concentration minimale inhibitrice peut être déterminée, soit par appréciation visuelle de la croissance bactérienne, soit par mesure de densité optique des tubes-tests par rapport à un témoin sans antibactériens (271, 296-298).

La concentration minimale inhibitrice, en microméthode, obtenue par les mesures spectrométriques (CMIr) correspond à la plus petite concentration donnant un pourcentage de croissance inférieur ou égal à 20% ou à 50% par rapport à un témoin (271, 296-298).

Nous avons rapporté deux microméthodes: l'une utilisant l'agar noble comme stabilisant (271, 299), l'autre un émulsifiant: Tween 80 (300).

Figure 35

Méthode de dilution en série (74)



- 1) milieu M.H.+rouge
de phéénol (1 pour mille)
- 2) faire une dilution
de raison 2
- 3) ajouter 2ml de bouillon
de culture à 10^6 germes/ml

2ml

2ml

2ml

2ml

2ml

2ml

I.2.3.2.2.1.- Microtechnique de dilution en série d'après LENS-LISBONNE et Coll. (271, 299).

Cette technique utilise l'agar noble comme stabilisant et met en contact des volumes égaux d'inoculum standardisé et de solution d'antimicrobien. La croissance microbienne est appréciée par des mesures spectrophotométriques à 620 nm.

1° Préparation des essences

Les essences ou leurs composants majoritaires commerciaux sont maintenus en suspension stable dans une solution aqueuse stérile d'agar noble Difco à 1 pour 1000 (g/V) en projetant une prise d'essais de 50 à 500 ml dans 10 ml de solution d'agar noble contenus dans un tube préalablement taré et soumis à une agitation continue sur agitateur centrifuge. Après la pesée, le volume final est complété avec la même solution de façon à obtenir des concentrations variant entre 2 et 20 mg/ml.

2° Préparation de la microplaque

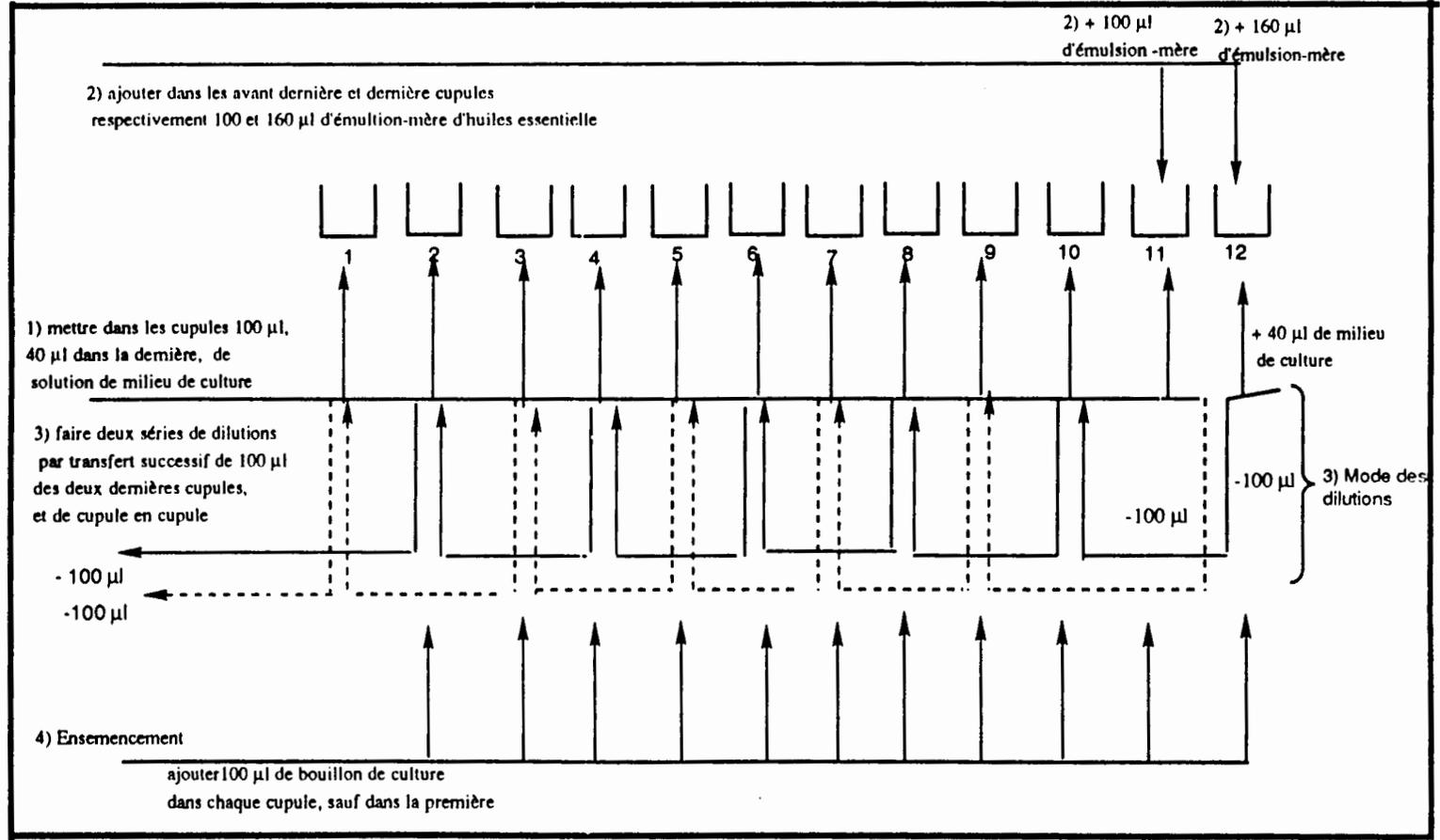
Le milieu nutritif (Difco) enrichi d'extrait de levure (0,3% m/V) et de glucose (1/1000: m/V), tamponné à pH 6 par un tampon phosphate M/15 est inoculé de façon à contenir 1 à 3 x 10⁷ germes/ml.

Les microplaques LUXLON M 24 LSC. à 96 puits sont utilisées. Chacune des 8 rangées sert à l'essai d'une substance antimicrobienne. La première colonne représente les témoins négatifs (croissance nulle) ; la seconde, les témoins positifs (croissance maximale = 100%). Les autres colonnes, de 3 à 12, représentent l'antimicrobien à différentes concentrations.

Les dilutions se font directement sur plaque en répartissant avec une pipette multicanaux (Titerterk), dans toutes les cupules sauf la dernière (qui contiendrait 40 ml), 100 ml de milieu de culture composé par un mélange de solution d'agar (1 pour mille) dans l'eau distillée et d'une solution tampon phosphate à pH 6 (V/V).

On ajoute dans l'avant dernière et dernière cupule de chaque rangée respectivement 100 et 160 ml de solution-mère d'huiles essentielles (2,4 mg /ml) (Figure 36).

Figure 36
 Microméthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne
 d'huiles essentielles d'après LENS-LISBONNE et Coll.(299)



Après agitation par agitateur sur microplaques Flow, les dilutions sont effectuées par prélèvements et transferts successifs de 100 ml des cupules 12, 10, 8, 6, 4, et 3; puis des cupules 11, 9, 7, et 5; 100 ml des cupules 3 et 5 étant rejetés.

On inocule enfin, 100 ml de bouillon de cultures dans les cupules 2 à 12, la cupule 1 contenant le même milieu non ensemencé. Le volume final dans chaque cupule est de 200 ml.

Les lectures se font sur spectrophotomètre Multiskan à 620 nm après incubation à 37°C durant 4 h pour *E. coli*, 6 h pour *S. aureus* et *E. faecium* et 8 h pour *P. aeruginosa*.

Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage de croissance, en fonction de la densité optique mesurée des essais rapportés à celle des croissances nulles et maximales.

La CMI est la plus petite concentration provoquant une croissance inférieure ou égale à 20% (CMIr₂₀) ou bien à 50% (CMIr₅₀) (Tableau 54).

D'après les auteurs, la CMIr₂₀ correspondrait mieux aux résultats expérimentaux attendus.

Les écarts observés entre les CMIr₂₀ et CMIr₅₀ sont faibles et correspondent généralement à une dilution.

Cependant quelques discordances peuvent être notées entre les valeurs des CMIc(mg/ml) et CMIr(mg/ml) notamment pour la sarriette de montagne vis-à-vis de *P. aeruginosa* (CMIc >1,00 ; CMIr = 0,96) et de *E. faecium* (CMIc = 0,25; CMIr >0,96) de l'eugénol contre *E. faecium* (CMIc = 0,60 ; CMIr >0,96), du cinéol-1,8 contre *E. coli* (CMIc>1,00; CMIr = 0,48) et du linalol vis-à-vis de *S. aureus* (CMIc = 0,70; CMI>0,96).

Le thymol et carvacrol (composés phénoliques) sont plus actifs que le linalol et le géraniol (alcools linéaire), ces derniers étant plus actifs que le p-cymène (hydrocarbure aromatique).

Les CMI du thymol et du carvacrol vis-à-vis d'*E. coli* (0,10 à 0,15 mg/ml) sont comparables à celles de SIMEON DE BUOCHBERG (0,13 à 0,25 mg/ml) (270) tandis qu'elles ont des valeurs faibles vis-à vis de *P. aeruginosa* chez LENS-LISBONNE (0,20 contre 1,00 mg/ml pour le thymol ; 0,15 contre 2,00 mg/ml pour le carvacrol).

Tableau 54
 Activité antimicrobienne (CMI : mg /ml) de quelques huiles essentielles
 et composés vis-à-vis des germes pathogènes d'après LENS LISBONNE (299).

Microorganismes	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Enterococcus faecium</i>		
	CMIC	CMIR ₂₀	CMIR ₅₀	CMIC	CMIR ₂₀	CMIR ₅₀	CMIC	CMIR ₂₀	CMIR ₅₀	CMIC	CMIR ₂₀	CMIR ₅₀
cannelle de Ceylan 1	0,20	0,15	0,12	0,20	0,24	0,12	0,40	0,24	0,24	0,35	0,48	0,60
cannelle de Ceylan 2	0,25	0,24	0,15	0,15	0,48	0,24	0,45	0,48	0,48	0,45	0,60	0,48
sarriette de montagne	0,30	0,30	0,30	0,20	0,30	0,48	>1,00	0,96	0,60	0,25	> 0,96	0,60
aldéhyde cinnamique	0,20	0,24	0,20	0,25	0,24	0,12	0,40	0,30	0,24	0,50	0,60	0,48
eugénol	0,50	0,48	0,30	0,40	0,96	0,96	> 1,00	> 0,96	>0,96	0,60	> 0,96	> 0,96
thymol	0,10	0,08	0,06	0,10	0,12	0,06	0,20	0,12	0,12	0,10	0,12	0,12
carvacrol	0,15	0,15	0,12	0,15	0,12	0,12	0,50	0,30	0,24	0,20	0,24	0,24
p-cymène	>1,00	> 0,96	> 0,96	> 1,00	> 0,96	> 0,96	> 1,00	> 0,96	> 0,96	> 1,00	> 0,96	> 0,96
1,8-cinéole	> 1,00	0,48	0,48	> 1,00	> 0,96	> 0,96	> 1,00	> 0,96	> 0,96	> 1,00	> 0,96	> 0,96
linalol	0,60	0,48	0,24	0,70	> 0,96	> 0,96	>1,00	> 0,96	>0,96	1,00	> 0,96	> 0,96
géraniol	0,30	0,48	0,48	0,25	0,48	0,48	>1,00	> 0,96	> 0,96	0,35	0,60	0,48

CMIC = plus petite concentration qui, en macrométhode inhibe la croissance visible après 16 heures d'incubation.

CMIR 20, CMIR50 = la plus petite concentration qui, en microméthode donne après 4 heures d'incubation à 37°C, une croissance maximale de 20%, 50% respectivement par rapport à un témoin.

Les valeurs des CMiC sont également faibles pour le linalol et le géraniol vis-à-vis de *E. coli* (0,30 à 0,70 mg/ml et *S. aureus* (0,25 à 0,30 mg/ml) chez LENS-LISBONNE par rapport à celles de SIMEON DE BUOCHBERG (1,00 à 2,00 mg/ml et 0,25 à 0,50 mg/ml respectivement). On peut supposer l'influence de l'émulsifiant dans le cas de ce dernier auteur vis-à-vis des principes actifs.

I.2.3.2.2.22.- Microtechnique de dilution en série d'après VENDEVILLE et Coll. (300)

La technique met en jeu le Tween 80 comme émulsifiant. La croissance des germes ou leur inhibition est appréciée de façon visuelle par le changement de coloration ou non du rouge de phénol ajouté au milieu de culture.

1°) Préparation des essences et des germes

Les germes à tester sont mis en suspension dans l'eau distillée stérile de façon à obtenir des solutions homogènes de 1 Mc Farland pour les bacilles et les germes de croissance rapide et de 1,5 à 2 Mc Farland pour les cocci et les germes à croissance plus lente. (1 Mc Farland est une unité de mesure de densité de suspension microbienne. Il est déterminé soit à l'aide d'un densitomètre API, soit par comparaison avec des ampoules étalons).

Les émulsions d'huiles sont réalisées à 10% dans une solution eau-Tween 80 (10%) par agitation mécanique au Vortex ou dans une cuve aux ultra-sons.

Le bouillon de culture est un milieu glucosé tamponné contenant le rouge de phénol (1 pour mille).

2°) Préparation de la microplaque

Dans une micro-plaque à 12 rangées, on répartit dans les cupules 10 ml de suspension de germes à tester sauf dans la première colonne (témoin négatif) ; 100 ml de bouillon glucosé contenant le rouge de phénol, 200 ml dans la première, et 25 ml de dilutions d'huiles dans chacune des cupules de la première colonne à raison d'une huile par rangée (Figure 37).

On effectue enfin des dilutions successives de puits en puits, rangée par rangée avec une pipette de 100 µl du puits 1 à 11. Les puits n°12 restent sans huile (témoins positifs de culture) ; réalisant ainsi des dilutions de raison 2 allant de 1/80 à 1/163 840

On couvre la plaque et on fixe le couvercle par un adhésif pour une meilleure étanchéité. La lecture s'effectue après 4-5 heures d'incubation dès que le virage de l'indicateur se produit. La dose minimale bactériostatique est la dilution de la première cupule dont l'indicateur a viré du rouge au jaune (Figure 38).

Le tableau 55 donne les CMB des huiles essentielles testées : les CMB des huiles dites majeures (cannelle, sarriette, origan) sont faibles sur la plupart des souches.

Figure 37
Microméthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne
d'huiles essentielles d'après VENDEVILLE et Coll. (300).

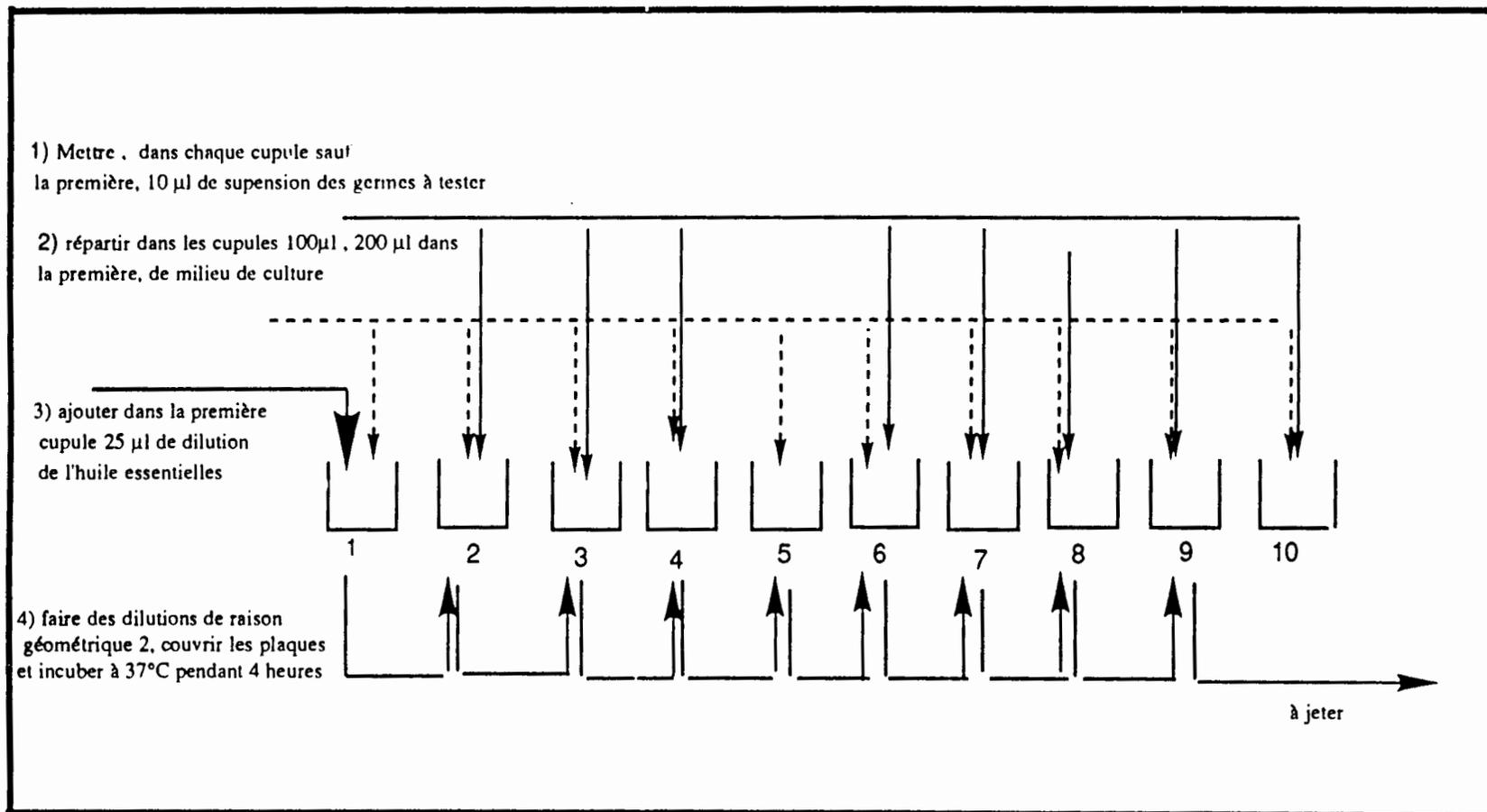
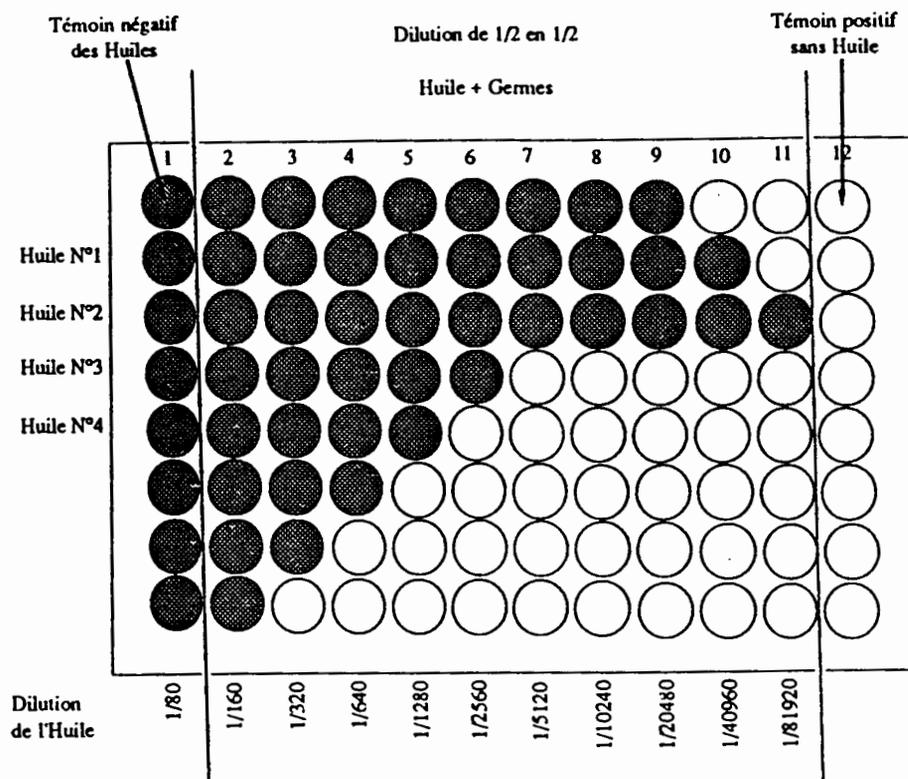


Figure 38

Déterminations de CMB des huiles essentielles par microméthode (300).

**Tableau 55:**

CMI (mg/ml) de quelques huiles essentielles par microméthode d'après VENDEVILLE et Coll. (300)

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. mirabilis</i> ATCC 84041	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i> ATCC 29212
cannelle de Ceylan	1,95	3,90	1,95	1,95	1,95	1,95	3,90
sariette des montagnes	1,95	7,80	1,95	1,95	3,90	3,90	7,80
thym à thymol	1,95	3,90	0,10	0,10	1,95	0,10	3,90
origan d'Espagne	0,10	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
clou de girofle	3,90	15,60	3,90	1,95	1,95	7,80	15,6
<i>Eucalyptus globulus</i>	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80	31,00
pin	3,90	15,6	3,90	1,95	1,95	7,80	15,60
cajeput	7,80	31,00	7,80	3,90	7,80	7,80	31,00

I.3.- TECHNIQUES D'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ FONGICIDE

Les techniques utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des bactéries s'appliquent à celles des levures et champignons en utilisant le milieu nutritif Sabouraud solide ou liquide. L'incubation a lieu généralement à la température ambiante tandis que la durée d'incubation est de 48 heures en milieu liquide, de 2 jours à une semaine en milieu solide.

I.4.- SOLUBILISATION DES HUILES

ESSENTIELLES:

NOTION DE TENSIO-ACTIFS (270, 301, 302)

Les tensio-actifs ou surfactifs ou émulsifiants ou agents de surface sont des produits chimiques de fonctions variables et qui produisent une tensio-activité. Dissous dans un liquide, ils diminuent la tension superficielle et abaissent la tension interfaciale entre ce liquide avec un autre liquide non miscible en favorisant la formation d'une émulsion. La présence d'un tensio-actif stabilise aussi l'émulsion en évitant par voie mécanique la séparation du liquide dispersé de la phase continue. L'émulsion a en général une forme laiteuse. Par un choix judicieux d'un tensioactif et des liquides on obtient des microémulsions formées de particules de diamètre moyen de 0,04 µm, transparentes, limpides et plus stables.

I.4.1.- STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES TENSIO-ACTIFS (270, 271),

Toute molécule douée d'activité superficielle comprend une partie non polaire, à caractère hydrophobe et une partie polaire hydrophile. Si le caractère hydrophile est intense, cas le plus fréquent, le composé est soluble dans l'eau. Au cas contraire, il est liposoluble.

Le rapport entre le caractère hydrophile et le caractère lipophile, appelé Balance - Hydrophile - Lipophile (HLB), est caractéristique de chaque tensio-actif et oriente son utilisation (Tableau 56)

Tableau 56

Utilisation des tensio-actifs en fonction de leurs H.L.B* (GRIFFIN 1967) (43)

HLB	Usage
4-6	Emulsifiants (Eau-huile)
7-9	Agents mouillants
10-18	Emulsifiants (huile-eau)
13-15	Détergents
15-18	Dispersants; Agents solubilisants

* Balance - Hydrophile - Lipophile (HLB) est une échelle numérique empirique établie à partir des études de la dissociation des agents tensio-actifs en milieu aqueux.

Les différents tensio-actifs sont classés en fonction de leur dissociation ou non dans l'eau et de la partie responsable de l'action de surface. On distingue quatre catégories de tensio-actifs.

I.4.1.1.-LES TENSIO-ACTIFS ANIONIQUES

Leur activité est liée à la présence d'un ion contenant au moins 12 atomes de carbones, et chargé négativement. Ils comprennent les savons ($R-COO^- M^+$), les esters sulfoniques d'alcools gras ($R-O-SO_3^- M^+$), les dérivés sulfonés ($R-SO_3^- M^+$) et dérivés phosphatés ($R-PO_3^- M^+$).

Leur emploi est limité car ils n'agissent qu'en milieu alcalin et ils sont souvent irritants pour les muqueuses et la peau.

I.4.1.2.- LES SURFACTIFS CATIONIQUES

La molécule responsable de la tensioactivité est chargée positivement. Il s'agit principalement des sels d'ammonium quaternaire, des sels d'amines ou des amines éthoxylés à longue chaîne hydrocarbonée. Ces composés sont uniquement utilisables en milieu acide et présentent, en plus, une activité bactéricide.

I.4.1.3.- LES SURFACTIFS AMPHOTÈRES OU AMPHOLYTES

Le squelette hydrocarboné possède deux ou plusieurs groupements fonctionnels (alcools, éthers qui, selon le pH du milieu, s'ionisent en conférant au produit les caractères d'un agent de surface soit anionique, soit cationique. Ce sont les bétaines, les acylpeptides et les dérivés de l'imidazoline.

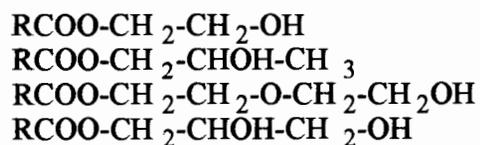
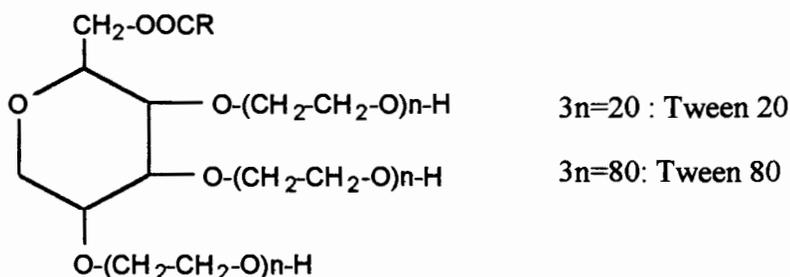
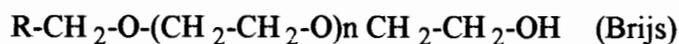
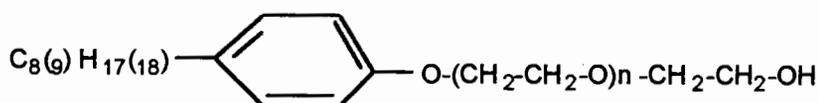
I.4.1.4.- LES SURFACTIFS NON IONIQUES

Ils ne donnent pas naissance à des ions en solution aqueuse (Tableau 57). Leur solubilité dans l'eau est due à la présence dans la molécule des groupements fonctionnels ayant une forte affinité avec le solvant. Ces tensio-actifs, très utilisés, présentent de nombreux avantages : stabilité thermique et physique, action quel que soit le pH, faible toxicité, moins irritants pour la peau.

Les saponines sont d'origine végétale, mais la majorité des surfactifs non ioniques sont d'origine chimique. On peut citer les BRIJS (éthers des polyoxy-éthylènes d'alcools gras), les MRYJS (esters des polyoxyéthylèneglycols et d'acides gras), SPANS ou ARLACELS (esters d'acides gras de sorbitane) et les POLYSORBATES ou TWEENS (esters d'acides gras de polyoxyéthylèneglycols de sorbitane)

Tableau 57 :

Quelques tensio-actifs non ioniques.

1. Liaisons esters**1.1. Esters de glycérol ou de glycols et d'acides gras****1.2. Esters de polyéthylèneglycols****1.3. Esters de sorbitane****2. Liaison éther****2.1 Ether polyoxyéthylèneglycols d'alcools gras****2.2. Ether d'alkyl-aryl gras (C₈, C₉) et de polyoxyéthylèneglycols**

I.4.2.- CHOIX DU MEILLEUR TENSIO-ACTIF

On peut s'attendre à ce que les agents de surface modifient la pénétration de substances antiseptiques dans les germes (271, 301).

Un bon tensio-actif doit être inerte vis-à-vis des germes (dépourvu de toute action inhibitrice ou stimulante sur le développement des germes), neutre vis-à-vis de l'antiseptique (n'avoir aucune interaction chimique avec l'essence) et thermiquement stable (74, 270, 279, 290, 293).

La plupart des auteurs ont utilisé le Tween 80 (74, 270, 279) car il est inerte vis à vis des souches microbiennes utilisées, et qu'il oriente les émulsions dans le sens huile/eau. L'émulsifiant permet une dispersion très fine des huiles essentielles dans la phase aqueuse. Toutefois on a constaté une certaine interaction du tensio-actif avec quelques composés phénoliques (271, 299, 305).

I.5.- CONCLUSION

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques en milieu solide ou liquide.

Il existe dans la littérature une ou plusieurs variantes pour une technique donnée de façon qu'il est difficile de comparer entre eux les résultats obtenus.

Ces différences entre les techniques mises au point sont liées surtout à l'insolubilité des huiles essentielles en milieux aqueux indispensables à la culture et au développement des microorganismes.

La détermination de l'activité bactéricide par diffusion sur gélose est la méthode standardisée en France mais il n'existe pas de méthode officielle pour l'évaluation de l'activité bactériostatique. Les techniques de dispersion des huiles essentielles dans l'eau en utilisant les tensioactifs non ioniques notamment le Tween 80 présente un avantage car elles permettent

de réaliser les émulsions stables et homogènes permettant ainsi un contact intime entre le milieu de culture et les huiles essentielles à tester.

Toutefois certains auteurs préfèrent disperser les huiles essentielles dans l'eau à l'aide de polysaccharides comme l'agar noble particulièrement quand ils sont en présence des huiles riches en composés phénoliques.

II- TRAVAUX PERSONNELS

II.1.- INTRODUCTION

Le Laboratoire de Chimie des Huiles Essentielles et l'Ecole Normale Supérieure de Chimie de l'Université BLAISE PASCAL de Clermont qui nous a accueilli, en collaboration avec la Pharmacie Centrale du CHRU de Clermont-Ferrand ont développé depuis 11 ans environ, une recherche sur la corrélation entre la composition chimique d'huiles essentielles et leurs activités antimicrobiennes.

Les travaux du laboratoire ont particulièrement porté sur l'étude de l'activité d'huiles à chémotypes différents (71, 74), sur l'influence du vieillissement naturel et / ou provoqué par oxygénation d'huiles essentielles (72, 73) et sur une comparaison des méthodes de détermination des CMI mettant soit en jeu le Tween 80 soit l'agar (74). Une publication sur l'activité antimicrobienne de quelques huiles africaines principalement du Cameroun est parue (306).

Dans le cadre de ces travaux, compte tenu de la bonne connaissance des compositions chimiques de quelques huiles béninoises décrites dans notre première partie, nous avons estimé qu'il serait intéressant de tester ces huiles et de comparer nos résultats avec ceux de la littérature.

Nous avons testé les activités antimicrobiennes de sept échantillons d'huiles essentielles avec cinq souches microbiennes dont deux sont à Gram-positif et deux à Gram-négatif et les activités antifongiques avec une souche de champignon. Bien que les résultats obtenus soient loin d'être suffisants, nous espérons qu'ils nous permettront d'avoir un aperçu sur les activités biologiques de quelques essences d'origine béninoise.

La méthode de dilution en série dans les tubes à essai (macrométhode) est considérée jusqu'à présent comme la meilleure méthode mais elle est longue et onéreuse. Nous avons transposé sur microplaque la méthode de dilution en série dans une batterie de tubes à essai mise au point au Laboratoire (74). Nous avons ensuite utilisé la microméthode pour évaluer l'activité antimicrobienne et antifongique des huiles essentielles du Bénin.

Nos tests ont été limités, d'une part, par les quantités d'échantillons, et d'autre part, par les souches de microorganismes mises à notre disposition compte tenu du temps.

II.2.- MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

II.2.1.- MATÉRIEL

- Tubes à essai de 18 ml (bouchon à vis)
- Pipettes Pasteur stériles à usage unique
- Pipettes stériles de 1 ml, 2 ml, 5 ml
- Micropipette automatique de 200 µl et de 500 µl avec embout stérile
- Microplaques stériles
- Agitateur électrique Vortex
- Gélose pour dénombrement et entretien des souches

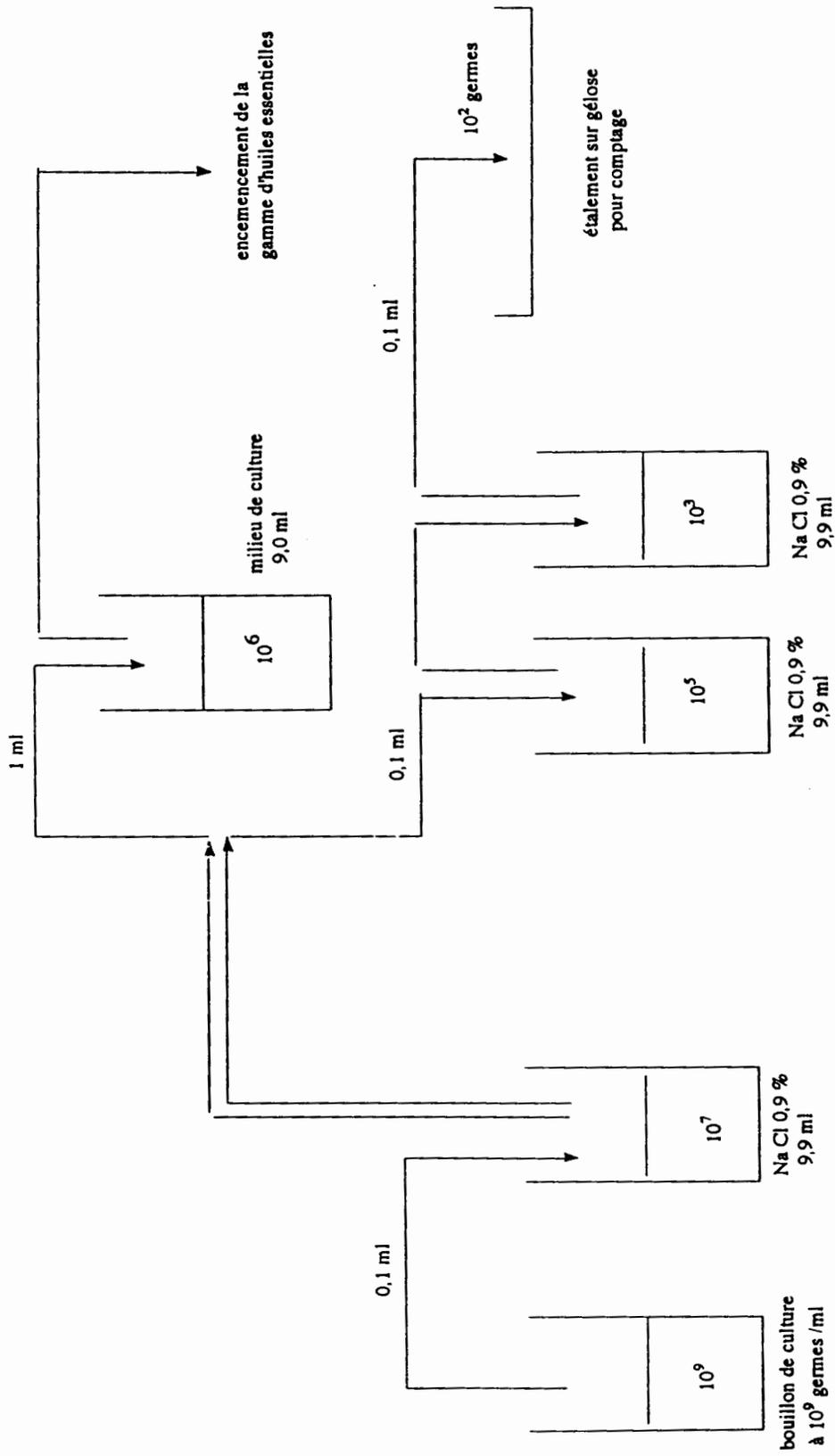
II.2.2.- PRÉPARATION DU MILIEU DE CULTURE

Le milieu Mueller Hinton liquide est préparé à partir de la poudre Pasteur (Réf. 69444) et contient le Rouge de phénol (Réf RAL Codex R 17) à raison de 0,02 g/l. La culture des levures et champignons est effectuée sur Sabouraud liquide.

Pour le comptage des bactéries nous avons utilisé un milieu solide distribué dans de boîtes de Pétri M.H.2 Biomérieux (code 43302) tandis que le milieu Sabouraud solide Gentamicine-Chloramphénicol (Code 43171) est employé pour les champignons. Nous avons réalisé les dilutions pour l'obtention du bouillon de travail et pour le comptage des bactéries et champignons dans l'eau physiologique NaCl (0,9%) (Figure 39)

Obtention du bouillon de travail et entretien des souches

Figure 39



II.2.3.- MISE EN CULTURE DES GERMES

Nous avons traité 5 microorganismes rencontrés couramment dans les pathologies humaines : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, et *Candida albicans*. Les germes de référence ont été commandés à la Collection Nationale de l'Institut Pasteur à Paris (Tableau 58).

A partir d'un tube de conservation, nous avons isolé sur gélose Mueller Hinton le germe à tester par stries avec une öse de platine préalablement portée au rouge sur un bec Bunsen puis refroidie. Après 24 heures à l'étuve à 37° C, nous avons repiqué une colonie isolée dans 9 ml de bouillon de culture Mueller Hinton donnant, après 24 heures et à 37° C dans l'étuve, un bouillon de travail contenant 10^9 germes/ml environ. La culture du *C. albicans* est effectuée dans un milieu Sabouraud liquide à la température ambiante. Les levures sont en phase d'activité optimale après 48 heures à la température ambiante. Le bouillon de culture doit contenir 10^7 germes /ml environ.

II.2.4.- COMPTAGE DU BOUILLON DE TRAVAIL ET ENTRETIEN DES SOUCHES

Nous avons effectué chaque jour un comptage des germes du bouillon de travail pour contrôler la croissance bactérienne en diluant dans un tube à essai, près de la flamme, 0,1 ml du bouillon de culture supposé contenir 10^9 germes par ml, dans 9,9 ml d'eau physiologique stérile (solution aqueuse de NaCl 0,9%). Après agitation, nous avons obtenu une concentration de 10^7 germes/ml environ. Deux autres dilutions successives de ce dernier milieu, dans des conditions identiques conduisent à l'obtention d'un bouillon à 103 germes/ml. Nous avonsensemencé 0,1 ml de cette dernière dilution à la surface d'une gélose Mueller Hinton, par râteau, avec une pipette pasteur coudée à la flamme. Après 24 heures d'incubation à 37 ° C, cette gélose-témoin contiendra 100 colonies d'aspect uniforme s'il n y a pas eu contamination avec un autre germe.

Le bouillon à 107 germes par millilitre a été dilué dans le bouillon de culture de façon à obtenir 10 ml d'inoculum à 106 germes/ml utilisé pour tester l'activité antimicrobienne de nos huiles (Figure 39).

Le comptage atteste la bonne vitalité de la souche, de son absence de contamination par un autre germe. Le nombre de colonies dénombré sur gélose-témoin doit être proche de 100.

Tableau 58

Microorganismes testés et aspects des colonies

Microorganismes	Aspects des colonies après 24 heures d'incubation
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144 (G ⁺)	Petites colonies d'un mm environ de diamètre, Devenant jaune-or après 48 heures d'incubation.
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 5262 (G ⁺)	Petites colonies d'un mm environ de diamètre, devenant jaune-brillants.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 (G ⁻)	Colonies énormes de 3 à 4 mm de diamètre, Bombées, tendant à la confluence.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (G ⁻)	Colonies jaune-brillants de 2 à 3mm de diamètre.
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (levure)	Très petites colonies blanches.

II.2.5.- PRÉPARATION D'ÉMULSIONS D'HUILES ESSENTIELLES ET RÉALISATION D'UNE RECHERCHE DES CMI

Nous avons obtenu des solutions-mères en agitant 40 ml de chaque huile essentielle à tester dans un tube contenant 2 ml de bouillon de culture Mueller Hinton et une petite goutte de Tween 80 prélevé à la pipette Pasteur, sur un agitateur électrique Vortex. (Le Tween 80 est trop visqueux pour prélever 10 ml nécessaire à la préparation de l'émulsion). Les solutions sont bien homogénéisées avant chaque utilisation.

Sur microplaque à 96 puits, nous avons réalisé des gammes de concentrations décroissantes, de raison 2, pour chaque solution-mère, en répartissant dans toutes les cupules 100 ml de bouillon de culture Mueller Hinton contenant le rouge de phénol sauf dans la

première colonne. Nous avons ensuite ajouté 100 ml de solution-mère d'huile dans chacune des cupules de la première et de la deuxième colonne à raison d'une huile par rangée. Le bouillon de culture du premier puits de la colonne avait alors 10 mg/ml d'huile essentielle tandis que le second en contenait 5 mg/ml.

Nous avons enfin réalisé les dilutions successives avec un distributeur automatique, de puits en puits, rangée par rangée, en prélevant 100 ml de la deuxième cupule que nous avons introduite dans la troisième cupule, et ainsi de suite de cupule en cupule de façon à avoir une série géométrique de dilutions de raison 2. Nous avons réalisé ainsi une série de dilutions allant de 10 mg/ml à 0,07 mg/ml (Figure 40). Une homogénéisation de la solution est effectuée à chaque mélange en aspirant une partie et la réintroduisant dans la cupule par une micropipette à embout stérile.

L'ensemencement, avec un distributeur automatique stérile, de toutes les cupules est réalisé avec 100 ml d'un inoculum possédant 10^6 germes/ml environ.

Nous avons couvert la microplaque avec un tampon adhésif transparent bien étanche et nous avons effectué les lectures après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37°C pour les bactéries et à la température ambiante pour le *C. albicans*. Sept échantillons d'huile essentielle ont été étudiés. Pour chacune des huiles essentielles, nous avons effectué 11 essais en réalisant pour chacune une nouvelle solution-mère.

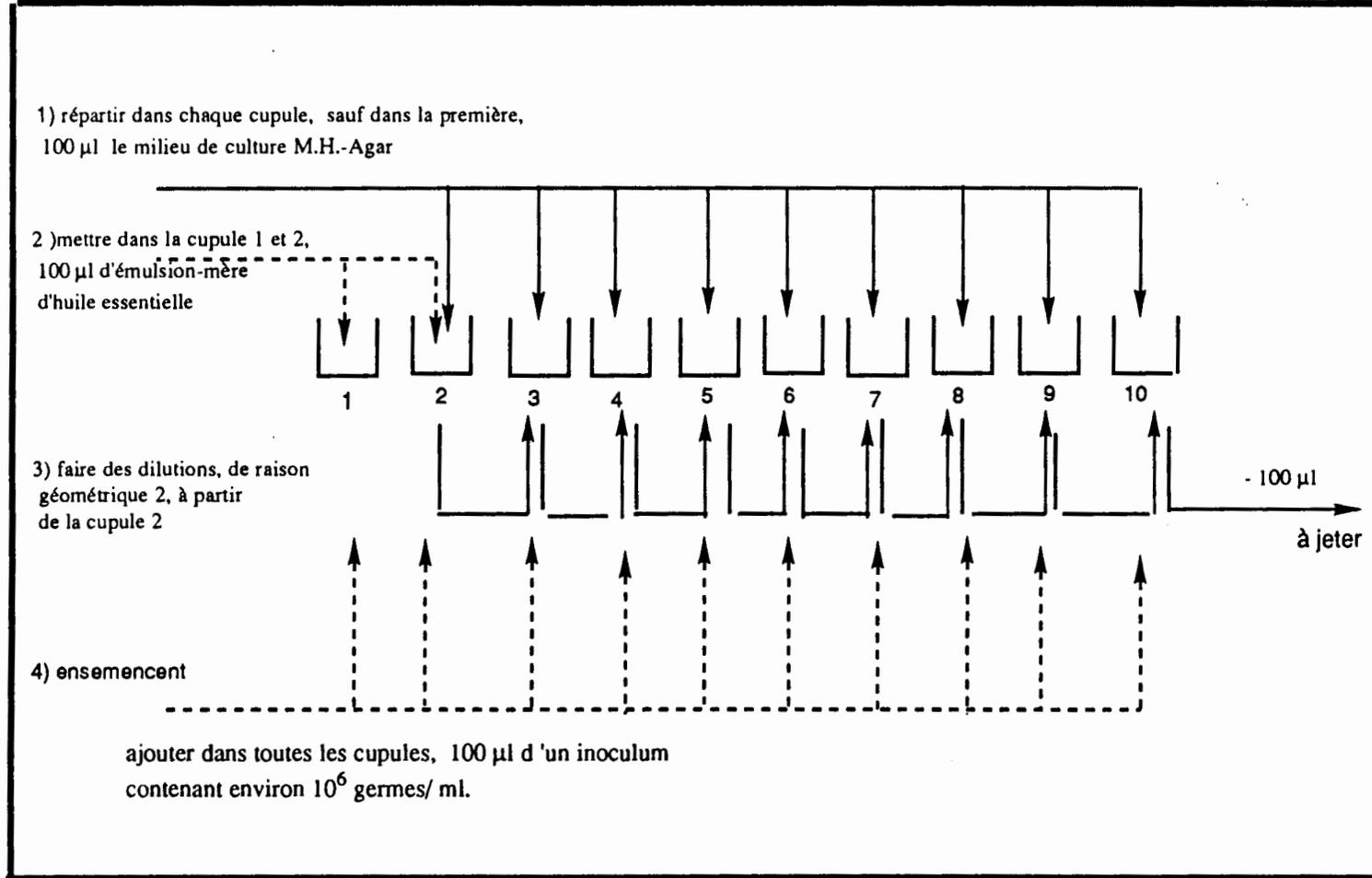
Le protocole est identique pour l'étude de l'action des huiles essentielles vis à vis de *C. albicans* (levure) réalisée avec un bouillon de culture Sabouraud. Les lectures se font après 48 heures d'incubation à la température de la pièce.

Toutes les opérations sont effectuées dans un rayon de 20 cm autour d'un bec Bensen. Pour éviter les effets de synergie ou de mélange des solutions, nous avons laissé une rangée vide entre les rangées de cupules-tests.

L'obtention d'une couleur jaune ou orangée signifie qu'il y a eu une croissance microbienne. Le maintien de la couleur rouge initiale signifie une absence de croissance de microorganisme.

Figure 40

Microméthode de détermination de CMI des huiles essentielles



Pour les champignons, où le rouge de phénol ne présente pas de virage, nous avons effectué la lecture par appréciation du trouble du milieu ou d'un dépôt. L'obtention du trouble ou d'un dépôt dans une cupule signifie qu'il y a croissance, le maintien de la limpidité initiale indique l'inhibition des microorganismes. La méthode donne de bons résultats avec *C. albicans*.

II-5-6- COMPARAISON DE LA MICROMÉTHODE UTILISÉE AVEC LES TECHNIQUES RÉCENTES DE DÉTERMINATION DE CMI

Notre méthode diffère de celle de VENDEVILLE et Coll (300) par le fait que nous ensemençons en dernier lieu les cupules sur microplaques et que nous mélangeons les quantités égales de bouillons de culture et de solutions d'antiseptiques. La différence fondamentale réside en ce que nous ajoutons l'inoculum en dernier lieu, ce qui évite à l'opérateur de manipuler plus longtemps les microorganismes, qui peuvent être pathogènes au cours des dilutions successives. Toutefois, le mode de dilution est identique ; les lectures sont faites de façon visuelle. L'expérience a montré que la présence d'air (l'absence d'étanchéité) fait virer l'indicateur coloré au rouge tandis qu'une durée supérieure à 24 heures peut induire des colorations des dilutions positives du jaune ou du jaune-orangé au rouge framboise comme l'avait observé l'équipe de VENDEVILLE. Les témoins négatifs et positifs peuvent être aussi réalisés dans notre méthode.

Notre technique diffère de celle de LENS-LISBONNE et Coll. (271, 299) d'une part, par les milieux de culture utilisés et la technique de dilution mis en œuvre, d'autre part, par la méthode de visualisation des résultats. Nos méthodes de dilution et de lecture des résultats sont plus simples et les durées d'incubation utilisées permettent un aménagement horaire plus souple.

La microméthode présente des avantages certains par rapport à la macrométhode pour le screening des huiles essentielles nouvelles, par la diminution du coût de l'opération et du temps d'analyse.

II-3- RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Le tableau 60 présente les résultats des CMI des huiles essentielles testées.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration de la première cupule présentant un virage de l'indicateur coloré, plus la valeur de CMI est élevée, moins l'essence est active ; par contre, les valeurs les plus faibles de CMI sont affectées aux essences les plus actives.

Pour mieux apprécier les activités des essences et pour pouvoir les comparer entre elles, nous avons dû imaginer une technique d'évaluation de l'activité des essences. Nous avons traduit les valeurs des CMI en essayant de les quantifier. La note "0" est attribuée à une essence qui est inactive à la concentration de 10 mg/ml (CMI > 10), la note "1" à une essence active à la dose de 10 mg/ml mais inactive à 5 mg/ml (CMI = 10), ainsi de suite en suivant une progression arithmétique de raison 1.

Le tableau de correspondance entre CMI et la note de quantification attribuée est donnée ci-dessous (tableau 59).

Tableau 59:

Quantification des valeurs des CMI.

CMI (mg/ml)	> 10	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625
Notes	0	1	2	3	4	5	6	7

Pour chaque huile essentielle, en faisant la somme des valeurs affectées aux CMI, nous avons un nombre (n) indiquant l'activité de l'essence. Ensuite, l'activité moyenne (m) de l'essence est obtenue en divisant la valeur de n par le nombre total de microorganismes testés. Les valeurs de n et m sont indiquées dans le tableau 60.

Tableau 60 :

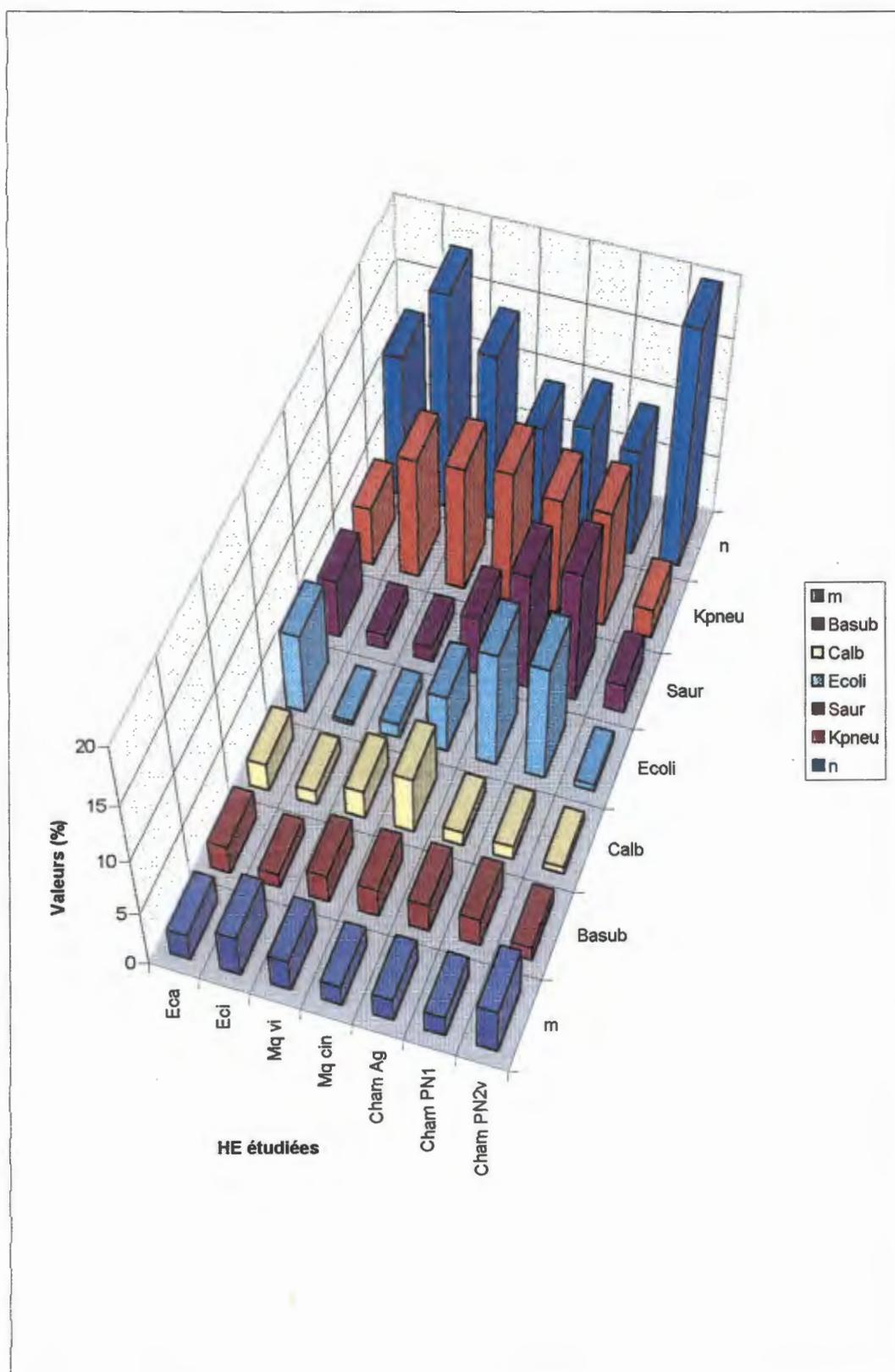
Concentrations minimales inhibitrices (CMI en mg/ml) de quelques huiles essentielles d'origine béninoise sur certains microorganismes après 11 essais.

Germes testés	Huiles essentielles étudiées							Sensibilité des germes
	Eca	Eci	Mq vi	Mq cin	Cham Ag	Cham PN1	Cham PN2v	
<i>Staphylococcus aureus</i> (Saur)	5	1,25	1,25	5	10	>10	2,50	16
<i>Bacillus subtilis</i> (Basub)	2,50	1,25	2,50	2,50	2,5	2,50	1,25	23
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Kpneu)	5	>10	>10	>10	10	10	2,50	7
<i>Escherichia coli</i> (Ecoli)	5	0,3125	1,25	5	10	10	0,625	21
<i>Candida albicans</i> (Calb)	2,50	1,25	2,50	5	1,25	1,25	0,625	25
Activité des essences n	12	18	14	9	10	9	20	-
Activité moyenne m	2,4	3,6	2,8	1,8	2	1,8	4	-

Eca = *Eucalyptus camadulensis*; Cham PN1 = *Chenopodium ambrosioides* (Porto-Novo) Eci = *Eucalyptus citriodora*; Cham PN2v = *Chenopodium ambrosioides* (Porto-Novo) vieillie
Mq vi = *Melaleuca quinquenervia* à viridiflorol; Mq cin = *Melaleuca quinquenervia* à 1,8-cinéole;
Cham Ag = *Chenopodium ambrosioides* (Agonvy)

L'observation du tableau 60 et du graphe 31 montre que la sensibilité des microorganismes aux huiles essentielles diffère d'un germe à un autre de même que l'activité des essences testées.

Grphe 31: Histogramme des concentrations minimales inhibitrices (CMI en mg/ml) de quelques huiles essentielles d'origine béninoise sur certains microorganismes après 11 essais



II-3-1- MICROORGANISMES TESTÉS VIS-A-VIS DES HUILES ESSENTIELLES

II-3-1-1- CAS DES BACTÉRIES

En faisant la somme horizontale des notes affectées aux CMI, on obtient une valeur indiquant la sensibilité de chaque souche microbienne à l'ensemble des essences (tableau 60).

Les résultats obtenus montrent que, en général, les bactéries à Gram-positif sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram-négatif (pour les bactéries à Gram-positif $\Sigma n = 39$ et $\Sigma m = 19,5$; pour les bactéries à Gram-négatif $\Sigma n = 28$ et $\Sigma m = 14$). Cette remarque a été déjà faite par GYSELINCK (307), DEGTYAR'OVA et coll. (308) et RODINA (309). Dans notre cas, nous constatons que l'activité des essences vis-à-vis des bactéries à gram-positif est environ une fois et demi plus grande que l'activité envers les bactéries à Gram-négatif.

Pour cela, il nous a alors paru utile de rappeler brièvement les différences entre les bactéries à Gram-positif et les bactéries à Gram-négatif, étant donné leurs différences de sensibilité vis-à-vis des essences.

Les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif se différencient par la nature de leur paroi cellulaire : les bactéries à Gram-négatif ont une paroi relativement épaisse, 50 à 150 millimicrons (310), ayant un aspect homogène ; cette paroi est en majeure partie constituée par de la muréine (peptidoglycane 40 à 90%) et de l'acide teichoïque (polysaccharide phosphorylé). Ces deux composants sont intimement mêlés et forment apparemment une couche mince. C'est ainsi que les bactéries à Gram-négatif ont une paroi épaisse qui ne laisse pas l'alcool traverser pour solubiliser le complexe colorant de la coloration de Gram.

Chez les bactéries à Gram-positif, la paroi est plus fine (10 à 15 millimicrons), mais elle apparaît recouverte d'une couche trilamellaire appelée "enveloppe externe" (9 à 13 millimicrons). Cette couche est composée essentiellement de protéines, de lipides et de lipopolysaccharides. C'est grâce à leur paroi mince que les bactéries à Gram-positif se laissent pénétrer par l'alcool dans lequel est dissout le complexe colorant de la coloration de Gram.

Alors que les deux souches de bactéries à Gram-positif sont toutes sensibles, à des degrés divers, aux huiles essentielles, une seule à Gram-négatif l'est (*Escherichia coli*).

La plus forte inhibition s'exerce vis-à-vis de *Bacillus subtilis* avec une valeur de CMI au moins égale à 2,50 mg/ml pour toutes les essences testées suivie de *Escherichia coli* qui est sensible par ordre décroissant aux essences d'*E. citriodora*, *C. ambrosioides* de Porto-Novo vieillie, *M. quinquenervia* à viridiflorol avec des valeurs de CMI respectivement égales à: 0,3125 mg/ml, 0,625 mg/ml et 1,25 mg/ml. *Staphylococcus aureus* vient en troisième position avec une sensibilité égale vis-à-vis d'*E. citriodora* et *M. quinquenervia* à viridiflorol à une CMI égale à 1,25 mg/ml et vis-à-vis de *C. ambrosioides* de Porto-Novo vieillie (CMI = 2,50 mg/ml), l'huile de *C. ambrosioides* de Porto-Novo non vieillie ne donne pas d'activité même à une concentration de 10 mg/ml

La plus résistante de toutes les souches de bactéries est *Klebsiella pneumonia*, bactérie à Gram-négatif, seulement sensible à l'huile essentielle de *C. ambrosioides* de Porto-Novo vieillie (CMI = 2,50 mg/ml) suivie de celle d'*E. camaldulensis* avec une CMI de 5 mg/ml. A une concentration de 10 mg/ml, les huiles essentielles d'*E. citriodora*, *M. quinquenervia* à viridiflorol et à 1,8-cinéole n'ont aucune activité sur *Klebsiella pneumonia*.

II-3-1-2- CAS DE LA LEVURE

La seule levure testée, faute de souches suffisantes, est *Candida albicans* dont la croissance est inhibée par toutes nos huiles essentielles avec une valeur de CMI au moins égale à 2,50 mg/ml exceptée l'essence de *M. quinquenervia* à 1,8-cinéole (CMI = 5 mg/ml). Le meilleur résultat est obtenu avec l'huile de *C. ambrosioides* de Porto-Novo vieillie (CMI = 0,625 mg/ml) suivie, à valeur égale de CMI (1,25 mg/ml) des essences de *E. citriodora*, *C. ambrosioides* de Agony et de Porto-Novo, ensuite viennent les huiles essentielles de *M. quinquenervia* à viridiflorol et d'*E. camaldulensis* (CMI = 2,50 mg/ml).

II-3-2- LES HUILES ESSENTIELLES ÉTUDIÉES : CORRÉLATION ENTRE ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE ET COMPOSITION CHIMIQUE

On peut bien penser que l'activité biologique d'une huile essentielle dépend de la nature des composés chimiques qu'elle contient.

Certaines huiles essentielles sont celles de la première partie de cette thèse ou analysées dans les mêmes conditions, afin de déterminer leurs compositions chimiques.

Pour pouvoir mieux comparer les activités biologiques de nos essences, nous avons indiqué pour chaque essence ses principaux constituants et son activité moyenne m dans le tableau 61; nous avons classé les huiles essentielles par ordre décroissant de la valeur de m .

Nous remarquons que les essences testées n'ont pas de ressemblance chimique. Certaines sont riches en 1,8-cinéole (*E.camaldulensis* et *M.quinquenervia* à 1,8-cinéole), d'autres en paracymène et en oxyde d'ascaridol (les échantillons de *Chenopodium ambrosioides*), *E.citriodora* en citronellal, *M. quinquenervia* à viridiflorol en viridiflorol et *Chenopodium ambrosioides* vieillie en ascaridol.

D'après PRAKASH et coll. (311), le 1,8-cinéole est actif contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escheichia coli*. En ce qui concerne nos essences, les deux qui sont riches en 1,8-cinéole présentent les mêmes activités contre ces trois souches. (CMI respectivement de 5; 2,5 et 5mg/ml).

Par contre, on constate que l'essence de *M. quinquenervia* à 1,8-cinéole s'est révélée faiblement active contre *Candida albicans* (CMI = 5mg/ml) et inactive contre *Klebsiella pneumoniae* (CMI > 10mg/ml). Il est possible que dans ce cas, la présence d'un ou plusieurs composants de l'essence inhibe l'activité antimicrobienne; ceci pourrait être le cas des composés non oxygénés de cette huile comme l' α et de β -pinène. L'activité de *E. camaldulensis* par rapport à celle de *M. quinquenervia* à 1,8-cinéole sur ces deux souches peut être due à une contribution des composés tels que α -terpinéol et globulol. Toutefois, avant toute confirmation, il faudra tester l'activité individuelle de chacun de ces produits.

Tableau 61:

Principaux constituants des huiles essentielles testées biologiquement

<i>Eucalyptus citriodora</i>		<i>M. Quinquenervia</i> à viridiflorol	
Constituants	Pourcentages	Constituants	Pourcentages
Citronellal	67,55	α -pinène	1,26
Néoisopulégol	4,45	limonène	1,5
Isopulégol	9,74	1,8-cinéole	12,4
Acétate de citronellyle	2,42	α-terpinéol	9,4
Citronellol	3,68	oxyde de trans caryophyllène	1,34
Méthyleugénol	2,86	lédol	3,6
		viridiflorol	51,0
<u>Total</u>	90,7	<u>Total</u>	80,4
Composés oxygénés	90,7	Composés oxygénés	77,64
Composés non oxygénés	00	Composés non oxygénés	2,76
Activité moyenne m	3,6	Activité moyenne m	2,8

<i>Eucalyptus camaldulensis</i>		<i>Chenopodium ambrosioides</i> (AGONVY)	
Constituants	Pourcentages	Constituants	Pourcentages
α -pinène	3,16	γ -terpinène	2,6
β -pinène	1,65	p-cymène	43,4
limonène	1,94	<u>cis ascaridol</u>	<u>3,1</u>
1,8-cinéole	70,42	oxyde d'ascaridol	27,4
<u>p-cymène</u>	<u>4,92</u>	<u>trans ascaridol</u>	<u>4,5</u>
α -terpinéol	1,53	élémol	3,4
globulol	1,08	spathuléol	1,1
		1,3-oxyde d'épimanoyle	1,03
<u>Total</u>	84,7	<u>Total</u>	86,53
Composés oxygénés	73,03	Composés oxygénés	40,53
Composés non oxygénés	11,67	Composés non oxygénés	46,0
Activité moyenne m	2,4	Activité moyenne m	2

<i>M. Quinquenervia</i> à 1,8-cinéole		<i>Chenopodium ambrosioides</i> (PORTO-NOVO)		
Constituants	pourcentages	Constituants	non vieillie	vieillie
α -pinène	7,8	α -terpinène	44,4	0,05
β -pinène	2,70	p-cymène	20,67	30,90
myrcène	1,62	cis-ascaridol	0,40	39,08
limonène	8,38	oxyde d'ascaridol	19,03	4,50
1,8-cinéole	50,66	trans-ascaridol	8,26	13,20
γ -terpinène	1,16	<u>élémol</u>	<u>0,88</u>	<u>11,12</u>
terpinèn-4-ol	1,6	spathuléol	0,86	
alloaromadendrène	1,12	1,3-oxyde d'épimanoyle	0,13	
α-terpinéol	11,03			
spathuléol	1,77			
viridiflorol	6,28			
<u>Total</u>	93,94	<u>Total</u>	94,63	98,85
Composés oxygénés	71,34	Composés oxygénés	29,56	67,9
Composés non oxygénés	22,60	Composés non oxygénés	65,07	30,95
Activité moyenne m	1,8	Activité moyenne m	1,8	4

L'essence de *E. citriodora* présente, parmi les essences non vieilles, la plus grande activité probablement grâce à sa haute teneur en aldéhyde (67,55% de citronellal), en alcools (isopulégol 9,74%, néoisopulégol 4,45%, citronellol 3,68% et méthyleugénol 2,86%), et en acétate de citronellyl (2,42%) ; encore que l'on n'a pas déterminé la CMI du citronellal. Conformément aux résultats déjà signalés par ADAMES et coll. (312) et BEYLIER (313) notre essence est active contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (même CMI = 1,25mg/ml), et remarquablement contre *Escherichia coli* ATCC 10536 (bactérie à Gram-) (CMI = 0,3125mg/ml). Paradoxalement cette huile a été inactive contre *Klebsiella pneumoniae* (CMI > 10mg/ml). Ensuite vient l'huile essentielle de *M. quinquenervia* à viridiflorol riche en composés oxygénés (77,64%) dont viridiflorol (51,0%), 1,8-cinéole (12,4%), α -terpinéol (9,4%) et lédol (3,6%).

L'échantillon de *Chenopodium ambrosioides* récolté à Agonvy, quoique riche en p-cymène (43,4%) et en oxyde d'ascaridol (27,4%), se classe en 4^{ème} position. Enfin, celui récolté à Porto-Novo, également riche en ces deux produits (respectivement 20,67 et 19,03%) précédé d' α -terpinène (44,4%), est l'essence la moins active. Il ressort de ces observations que le p-cymène est moins actif et l' α -terpinène beaucoup moins actif ; comme l'oxyde d'ascaridol est un nouveau, nous ne pourrions pas encore nous prononcer sur son activité.

Quant aux activités antifongiques, toutes nos essences se sont révélées actives contre le seul champignon testé. *E. citriodora* et les échantillons de *Chenopodium ambrosioides* se révèlent les plus actifs (mêmes CMI = 1,25mg/ml) avec leur teneur en citronella, (67,55%) et en l'oxyde d'ascaridol (27,4 et 19,03%). D'après MARUZZELLA et coll.(314), le citronellal et le citronellol sont actifs contre les champignons. Ce résultat est également conforme aux travaux de KABARA qui souligne l'activité du p-cymène contre les champignons. Sous réserve d'une vérification ultérieure, nous pouvons supposer que l'oxyde d'ascaridol est aussi active contre les champignons.

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* vieillie, est la plus active de toutes les huiles essentielles étudiées. Elle présente une bonne activité (CMI = 2,50mg/ml) contre *Klebsiella pneumoniae* (bactérie Gram-) qui est la plus résistante de toutes les bactéries testées, suivie de l'essence de *E. camaldulensis* (CMI = 5mg/ml). Cette forte activité est probablement due à sa teneur élevée en ascaridol (52,28%).

Il apparaît donc que le vieillissement des huiles améliore sûrement leurs propriétés biologiques.

II-4- CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent que, en général, nos huiles essentielles manifestent une activité quasiment égale contre toutes les souches testées. Toutefois, comme pour l'activité antimicrobienne, le degré d'activité antifongique varie aussi suivant les échantillons d'huiles essentielles. Nous avons remarqué aussi que les essences actives contre les bactéries le sont aussi contre *Candida albicans*. *Staphylococcus aureus* (Gram+) se révèle être la bactérie la plus sensible et *Klebsiella pneumoniae* (Gram-) la plus résistante.

E. citriodora est l'huile essentielle la plus active des huiles essentielles non vieilles testées et celle de *Chenopodium ambrosioides* de Porto-Novo la moins active.

Le vieillissement des huiles améliore sûrement leurs propriétés biologiques; c'est le cas de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Porto-Novo vieillie.

Ces huiles essentielles étudiées ont donc une action antibactérienne et antifongique, par conséquent un champ d'action très large et peuvent jouer un rôle de conservateur et d'antiseptique dans le domaine de la cosmétologie. Elles peuvent être d'un grand intérêt dans la phytothérapie humaine et animale.

Ces résultats sont évidemment incomplets. Il faudra étendre les tests sur un plus grand nombre d'essences, avec plusieurs souches de bactéries et de champignons, et surtout, disposer des activités biologiques des principaux constituants des huiles essentielles.

TROISIÈME PARTIE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I- MATÉRIEL VÉGÉTAL ET EXTRACTION

I-1- LE MATÉRIEL VÉGÉTAL

I-1-1- LES PLANTES ETUDIÉES

Nos propres travaux portent sur les extractions et les analyses des huiles essentielles issues de deux familles, trois genres et sept espèces de plantes aromatiques du Bénin (tableau 62).

Tableau 62 :
Les plantes étudiées

Familles	Genres	Espèces
Myrtacées	<i>Eucalyptus</i>	<i>Camaldulensis</i> <i>citrodora</i> <i>globulus</i> <i>tereticornis</i> <i>torelliana</i>
	<i>Melaleuca</i>	<i>quinquenervia</i>
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium</i>	<i>ambrosioides</i>

Introduits au Bénin vers les années 1960, les Eucalyptus ont été plantés à des fins économiques mais aussi pour la conservation des sols et en particulier pour la production de bois de feu et de charbon de bois pour les villes.

Leurs feuilles qui n'ont pas fait l'objet d'étude exhaustive ne sont destinées à aucune exploitation industrielle. Seule une partie de la population indigène les connaît, dans la

pharmacopée, sous le nom «d'arbre contre la toux» (Kpen tin en langues nationales goun et fon).

Parmi la dizaine d'espèces environ implantées au Bénin, cinq ont fait l'objet de notre étude.

Melaleuca quinquenervia, quant à lui, a été introduit au Bénin vers les années 1942 en vue de l'assèchement des plaines inondables de la rive méridionale du lac Nokoué et la stabilisation des bas-fonds mouvants de part et d'autre de l'axe routier Sèmè-Podji, Porto-Novo.

Il y a quelques années, le peuplement s'étendait sur plus de 30 ha. Il a été l'objet d'une destruction systématique par les paysans et les pêcheurs de la région et ne subsiste aujourd'hui que sous forme de 3 zones de faibles densités

Cette seule espèce (dont ignore l'origine des semences, faute d'archives) est aussi connue sous le nom de Niaouli. Une infirme partie de la population le désigne par «petites feuilles contre la toux» (Kpen ma sin fini fini) en raison des propriétés antitussives qu'elle lui reconnaît.

Enfin, *Chenopodium ambrosioides* est une petite plante introduite au Bénin à une date inconnue. Elle se rencontre, de nos jours, sous tous les tropiques en saison des pluies, surtout près des lieux habités et dans certains jardins. Cette espèce est très répandue au Bénin.

I-1-2- ÉCHANTILLONS ET SITES DE RÉCOLTE

Nos études ont porté essentiellement sur les feuilles. Ainsi, toutes espèces confondues, nous avons analysé 422 échantillons d'huiles essentielles provenant de 17 sites (voir carte) dont le détail est consigné dans le tableau 63.

Pour *Melaleuca quinquenervia*, 322 échantillons d'huiles essentielles ont été analysées. 300 sont issus de 4 récoltes sur 75 pieds d'arbres pris au hasard dans le peuplement à raison de 25 arbres par zone de *Melaleuca*.

Pour le genre *Eucalyptus*, la répartition par espèce des échantillons analysés se présente comme suit :

Eucalyptus camaldulensis, 40 échantillons,

Eucalyptus citriodora, 42 échantillons,

Eucalyptus globulus, 2 échantillons,

Eucalyptus tereticornis, 3 échantillons,

Eucalyptus torelliana, 3 échantillons,

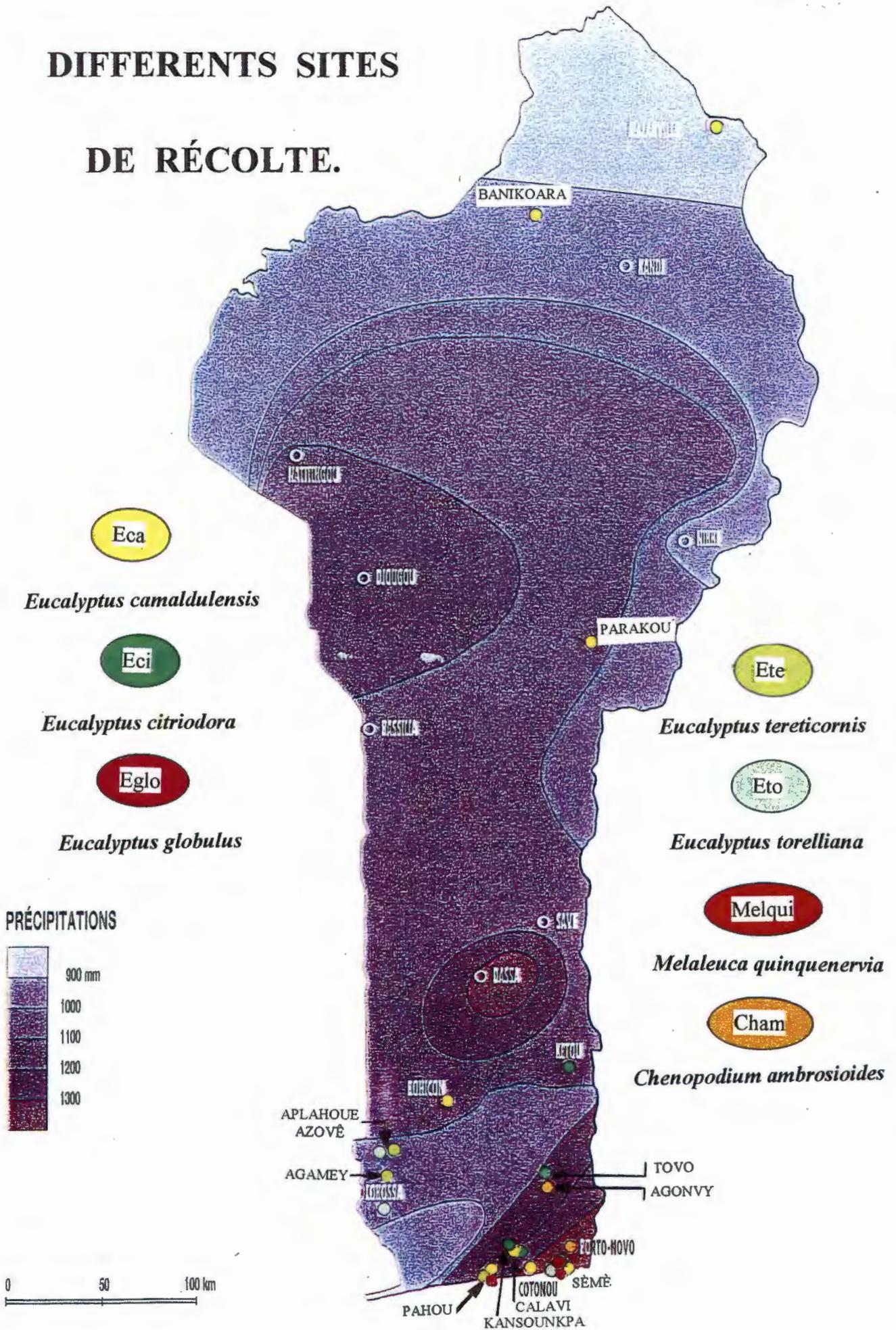
et enfin, *Chenopodium ambrosioides*, 10 échantillons.

Tableau 63 :

Sites de récolte et échantillons

Plantes	Sites	Echantillons	
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Sèmè	12	40
	Cotonou	06	
	Pahou	06	
	Calavi	12	
	Bohicon	01	
	Parakou	01	
	Banikoara	01	
	Malanville	01	
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Kétou	12	42
		06	
	Bonou-Tovo	12	
	Calavi	12	
	Kansoukpa		
<i>Eucalyptus globulus</i>	Pahou	01	02
	Sèmè	01	
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Pahou	01	03
	Agamey	01	
	Aplahoué-Azové	01	
<i>Eucalyptus torelliana</i>	Sèmè	01	03
	Lokossa	01	
	Aplahoué-Azové	01	
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Axe routier	25 x 4 x 3	322
	Sèmè-Porto-Novo	+12+10	
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Bonou-Agonvy	04	10
	Porto-novo	04	
		+2	

DIFFERENTS SITES DE RÉCOLTE.



I-1-3- LES RÉCOLTES

Les feuilles sont prélevées sur plusieurs individus appartenant à la même espèce pour un site donné. Les échantillons sont mélangés et ramenés au laboratoire pour extraction des feuilles.

Les feuilles récoltées sont souvent issues d'individus adultes (c'est-à-dire, d'arbres ayant présenté au moins une fois la floraison) pour les *Eucalyptus* et le *Melaleuca* et quelque fois d'individus jeunes et/ou intermédiaires pour seulement les espèces *camaldulensis* et *citriodora*. Pour le *Chenopodium*, les plantes ont au moins 2 mois d'âge et 6 au plus avant toute récolte.

1°- Des récoltes périodiques sont effectuées :

* Pour *Eucalyptus camaldulensis*,

- à Cotonou, tous les 2 mois depuis que les arbres ont 3 mois d'âge après la mise sous terre ; les récoltes sont regroupées par saison.

- à Pahou, 3 en saisons pluvieuses (2 pendant la grande et 1 pendant la petite) et 3 en saisons sèches (2 dans la grande et 1 dans la petite) intercalées de 2 mois.

* Pour *Eucalyptus citriodora*,

- à Kansoukpa, tous les 2 mois depuis que les arbres ont 6 mois d'âge après la mise en terre. Les récoltes sont aussi regroupées par saison.

- à Bonou-Tovo, des récoltes à périodicité identique à celle de Pahou.

* Pour *Melaleuca quinquenervia*,

4 récoltes espacées de 3 mois, chacune s'effectuant dans chaque saison.

* Pour *Chenopodium ambrosioides*,

4 récoltes en une seule saison des pluies et 4 récoltes en une seule saison sèche.

2°- Des récoltes mensuelles ont aussi eu lieu :

Eucalyptus camaldulensis, Calavi et Sèmè,

Eucalyptus citriodora, Calavi et Kétou,

Melaleuca quinquenervia, Sèmè.

Enfin, des récoltes sans périodicité ont eu lieu pour les autres espèces d'*Eucalyptus* (*globulus*, *tereticornis* et *torelliana*).

I-2- EXTRACTIONS DES HUILES ESSENTIELLES

Toutes les extractions sont effectuées au Laboratoire de Chimie des Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales de la faculté des Sciences et Techniques de l'Université Nationale du Bénin.

Elles sont faites par hydrodistillation avec un appareil de type Clavenger (figure 41a), les huiles obtenues sont séchées sur le sulfate de sodium ; ou par l'entraînement à la vapeur d'eau bouillante (figure 41b). Cette dernière méthode paraît être la meilleure car les huiles obtenues sont pures et limpides.

Les feuilles sont extraites fraîches le même jour de la récolte ou le lendemain au plus tard (après avoir été conservées au frais) ou séchées à l'ombre au laboratoire entre 3 et 14 jours selon l'espèce.

La masse des feuilles extraites varie de 50 à 200 g selon l'état des feuilles et l'objectif visé et quelques fois à 500 g.

La durée de chaque extraction varie de 120 min à 360 min selon l'objectif visé

II- ANALYSES ET SÉPARATION

II-1- LES ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES

Les méthodes d'analyse que nous avons utilisées sont :

- 1°- la chromatographie en phase gazeuse (CPG),
- 2°- la chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CPG/SM)
- 3°- la résonance magnétique nucléaire de l'hydrogène-1 et du carbone-13

Figure 41a :

Hydrodistillation avec extracteur en verre de type Clavenger

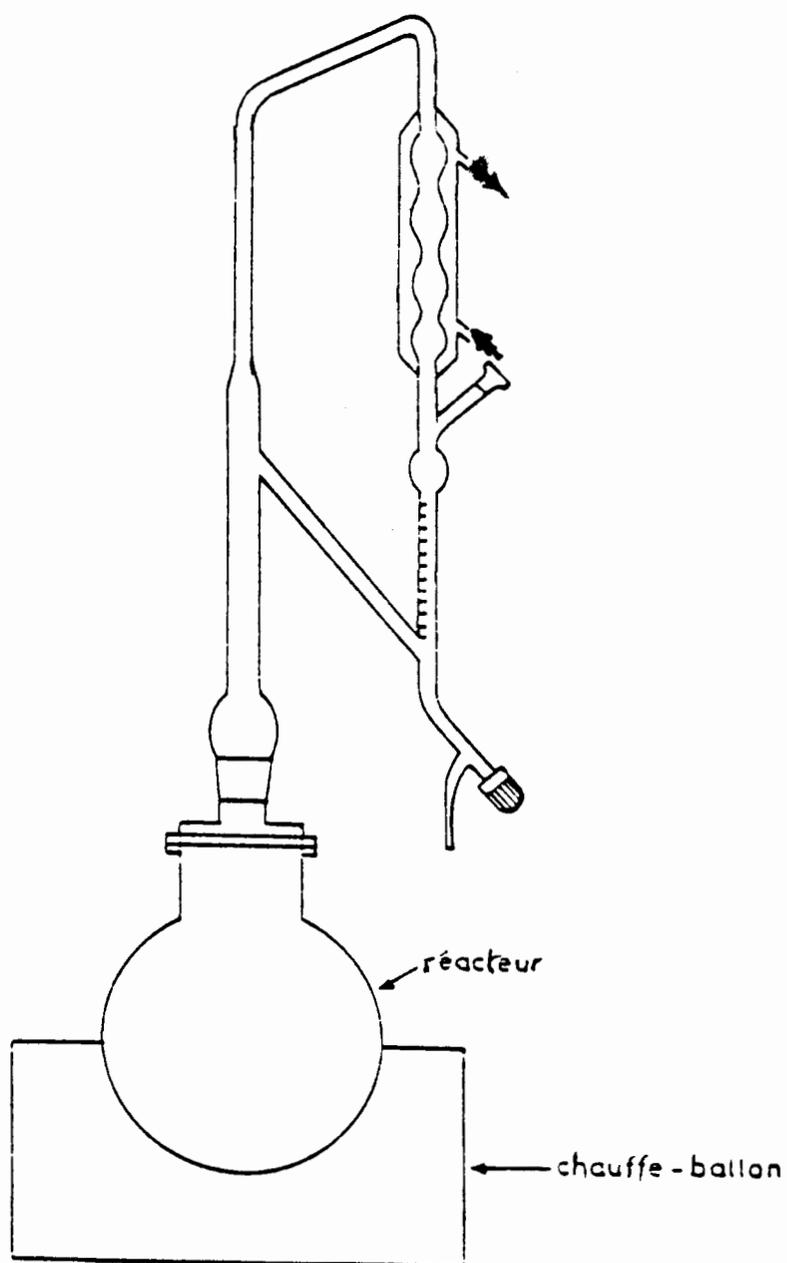
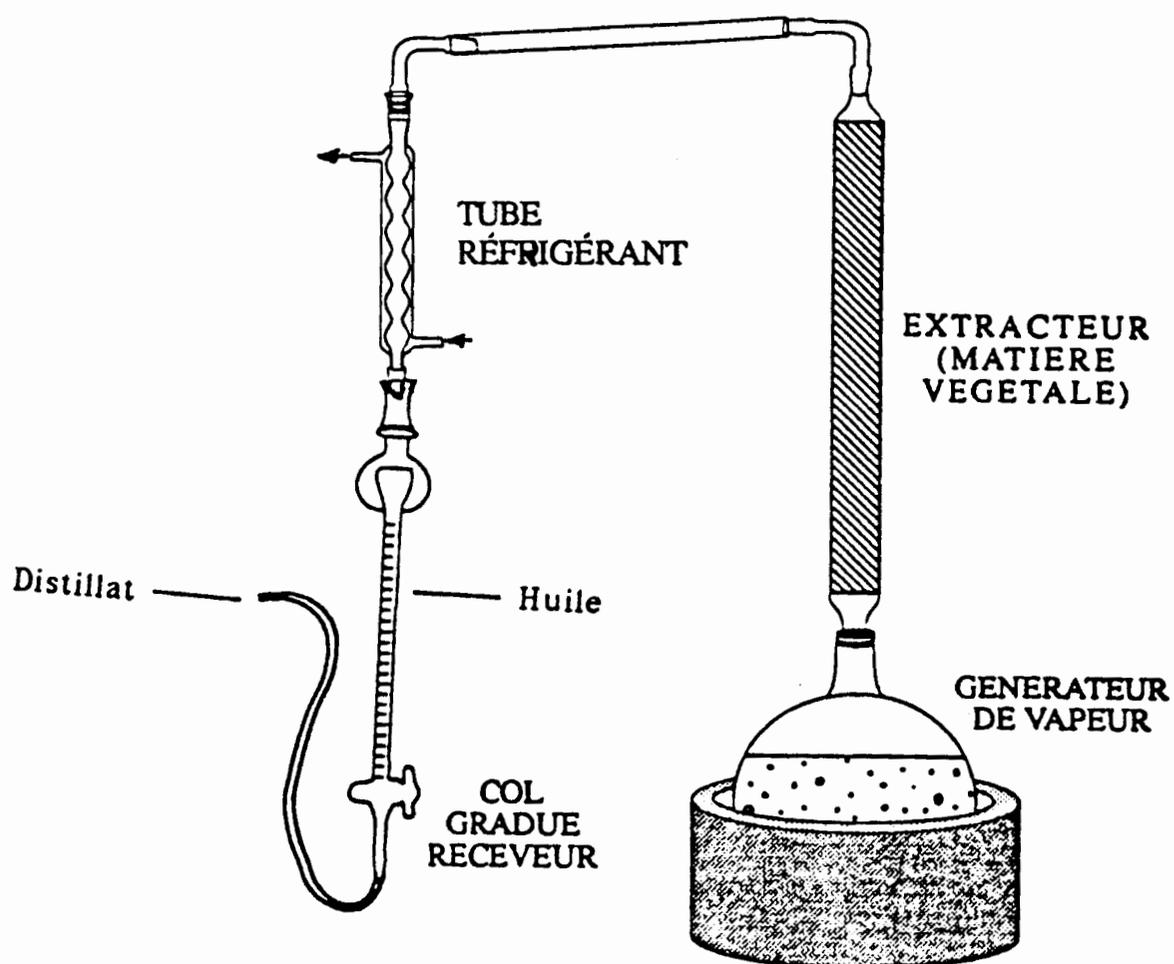


Figure 41b :

Hydrodistillation par entraînement à la vapeur d'eau bouillante



4°- l'infrarouge

Nous avons enfin utilisé la chromatographie sur couche mince (CCM) analytique et préparative et la chromatographie sur colonne pour la séparation du produit majoritaire de *Chenopodium ambrosioides* en vue de sa caractérisation.

Pour l'analyse de nos échantillons et pour l'aspect quantitatif, nous avons utilisé, pour la chromatographie en phase gazeuse, la technique du calcul d'indice de Kovats basée sur le temps d'apparition de chaque pic afin de déterminer et identifier le composé élué. Quant au couplage CPG/SM, les spectres de masse obtenus sont comparés aux données de la littérature.

II-1-1- LES ANALYSES EN CPG

Elles ont été réalisées sur :

1)- Chromatographe DELSI IGC 121 C équipé d'une colonne capillaire CP WAX 52 CB (25 m de longueur et 0,3 mm de diamètre intérieur) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Gaz vecteur : azote U, débit à la sortie de la colonne : 1 ml/min, rapport de fuite : $1/60 = 1$ ml/min, pression : 0,8 bar.
- Gaz combustible : Hydrogène, débit : 30 ml/min sous une pression de 1 bar.
- Gaz comburant : air comprimé, débit : 300 ml/min sous une pression de 1 bar.
- Température : de l'injecteur 240 °C, du détecteur 250 °C.
- Programmation de température du four : palier isotherme à 50 °C pendant 5min puis gradient de 2 °C/min pendant 85 min jusqu'à une température finale de 220 °C
- Volume d'huile injecté : 0,05 µl

2)- Chromatographe HEWELTT PACKARD 5890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un injecteur avec diviseur (SPLIT), d'une colonne apolaire DB-5 (30 m x 0,25 m) et d'une colonne polaire Supelcowax (30 m x 0,25 m). L'injecteur est à une température de 200 °C et le détecteur à 250 °C.

Le volume d'injection est 2,0 µl. La température initiale est de 40 °C pendant 2min, la vitesse est 2 °C/min et la température finale est 210 min pendant 33 min.

Gaz porteur : Hélium, débit : 1 ml/min ; Gaz auxiliaire : Azote, débit : 29 ml/min ; Gaz combustible : Hydrogène, débit : 30 ml/min ; Comburant : air zéro 400 ml/min ; Débit de SPLIT (split vent) : 80 ml/min ; Débit de purge (purge vent) : 5 ml/min.

3)- Chromatographe SHIMADZU, model GC 14-A relié à un intégrateur SHIMADZU, model CR 4-A Chromatopac. Il est équipé de deux colonnes capillaires polaires (Carbowax 20 M) et non polaire (OV 101) de 25 m de long et de 0,22 mm de diamètre intérieur.

Conditions opératoires :

- Gaz vecteur : Azote U, débit en sortie de colonne : 0,9 ml/min ; rapport de fuite 1/50.
- Programmation de température du four : Gradient de température de 5 °C/min de 50 °C à 200 °C.
- Température de l'injecteur : 210 °C, du détecteur : 250 °C. -
- Volume injecté : 1 µl d'une solution à 5 % dans le pentane ou le dichlorométhane.

II-I-2- LE COUPLAGE CPG/SM

IL a été utilisé pour confirmer les constituants identifiés.

Le couplage est fait sur un Détecteur de Masse quadrupolaire HEWLETT PACKARD (HP) de type 5970 avec ionisation par impact électronique (70 eV), couplé à un

spectrographe en phase gazeuse de type Sigma 300 équipé d'une colonne CP WAX 51 CB (50 m de longueur et 0,3 m de diamètre intérieur).

- température initiale = 50 °C pendant 5 min
- programmation de température de 2 °C/min
- température finale = 250 °C pendant 5 min
- volume d'huile essentielle injecté : 0,05 µl.

Un autre Détecteur de Masse quadrupolaire HEWLETT PACKARD (HP) de type 5970 avec ionisation par impact électronique (70 eV), mais équipé d'une colonne capillaire non polaire (DB-1) en silice fondue de 25 m de long et 0,23 mm de diamètre intérieur, a été également utilisé. (Gaz vecteur : Hélium, débit 0,9 ml/min ; Programmation de température : palier isotherme de 1 min à 60 °C puis gradient de température de 3 °C/min jusqu'à 180 °C ; Volume injecté : 1 µl d'une solution à 5 % dans le pentane ou le dichlorométhane).

II-1-3- LA RMN H-1 ET C-13

Les appareils utilisés sont : BRUCKER MSL 300 et BRUCKER AC 400. Le tétraméthylsilane constitue la référence interne, le chloroforme deutérié, le solvant.

II-1-4- LE SPECTRE INFRA ROUGE (IR)

Les spectres infra rouge ont été enregistrés sur un appareil PERKIN-ELMER 467, soit à l'état pur, soit en solution dans le tétrachlorure de carbone. Les cellules sont en chlorure de sodium (NaCl).

II-2- SÉPARATION ET ISOLEMENT

II-2-1- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES (CCM)

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrsioides* est diluée dans 2 cm³ de chlorure de méthylène (CH₂Cl₂). 200 µl de cette huile diluée est déposé sur les plaques avec différents solvants :

- Chlorure de méthylène (CH₂Cl₂),
- hexane (C₆H₁₄)
- chloroforme (CH₃Cl)
- hexane + 1 % d'acétate d'éthyle (CH₃COOC₂H₅)
- hexane + 5 % d'acétate d'éthyle
- hexane + 10 % d'acétate d'éthyle
- hexane + 20 % d'acétate d'éthyle

Les plaques sont ensuite révélées à la vaniline.

De tous les solvants utilisés, seul le chlorure de méthylène (CH₂Cl₂) ou le chloroforme (CH₃Cl) permettent de réaliser une bonne séparation.

Cependant, dès qu'on ajoute de l'acétate d'éthyle à l'hexane, les différents constituants de l'huile de *Chenopodium ambrosioides* sont séparés.

Ainsi, pour une bonne séparation sur colonne, les mélanges d'hexane et d'acétate d'éthyle à des proportions différentes sont utilisés.

II-2-2- CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Deux colonnes ont été utilisées.

La première colonne est constituée d'une portion de 0,4 g d'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* dans une colonne ouverte de silice flash (50 g) et éluée successivement par :

- hexane - acétate d'éthyle 15 %	: 100 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 30 %	: 100 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 40 %	: 100 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 60 %	: 150 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 70 %	: 150 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 80 %	: 150 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 90 %	: 150 cm ³
- acétate d'éthyle	: 400 cm ³

Dans la deuxième colonne nous avons utilisé 100 g de silice et 1g d'huile essentielle.

La colonne a été successivement éluée avec :

- hexane pur	: 200 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 10 %	: 150 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 20 %	: 150 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 30 %	: 200 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 40 %	: 200 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 50 %	: 200 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 60 %	: 200 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 70 %	: 200 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 80 %	: 200 cm ³
- hexane - acétate d'éthyle 90 %	: 200 cm ³
- acétate d'éthyle pur	: 200 cm ³

Ainsi, le solvant S capable d'entraîner C a un pouvoir éluant insuffisant pour détacher A et B. Les constituants A et B restent encore fixés sur la colonne.

Les solutions de même volume c'est-à-dire les éluants renfermant le produit élué dissout sont recueillies séparément.

Toutes ces fractions sont pesées après avoir été évaporées à sec et leur pureté a été contrôlée par les différentes techniques d'analyse chromatographique citées ci-dessus.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif du présent travail est d'optimiser la production des huiles essentielles des espèces retenues par l'étude des variations inter et intraspécifiques de leurs rendements et de leurs compositions chimiques et de déterminer leur effet sur les agents pathogènes du corps humain.

Pour y arriver, nous avons étudié 432 échantillons d'huiles essentielles issues de deux familles (Myrtacées et Chenopodiacees), de trois genres (*Eucalyptus*, *Melaleuca* et *Chenopodium*) et de sept espèces (*camaldulensis*, *citriodora*, *globulus*, *tereticornis*, *torelliana*, *quinquenervia* et *ambrosioides*) botaniquement contrôlées.

Les échantillons ont été distillés par entraînement à la vapeur et/ou par l'hydrodistillation. Nous avons également testé les propriétés pharmacodynamiques de sept échantillons d'huiles essentielles sur cinq microorganismes (deux bactéries Gram positif et deux bactéries Gram négatif et une levure).

Pour cela, nous avons réalisé une bibliographie la plus exhaustive possible en ce qui concerne, d'une part, l'extraction et l'analyse des huiles essentielles, et d'autre part, pour ce qui concerne les tests antimicrobiens.

Les rendements et quelques constantes physiques ont été donnés. Les analyses ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par couplage CPG/SM et comparaison avec les données de la littérature. Nous avons aussi effectué les analyses par RMN H-1 et C-13, par chromatographie sur couche mince (CCM), préparative et sur colonne et enfin par IR.

Dans la première partie :

* Du point de vue du rendement, si l'on tient compte des deux familles, les rendements en volume des huiles essentielles obtenues varient entre 0,4 et 5,95 %. Le rendement le plus élevé est obtenu chez les Myrtacées et plus précisément chez *Eucalyptus citriodora* ; l'espèce donnant le plus faible rendement est *Chenopodium ambrosioides*.

Les résultats montrent que les rendements en volume, des huiles extraites, dépendent plus du site que de la période de récolte pour *E. citriodora*, alors que pour *E. camaldulensis*, les deux facteurs, lieu et date de récolte doivent être pris en considération.

Pour *Melaleuca quinquenervia*, nous avons noté d'une part, une faible influence de la période de récolte sur le rendement qui passe par un minimum pendant la saison sèche et par un maximum pendant la saison pluvieuse et d'autre part, qu'il n'y a pas perte de volume après 60 jours de stockage et que 6 à 14 jours de séchage à l'ombre du matériel végétal paraît être le temps nécessaire pour un rendement optimal.

Par ailleurs, nous avons remarqué que les rendements en huiles essentielles évoluent de manière générale avec l'âge de la plante et qu'ils dépendent plus de la pluviométrie que de la température.

Enfin, les rendements obtenus pour les autres espèces ne sont pas moins intéressants.

*- Du point de vue de la composition chimique, environ 106 constituants chimiques ont été identifiés dans les échantillons des huiles essentielles analysées au sein des deux grandes familles d'origine béninoise étudiées : 92 pour le genre *Eucalyptus*, 40 pour le genre *Melaleuca* et 22 pour *Chenopodium*.

L'investigation effectuée sur les huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* acclimaté au Bénin met en évidence une grande variation intraspécifique de la composition chimique influencée par la période, le lieu de récolte et l'âge des feuilles. Cette variation se manifeste par la présence de trois types chimiques :

- type à 1,8-cinéole (déjà signalé),
- type à paracymène (déjà signalé),
- type à γ -terpinène (jusqu'à présent jamais signalé dans la littérature) qui présente une homogénéité.

Le type à 1,8-cinéole (70% en moyenne) présente un intérêt pour la médecine et le type à paracymène est utilisable comme matière première en parfumerie.

Les essences d'*Eucalyptus citriodora*, dont la qualité est en tout point comparable à celles commercialement connues avec des taux en citronellal supérieurs à 70%, sont de la variété type et peuvent être utilisées en parfumerie, en savonnerie, en cosmétique.... Leurs compositions chimiques sont plus influencées par le site que par la période de récolte.

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, avec un taux en 1,8-cinéole supérieur ou égal à 70%, serait indiquée comme huile médicinale.

L'analyse de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* du Bénin indique l'existence de deux chémotypes :

- type commun à 1,8-cinéole
- type à farnésol (84% tout isomère compris) spécifique du Bénin (et nulle part signalé) présente un intérêt économique important à cause de l'effet bactéricide connu pour ce produit.

La dernière huile d'*Eucalyptus* analysée, celle de l'espèce *torelliana*, peu étudiée par les auteurs, ne présente qu'un intérêt académique avec comme produits majoritaires γ -terpinène, α -pinène, p-cymène, limonène et 1,8-cinéole.

Les investigations menées sur *Melaleuca quinquenervia* révèlent:

d'une part, l'existence de trois chémotypes :

- type (dominant) à 1,8-cinéole
- type à taux égal en 1,8-cinéole et en viridiflorol
- type à viridiflorol, spécifique du Madagascar et du Bénin, beaucoup utilisé en industrie pharmaceutique et,

d'autre part, une homogénéité de la composition chimique tout au long de l'année et ne subissant aucune influence saisonnière.

Quant aux huiles essentielles de *Chenopodium ambrosioides* analysées, le taux en ascaridol varie entre 6,4 et 26,45%. Un nouveau produit (oxyde d'ascaridol), isolé et caractérisé avec un pourcentage allant de 14,40 à 50,7%, est caractéristique du *Chenopodium ambrosioides* d'origine béninoise.

Un échantillon provenant de Porto-Novo, riche en α -terpinène (44,4%) et pauvre en ascaridol (8,32%) devient, après vieillissement par autoxydation, très riche en ascaridol (52,28%) et très pauvre en α -terpinène. Ceci prouve la bioconversion de α -terpinène en ascaridol.

Dans tous les échantillons, le p-cymène apparaît comme un produit majoritaire avec un pourcentage variant entre 5,2 et 43,4%.

En ce qui concerne l'activité biologique, dans la deuxième partie, nous avons obtenu des résultats intéressants.

Les huiles essentielles en général présentent une activité certaine contre toutes les souches testées à l'exception de *Klebsiella pneumoniae*. L'activité antifongique observée pour *Candida albicans* varie aussi suivant les lots d'huiles essentielles testées. Nous avons également remarqué que les essences actives contre les bactéries le sont aussi contre *Candida albicans*.

La sensibilité des bactéries varie d'une souche à une autre. *Staphylococcus aureus* (Gram+) se révèle être la bactérie la plus sensible et *Klebsiella pneumoniae* (Gram-) la plus résistante.

L'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* est la plus active suivie de celle de *Melaleuca quiquenervia*. Du point de vue activité biologique, l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Porto-Novo présentant l'activité la plus faible se classe, après vieillissement par autoxydation, en première position devant *Eucalyptus citriodora*. On en déduit que le vieillissement des huiles améliore leurs propriétés biologiques.

Après examen de la composition chimique des huiles étudiées, l'activité d'une essence semble être influencée par la présence de composés comportant une fonction oxygénée.

Ces résultats nous ouvrent de nouvelles perspectives sur le plan de la recherche et sur les plans pharmaceutique et économique.

En effet, il est envisageable :

- de créer une équipe pluridisciplinaire (chimistes, biologistes, pharmaciens, médecins et tradipraticiens) pour tester les propriétés pharmacodynamiques *in vivo* et *in vitro* des huiles essentielles d'origine béninoise afin de tirer pleinement tous les bienfaits et profits de la nature dans l'Aromathérapie.

- de sélectionner les individus les plus performants et les plus intéressants, de procéder à leur clonage et de vérifier si les caractéristiques chimiques sont bien transmises à leur descendance. Dans l'affirmative, la mise en place de parcs multiplicatifs pour une production commerciale est nécessaire.

Dans un avenir proche, on pourra s'intéresser à la production d'*Eucalyptus citriodora* qui donne des essences riches en citronellal pour la synthèse de citronellol, de l'hydroxycitronellal et du menthol, utilisées en parfumerie, en cosmétique et en savonnerie. De même, la protection et l'exploitation de *Melaleuca quinquenervia* dont l'huile essentielle est utilisée en pharmacie devient envisageable. La production du type à viridiflorol est beaucoup souhaitable grâce à une sélection rigoureuse des graines du peuplement déjà existant.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - P. DUQUENOIS,
Les médicaments aromatiques, leurs caractères, leur contrôle.
Les actualités pharmaceutiques, 1979, **154**, 17-2.
- 2 - P. DUQUENOIS,
L'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, leur normalisation et l'Europe des médicaments ., Par cosm. Savons, **11** (10), 414-418.
- 3 - G. LEGRAND,
Manuel du préparateur en pharmacie,
Masson, Paris, 1982.
- 4 - *IX ème Congrès International des huiles essentielles du Surogour*, Parf. cosm. Arômes,
1983, **53**, 63-73.
- 5 - P. MAIHE BIAU,
La Nouvelle Aromathérapie.
2ème édition, Editions Jakin, Paris, 1994, 28-29.
- 6 - G. DEYSSON,
Organisation et classification des plantes vasculaires,
Tome II. 1ère partie : Organisation générale ; 2ème partie : Systématique, Soc. d'éducation et
d'Enseignement Supérieur (6ème Edition), Paris, 1976).
- 7 - M. PARIS et H. MURABIELLE,
Abrégé de Matière médicale. Pharmacognosie. Tome I.
Masson, Paris 1981, 182-194.
- 8 - E. BOCEHIO,
Parfums cosmétiques Aromes,
1985, **63**, 61.
- 9 - G. J. COLLIN, D. LORD, J. ALLAIRE, D. GAGNON,
Huiles essentielles et extraits 'micro-ondes'
Parfums Cosmétiques, Arômes, 1991, **97**, 105-112.
- 10 - J. BRUNETTON,
Pharmacognosie Phytochimie. Plantes médicinales,
Tec. et Doc. Lavoisier, Paris, 1993, p. 418.
- 11 - Agence Française de Normalisation;
'Recueil de Normes Français, Huiles essentielles'
AFNOR, 3ème édition, Paris la Défense, (1989).
- 12 - J. TRANCHANT,
Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse,
Masson, Paris, (1955).

- 13 - W. JENNINGS et T. SHIBAMOTO,
Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography.
 Academic Press, New-York, (1989).
- 14 - R. P. ADAMS,
 "Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy" Academic Press, New-York, (1989).
- 15 - R. Ph. GARRY, J. C. CHALCHAT et A. MICHET,
 "Liste des substances chimiquement définies identifiées dans les huiles essentielles et extraites".
 Documentt A : fichier résultats et Document B. SNIAN, 2è éd. Paris, (1992).
- 16 - Y. MASADA,
 "Analys of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry".
 Hirokawa Publishing companing Inc. Tokyo, Japan, (1995).
- 17 - COUNCIL of Europe,
 "Flavouring substances and naturel sources of flavourings"
 3ème éd. Maisonneuve, Strasbourg, (1981).
- 8 - V. FORMACEK et H. K. KUBECZKA,
Carbon 13 MMR spectroscopy
 John Willey et Sons, New-York, (1992).
- 19 - B. LAWRENCE,
 "Essential oils 1976-1978" (1979) ;
 "Essential oils 1979-1980" (1981) ;
 "Essential oils 1981-1987" (1989).
 Allured Publishing corporation, Wheaton, Illinois.
- 20 - E. GUENTHER,
 "The Essential oils
 Vol. 1 (1948) ; Vol. 2 (1949) ; Vol. 3 (1949) ; Vol. 4 (1950) ; Vol.6 (1952).
 "The constituents of essential oils".
 R. E. Krieger publishing company, Malabar, Florida.
- 21 - E. T. THEIMER,
 "Fragrance chemistry. The science of the sense of smell". Academic Press Inc ; New-York, (1982.)
- 22 - S. DEV, A. P. NARULA et S. J. YADAV,
 "Crc Hand book of Terpercils. Vol.1 : Monoterpenoid"
 C.R.C., Press Inc ; Boca Raton, Florida, (1982).
- 23 - E. CHRABOT, J.DUPONT, L. PILLET,
Les huiles essentielles et leur principaux constituants.
 Béranger dr ; Paris, (1899).

- 24 - P. BELAICHE,
Traité de phytothérapie et d'Aromathérapie,
Maloine Eds, Paris (1979).
- 25 - F. BASSET,
Parfums et Odorats
Parfums Cosmétiques Arômes, 1989, **87**, 19.
- 26 - M. M. ISMAILI-ALAOUI, B. BENJILALI, R. AZERAD et A. BELANGER
Actes du Colloque de St Jean-bar-Rucgeueyn 19-24 Octobre 1995, p. 267-277.
- 27 - R. S. DHAVALIKAR, P. N. RANGACHARI et P. K. BATTACHARYA, *Indian J. Biochem* ; 1966, **3**, 158 ; *Ibid.* 1966, **3**, 144.
- 28 - G. KRAIDMAN, B.B. MUKHERJEE et I. D. HILL,
Bacteriol. Pro., 1969, 63.
- 29 - K. KIESLICH, W. R. ABRAHAM, B. STUMPF, P. THEDE et P. WASHAUSEN,
Transformaion of terpenoids in Progress in Essential Oil Research ; Walter de GRUYTER
and Co Berlin, New-York, 1986, 367.
- 30 - E. R. BOWWEN,
Florida state Hortical Society, 1975, 304.
- 31 - B. B. MUKHERJEE, G. KRAIDMAN, I. D. HILL,
Appl. Microbial. 1973, **25**, 447.
- 32 - B. STUMPF, W. R. ABRAHAM et K. KIESLICH,
Ger. Patent . 1982, N° **3** 239. 545.
- 33 - L. LOHBARD, A. KOHLER,
"Etude dans le domaine de l'autooxydation," *Bull. Soc, chim* ; 1954, N° **125**, 639-644.
- 34 - DUFRAISE,
" *Traité de Chimie Organique* ",
GRIGNARD, Masson, Paris, 1936, 1160.
- 35 - B. J. BETTS, J.C. ROBB,
" *thermally initiated autoxidation*, "
Nature, 1968, 2402-2409.
- 36 - E. E. ROYALS, S. E. HORNE,
J. Amer. Chem. Soc. 1955, **77**, 187 et 1951, **73**, 5856.
- 37 - G. O. SHENCK, G. OHLOFF, S. SCHROETER,
"Zur Autoxydati-on der (+) limonen ; *Liebigs Ann. Chem* ; 1965, 687, 27-29 et 1964,
674, 93-117 ; *Angew. Chem* ; 1964, **76** (13), 582-583.

- 38 - G. WINDMARK, S. G. BLOHM,
"A Comparative Study of the autoxidation Δ^3 - carène , α -pinène, β -pinène and (+) limonene", Acta chem. Scand, 1957, **11**(2), 392-393 .
- 39 - D. A. BAINES, W. COLKER ,
"Autoxidation of (+) Δ^3 - carène",
 J. chem. Soc., Perkin J., 1975, 2232-2237.
- 40 - M. PFAU,
"La fotochemical nel campo de monoterpenie die profottiaffini",
 Ris. Ital. Essence profumi, 1961, 175-190.
- 41 - C. W. JEFFORD, A. F. BOSHUNG, R. M. MORIARTY,
"The reaction of singulet oxygen with α and β -pienne",
 Helv, chem. Acta, 1973, **56** (7), 2649-2659.
- 42 - K. GOLLININCK, G. BUCHEWALD, G. O. SCHENCH,
"Zur chemischen and sterischen selektivitat des photosensibilisation O_2 uber tragung ar (+) limonene and (+) Carvomenthen",
 Ann. Chem. Dtsch, 1964, **674** 93-117.
- 43 - P. FRAMCHROMME et Coll.,
"Aromatologie : " De la plante aromatique à l'huile essentielle".
 Aromathérapie exactement, Livre 1, Enc., 1990, p.54.
- 44 - S. TALAJAJ,
 W. Afr. Pharmacist, **97**, (1994).
- 45 - P. ROVESTI,
 Ann. Acad. Bres. Creney, 1972, **44**, 91.
- 46 - S. D. ELAKOVICH, B. O. OGOUNTIMIN,
 J. Nat. Prod ; 1987, **50**, 503.
- 47 - G. LAMATY, G. MEMUR, L. BESSIERE, J. M. OAMBA et T. SILOU,
 Phytochem ; 1990, **29**, (2), 521-522.
- 48 - K. H. KOUMAGLO, M. MOUDACHIROU, I. ADDAE - MENSAH et F. X. GARNEAU,
"Végétaux aromatiques des Iles de l'Océan Indien et du continent Africain, 13ème JIHE,
 1994, 34.
- 49 - E. GUENTHER,
 The essence oil , vol .2, 1949, 372-374.
- 50 - R. JOLLOIS et Coll.,
la molécule aromatique, matière, énergie, information : Clefs pour l'aromathérapie,
 exactement, livre 3, En 1990, p. 81-91.

- 51 - S. DALET,
"Contribution à l'étude des propriétés antivirales de quelques huiles essentielles produites à Madagascar sur les poliovirus 1, 2 et 3" Mémoire de diplôme d'études approfondies en Sciences appliquées option : Biochimie, université de Madagascar EESS Juin (1990).
- 52 - J. C. MARUZELLA et M. B. LICHTENSTEIN,
J. Amer. Pharm. Assoc., 1956, **45**, P. 378-381.
- 53 - H. S. SHUKLA, P. DUBEY R., V. CHARTUVEDI,
Antivirals proprieties of essential oils of Foeniculum vulgare and Limpinela anisum L.
Agronomie **9**, 1989, 277-279.
- 54 - O. W. TSCHUIKU et Coll. ,
Farmatsevt. ZH (Kiew) 1960n, **15**, 6, 42; 1963; CZ 134, 14402.
- 55 - KIENHOLZ et KEMKES,
Arzneim Forsch, 1960, **10**, 917.
- 56 - J. C. MARUZELLA,
Amer. Perfum, 1962, **77**, 67.
- 57 - J. VALNET,
Plantes med. plytother. , 1973, **7**, 163.
- 58 - J. PELLECUER et Coll. ,
Huiles essentielles bactéricides et fongicides,
Revue de l'Institut Pasteur de Lyon, 1976, **9**, **2**, 135-159.
- 59 - D. E. CONNE et L. R. BOUCHAT,
Effects of essentials oils from plants on growth of food spoilage yearts; J. of food. Sc., 1984,
49, 429-434.
- 60 - S. A. RSS, N. E. EL-KELTAWI et S. E. MEGALLA,
Antimicrobial activity of some Egyptian aromaties plants
Fitoterapia, 1980, **4**, 201-205.
- 61 - F. BALTASSAT et S. FERRY,
Phytotherapie et Pharmacognosie,
Lyon Pharm., 1982, **33** (2), 111-114.
- 62 - M. C. BOURGEOIS,
Phytoaromatherapie : Les moyens thérapeutiques,
la vie médicale, 1982, **22**, 1481-1486.
- 63 - R. M. GATTEFOSSE,
Aromathérapie.
Girardot (Editions), Paris, 1928, 5970.

- 64 - S. INOUE, H. GOI, K. MIYAUCHI, S. MURAKI, M. OGIHARA et Y. IWANAMI,
Inhibitory effect of volatile constituents of plants on the proliferation of bacteria.
Antibacterial activity of plant volatiles,
Bokin. Bbai, 1983, 11, 609-615.
- 65 - M. MALLEA, M. SOLER, F. ANFOSSO and J. CHARPIN,
Activité antifongique d'essences aromatiques,
Pathol. , Biol. , 1979, 27, 597-602.
- 66 - J. VALNET, C. H. DURAFFOURD and J. C. LAPRAZ,
L'Aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques,
Plant. Méd.icales phytother.; 1978, 12, 43-52.
- 67 - M. F. BEYLIER MAUREL,
Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie, Rivista Ital. EPPOS, 1976,
12, 43-53.
- 68 - D. E. BEUCHAT,
Effect of essential oils from plants on growth of food Spoilage yeast,
J. Food Sc., 1984, 49, 429-434.
- 69 - M. SIMEON DE BUOCHBERG, A. ALLEGRINI, C.BESSIERE, M. ATTISO, J.
PASSET et R. GRANGER,
Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes, de Thymus vulgaris
Linnaeus,
Rivista Ital. EPPOS.,1976, 58, 527-536.
- 70 - J.C. CHALCHAT. R. Ph. GARRY, AMICHET, P. BASTIDE, R. MALHURET,
Corrélation composition chimique/Activité antimicrobienne I, Activité de l'huile essentielle
de pin sylvestre à chemotypes différents vis à vis d'Escherichia Coli ;
Plantes médicinales et phytothérapie, 1987, 21 (1), 26-35.
- 71 - J. C. CHALCHAT, R. Ph. GARRY, A. MICHE, P. BASTIDE, R. MALHURET,
Correlation composition chimique/ Activité antimicrobienne II, Activité de trois huiles
essentiels de résineux vis-à-vis de deux souches bactériennes, Plantes médicinales et
Phytothérapie, 1987, 21 (1), 209-217.
- 72 - J. C. CHALCAT R. Ph. GARRY, A. Michet, P. BASTIDE,
R. MALHURET,
Correlation composition chimique / Activité antimicrobienne, comparaison de l'activité
d'huiles essentielles et oxygénées vis-à-vis de six souches,
Plantes médicinales et Phytothérapie, 1989, 23 (4), 305-314.
- 73 - J. C. CHALCHAT, R. Ph. GARRY, A. MICHE, P. BASTIDE, R. MALHURET,
Correlation composition chimique / Activité antimicrobienneIII, Influence de vieillissement
naturel et provoqué sur l'activité de trois huiles essentielles de résineux vis-à-vis
d'Escherichia coli,
Plantes médicinales et Phytothérapie, 1987; 21 (3), 218-235.

- 74 - J. C. CHALCHAT, R. Ph. GARRY, A. MICHET, P. BASTIDE, F. FABRE MALCHURET,
Correlation composition chimique / Activité antimicrobienne V, Contribution à la comparaison de deux méthodes de détermination des C.M.I.
Plantes médicinales et Phytothérapie, 1991, **25** (4), 184-193.
- 75 - R. ANTON,
Les médicaments aromatiques, une thérapeutique d'avenir,
Les Actualités Pharmaceutiques, 1979, 154, 23-30.
- 76 - E. GUENTHER,
The essential oils,
Vol. VII, D. Van Nostrand Inc; New-York, USA, (1952).
- 77 - J. VALNET,
Aromathérapie,
Maloine, Paris, (1964).
- 78 - J. C. MARUZZELA,
The Germinal properties of perfume oils perfumery chemicals,
Ann. Perfum. Cosmet ; 1962, **77** (1), 67-72.
- 79 - G. M. CHIPPEDELLE,
"Eucalyptus Nomenclature II,
Australian Forestry Research, Canbéra, 1976, 7, p. 69.
- 80 - B.J. SMALL,
Australian Forestry, 1984, **44** (3), p. 170.
- 81 - P. VIGNE,
La France et ses productions aromatiques végétales actuelles
Parfum. Com. études aromes, 1987, **78**, 97-103.
- 82 - H. HITOKOTO, S. MOROZUMI, T. WAUKES, S. SAKA and H. KURATA,
Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi,
Appl. Environ. Microbiol., 1980, 39, 818-822.
- 83 - F. F. BUSTA, et P. M. FOZGEDING,
Chemical food conservatives, In. S. Block "*Desinfection, Sterilisation and preservation*,
Lea and Fediger Eds ; Philadelphia, USA, 1980, 656-694.
- 84 - R. TIWARI, R. P. DISHIT, N.C. CHANDAN, A. SAXENA,
K. G. GUPTA and D. E. VADEHRA,
Inhibition of growth and aflatoxin B1 production of Aspergillus parasiticus by spice oils,
J. Food Sci. technol. , 1983, **20**, 131-133.
- 85 - D. LOW, B. D. RAWAL et W. GRIFFIN,
Planta Med. , 1974, **26** (2), p. 80.
- 86 - S. PRAKASH et G. K. SINHA,
Indian Perfumer, 1972, **16**, P.5.

- 87 - A. R. PENFOLD et F. R. MORDISON,
"Museum of Applied Arts and Sciences,
 Bulletin n° 2, 5 th Edition, Sidney, (1951).
- 88 - A. R. PENFOLD et J. L. WILLIS,
" The Eucalyptus"
 Leonard Hill (books) Ltd/London, Inter. Science Publisher Inc ; New-York, (1961).
- 89 - B. KAMEL,
"Contribution à l'étude de la feuille d'Eglobulus Labill"
 Thèse de doctorat d'Etat Faculté de Pharmacie Marseille, (1975).
- 90 - MARTIN et COSSALTER,
'Les Eucalyptus des Iles de la Sonde, Bois et Forêt des Tropiques' 1975-1976, N° 163-168.
- 91 - J.H. FAUVEL,
 Parf Cosm. Sav. 1961, 4 (3), p. 99.
- 92 - D. J. BOLAND, J. J. BROPHY and A. P. N HOUSE, *Eucalyptus leaf oils. Use, Chemistry, Distillation and Marketing.* Inkata Press, Malbourne, Sydeney, Australia, (1961).
- 93 - M. R JACOBS,
"Growth habits of the Eucalyptus "
 Commonwealth Government Printer, Canberra, 1955, P. 1-262.
- 94 - S. ZRIRA, B.BENJILALI, et G. LAMATY 12ème J. Int. des Huiles Ess., Rivista Ital. EPPOS., 1994, p. 882.
- 95 - C.MARION,
"Contribution à l'étude botanique chimique et taxonomique du genre Forrytha Vaht (Oleacear)," Thèse de Doctorat d'Etat Université de Montpellier I, (1990).
- 96 - M. GUYOT,
Systématique des Angiospermes : Référence Particulière à la flore togolaise, Lomé Ed. Togo (1992).
- 97 - G.M. KIYABOU,
" Les Eucalyptus du Congo : Variation inter et intra spécifique du rendement et de la composition de leurs huiles essentielles"
 Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, (1992).
- 98 - S. ZHOABANG, Y. QIZHUANG, W. YONQYIN et L. GUANGO,
Linchan nuaxue yu gongye,
 1987, 7 (2) p. 35. (Réf. Chem. abs; 108 : 1836-1844).
- 99 - H. H. G. McKERY,
Research into the Volatile oils of the Australian flora

1788-1967 in : *A Centenary of Scientific Progress*, 310-331. Centenary Vol ; Royal Society of New South Wales Science Society House, Sidney, (1968).

100 - B.E.J. SMALL,
Assessing the Australian Eucalyptus oil Industry.
Forest and Timber, 1997, 13, 13-16.

101 - D. SHIEL,
Eucalyptus -The essence of Australia.
Que ensberry Hill Press, Melbourne, (1985).

102 - P.S. ABBOTT,
Commercial Eucalyptus oil production.
In : Eucalyptus oil Production, Proc. of the Eucalyptus Oil Production Seminar, Gowangerup, 14 Feb. 1989, 29-48, west Aust. Dept. Agric. Mix ; Publ. 9/89.

103 - E.V. LASSAK,
The Australian Eucalyptus Oil In dustry, pastand presnt.
Chemistry in Australia, 1988, 55, 396-406.

104 - R.T. BAKER and H.G. SMITH,
A Research on the Eucalyptus, Especially in Regard to their Essential Oils. 2 nd edition.
NSW Government Printer, Syndney, (1920).

105 - F. G. SANRET,
Annales de la Recherche Forestière au Maroc, tome 9,
Rapport 1965, 1967, p. 259.

106 - E.A DJANOHOON, A. M. R. AHYI et Coll.,
Medecine Traditionnelle et Pharmacopée : Contribution aux études esthnobotaniques et floristiques en République du Congo ,
ACCT Paris, 1988, p. 15-58.

107 - P. SATYA et G. K. SIMHA,
Indian perfumer, 1972, 16, p.5.

108 - A. G. HANIM et J. ANDRANI,
Pharm. Sci.? 1978, 41 (2) p. 80.

109 - D. G. AMMON; A. F. M. BARTON and D. A CLARKE, *Eucalyptus oil as a component of petrol -ethanol fuel blends*
Search, 1986, 17, 92-95.

110 - E.V. LASSAK,
Chemistry in Australia, 1983, p. 396.

111 - P. K. GUPTA et A. F. MASCARENHAS,
Basic Life Sci., 1983, 22, p. 299.

112 - M. MIRANDA, J. P. ZAYAS et A. ROSADO,
Rev. Cienc. Qiu., 1983, 14 (2), p.211.

- 113 - A. K. SINGH, A. K. BHATTA CHARYA et Coll.,
Indian Forester,
Mars 1983, p. 153.
- 114 - J.W. MWANGUI, AN. Guantai et G. MURIUKI,
E. Afr. Agr. For J. , 1981, 46 (4), p. 89.
- 115 - V. K. SOOD, J.P. RIER et R.C. GHOSH,
Parfun Kosm, 1987, 68 (8), p.495.
- 116 - P.W. TOMPKINS,
REV. Cuba Farm ., 1985, 19, p. 128.
- 117 - R. WESTON,
Composition of essential oil from leaves of Eucalyptus delgatensis,
phytochemistry, 1984, 23, 1943-1944.
- 118 - D. J. BOLAND, J. J. BROPHY, T. M. FLYNN. and E.V. LASSAK,
Volatile leaf Oils of Eucalyptus delgatensis seedlings, Phytochemistry, 1982, 21, 2467-2469.
- 119 - M. I. H. BROOKER, A. F. M. BARTON, B. A. ROCKEL and J. T. JANDRA,
The cineol content and taxonomy of Eucalyptus kochii Maiden and Blakely and E. Plenissima (Gardener) Brooker, with an appendix establishing these two taxa as subspecies,
Aust. J. Bot. , 1988, 36, 119-129.
- 120 - J. T. JANDRA,
Eucalyptus Oil : Sources, analyses and chemical properties. Unpublished Ph D. Thesis,
Murdoch Univ. Perth; (1986).
- 121 - A. F. MACARENHAS, S. S. KHUSPE, R. S. NADGAUDA, P. K. GUPTA and B. M. KHAN,
Potential of cell culture in plantation forestry programs
In : J. W. Hanover and D.E. Keathley (Eds). Genetic Manipulation of Woody plants, Penum Press, New-York and London, 1987, 391-412.
- 122 - L. H. BRYANT,
Variation in Oil Yield and Oil composition in some species of Eucalyptus and tea trees,
Tech. Notes N. S. W. For Comm. Divn Wood Tech ., 1950, 4, 6, 10.
- 123 - D. SIMMONS and R.F. PASONs,
Seasonal variation in the volatile leaf Oils of two Eucalyptus species, Biochem. , Syst. Ecol., 1987, 15, 209-210.
- 124 - F. G. J. LEACH and T. WHIFFIN,
Ontogenetic, seasonal and diurnal variation in leaf Volatile oils and leaf phenolic of Angophora costata,
Aust-syst.Bot 1989, 2, 99-111.
- 125 - M. MIRANDA, J. P. ZAYAS,
Rev. Cuba Farm ., 1985, 19, p. 128.

- 126 - AJEBBRARI,
"Investigation sur les possibilités de production d'huile essentielle d'Eucalyptus à cinéocle au Marpe
 "Mémoire de fin d'étude, option technologie Alimentaire, Institut d'Agronomie et Vétérinaire HASSAN II, Rabat, (1988).
- 127 - F. L. SQUIBBS,
 Ann, Rep. Dept. Agr. Seychelles, 1936, 1 p.10.
- 128 - A. K. SINGH, A. K. BAHATTACHARYA, K. SINGH et B. M. DIWEDI,
Indian Forester, Mars 1986, p. 223.
- 129 - M. MIRANDA et J. P. ZAYAS,
 Rev. Cub. Farm, 1985, 19, p.121.
- 130 - A.M. ABOU- DAMAS et E. M. ABOU-ZEID,
Egyptian Journal of Botany, 1973, 16 (1-3), p.345.
- 131 - B. S. RAZAFINDRAKOTO,
huile essentielle d'Eucalyptus de Madagascar : Variabilité de la composition et du rendement en fonction de la période de récolte ; essais de classement chemotaxonomique et propriétés pharmacodynamiques.
 Thèse de Doctorat, USTL, Montpellier II, (1988).
- 132 - H. GAUSSEM,
" Théories Classification des Climats et Micro-Climats,"
 Proceedings of the 8 th International Botanical Congress, Paris, 1954, p.125.
- 133 - I. P. TIMOFEEV,
 Trans Sci. Chem. Pharma. Inst. 1924, 10, p. 99.
- 134 - P. A. BERRY et A. K. Mc BETH,
 J. Chem. Soc., 1987, 5 (2), p143.
- 135 - K. K. KAPUR, V. N. VASHIST et C. K. ATAL,
 Perfum Essent. Oil Rec., Mars 1967, p.148.
- 136 - J. RENEDEO, J. A. OTERO et J. R. MIRA,
 Plantes médicinales et phytothérapie, Tome 24, Numéro 1, Janvier 1990, p. 31.
- 137 - W. F. ERMAN,
Chemistry of the monoterpenes.
 In : P.G. Gassman (Ed.), Studies in Organic chemistry. Vol. II A and B. Marcel Dekker, New-York, (1985).
- 138 - H. J. VON MAYDELL,
Arbustes et arbustes du Sahel : leurs caractéristiques et leurs utilisations,
 Weikersheim : Margraf, 1990, 240-243.

- 139 - R. DEL MORAL and C. H. MULLER,
Fog drip : a mechanism of toxin transport from Eucalyptus globulus. Bull. Torrey Bot. Club,
1969, 96, 467-475.
- 140 - A. H. AL - MOUSAWI and F.A.G. AL - NAIB,
Allelopathic effects of Eucalyptus microtheca F. Muell.
J. Univ. Kuwait (Sci.), 1975, 2, 59-65.
- 141- D. PENOEL, R. JOLLOIS et Coll.,
*Thérapeutique : éléments de médecine aromatique. Aromathérapeutique : éléments de
médecine aromatique. Aromathérapie exactement, livre 3, Enc. 1990, 272-287.*
- 142- S. S. ZRIRA, B. B. BENJILALI, M. M. FECHTAL and H. H. RICHARD,
Essential Oils of twenty-seven Eucalyptus species grown in Morocco.
J. Essent. Oil Res ; 1992, 4 (2), 259.
- 143 - S. S. ZRIRA and B. BENJILALI,
The essential Oil of the Leaves and the fruits of Eucalyptus Camaldalensis.
J. Essent. Oil Res, 1991, 3, 443-444.
- 144 - NAZCAN, M. KARA, K. H. BASER, M. KIRIMER, M.
KURKÇUOĞLU, T, OZEK, G. GULBABA, S. ASLAN. K. GUNSES,
A Systematic study of essential Oils of Eucalyptus species grown in Turkey.
Vol. II. Proceedings of the 13th. International Congress of Flavours, Fragrances and Essential
Oils, Istanbul, Turkey (1955).
- 145 - U.M. SENANAYAKE, S. J. UDAKARDAGE, A.L. JAYE WARDENE,
Studies on Volatile Oil of Eucalyptus camldulensis.
proceedings of the 9 th International Congress of Flavours, Frangrances and Essential Oils
Istambul, Singapour, (1983).
- 146 - S. R ADHIKARY et R. SHAKYA,
Eucalyptus camaloduelensis leaf Oil : a new souce of medical eucalyptus Oil,
J. Nepal Chem. Soc ; 1991, 10, 14-19.
- 147 - Y. DETHIER, A. NDUWIMANA, Y. CORDIER, C. MENUT, G. LAMATY,
*Aromatic plants of tropical central Africa XVI, studies on Essential oils of five Eucalyptus
species grown in Burund,*
J. Essent. Oil Res ; 1994, 6, 469-473.
- 148 - J. D. GBENOU,
*Contribution à l'étude des huiles essentielles de deux espèces d'Eucalyptus du Bénin : E
citriodora, E, Camaldulensis.*
Mémoire de DEA Université Nationale du Bénin, FAST, Nov. (1994).
- 149 - M. A. AYEDOUN,
*Contribution à la connaissance chimique des huiles essentielles de Contribution à la
connaissance chimique des huiles essentielles de plantes aromatiques du Bénin en vue de leur
valorisation.*
Thèse de Doctorat, Université Nationale du Bénin, (1995) .

150 - C. M. BIGNEL, J. P. DUNLOP, J. J. BROPHY and J. F. JACKSON,
Volatile leaf Oils of some South-Western and Southern Australian species of the Genus Eucalyptus.

Part VII Subgenus *Symphimyrthus* Section *exsertaria*,
Flav. Frag. J. , 1996, **11**, 35-41.

151 - C. M. BIGNEL, J. P. DUNLOP, J. J. BROPHY and
J. F. JACKSON,

Volatile leaf Oils of some South-Western and Southern Australian species of the Genus Eucalyptus. Part. VII. A. *Subgenus Eudesmia*, B. *Subgenus Symphyimyrthus* (a) *Section exsertaria* ; (b) *Series Globulares.*

Flav. Frag. J. 1996, **11**, 145-151.

152 - K. H. KOUMAGLO, M. MOUDACHIROU, J. D. GBENOU, F. X. GARRNEAU et
I. ADAE MENSAH,

Analyse chimique des huiles essentielles des Eucalyptus du Togo
(acceptée pour paraître).

153 - T. NDOU et R. VON WANDRAIZA,

Essential oils of South African Eucalyptus species (Myrtaceae),

S. Afr. J. Chem., 1986, **39** (2), 95 - 100.

154 - E. DELLACASSA, P. MENENDEZ, P. MOYNA, E. SOLER,

Chemical Composition of Eucalyptus essential oils grown in Uruguay

Flav. Frag. J. , 1990 **5** 91-95.

155 - LASSINE SIDIBE,

Contribution à l'étude de certaines huiles essentielles de lamellales, myrtacées, Graminacées et Rutacées du Mali.

Thèse de Doctorat Université, Blaise Pascal de Clermont, Avril 1997.

156 - AHMADOUCHE J. BELLAKDAR, M. BERRADA, C. DENIZE, R. PINZL,

Phytotérapie, 1985, **4**, 208-219.

157 - G. FRANCK,

"Phytosensitized, reactions of α -pinène"

J. Chem. Sic. , 1968, **2**, 130-132.

158 - P. J. KROPP,

"Photochemistry of cycloalkènes, VII. Limonène

J. Org. Chem., 1970, **35** (7), 2435-2436.

159 - S. ZRITA et BENJILALI,

Seasonal changes in the Volatile oil and cineol contents of five Eucalyptus species growing in Morocco.

J. Essential oil Res ; 1996, **8**, 19-24.

160 - J. W. MWANGUI, A. N. GUANTAS et MURIUKI, *Eucalyptus citriodora.*

Essential oil content and chemical varieties in Kenya,

E. Af. Agr. Fr. J. 1981, **46** (4), 89-96.

- 161 - E. J. ADJANOHOON, L. AKEASSI et J. EYME,
Medécine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à Maurice,
ACCT ; Paris (1983).
- 162 - A R. PENFORL et J. L. WILLIS,
Physiological forms of Eucalyptus citriodora Hooker,
Nature, 1953, **171**, 883- 884.
- 163 - A. K. SINGH, S. R. SINGH, R. N DUVE, C. L VITHALBHA et P. DRYSDALE,
The distillation and properties of Eucalyptus citrodora oil.
Fiji " Agric. J. 1977, **39**, 33-38.
- 164 - ARCHTANDER,
Perfume and flavour Materials of Naturals origin.
Elizabeth, New Jebey, USA, (1960).
- 165- A. K. S BARUA, N. K. GUPTA et S. D. BHAGAT, *Chemical composition of oil of Eucalyptus Citriodora cultiwated at Jorhat, Assam*. *Flav. Ind* ; 1972, **3** (8) 416.
- 166 - Z. D. CHEN, L. YANG, S. X. LI et Z. R. JIANG,
Study on the chemicale Oomponents of essential oil from leaves of Eucalyptus S. P P.
Chrm. Indust. Forest Prod ; 1983, **3** (2), 14.
- 167 - M. MIRANDA, J. P. ZAYAS et A. RODADO,
Estudion de la Composition quimica del aceit essentïal de Eucalyptus citriodora Hook
Rev. Cienc. Quim ; 1983, **14** (2), 211-221
- 168 - S. SUGIMOTO et T. KATO,
Kanzei Chobunsehisho, 1983, **2**, 31.
- 169 - B. M. LAWRENCE et REYNOLDS,
Perfum. Flav.,
1988, **13**, 46.
- 170 - MOUDACHIROU, J. D. GBENOU, J. C. CHALCHAT, J. L. CHABARD et C. LATIGUE,
Chemical composition of essential oils of Eucalyptus from Benin : R. Citriodora and R. Camaldulensis. Influence of Location, Harvest time, storage of plants and time of steam distillation.
J. Essent . Oil Res . , (accepté pour paraître).
- 171 - D. K. SOHOUNHLOUE, J. DANGOU,
B. GNOMHOSSOU, F-X. GARNEAU, H. GAGNON and F. I. JEAN,
Leaf Oils three Eucalyptus spesies from Bénin : E. torelliana F. Muell ; E. Citriodora Hook and E. tereticornis Smith.
J. Essent. Oil Res ; 1996, **8**, (1), 111-113.

- 172 - A. R. PENFOLD and F.R. MORRISON,
The occurrence of a physiological form of E. citriodora Hooker
Aust. J. Sci. , 1948, **11**, 2934.
- 173 - A. R. PENFOLD, F. Z. MORRISON, H. H. G. McKERN and J. WILLIS,
Studies in the physiological forms of Myrtaceae, Part 5. E. Citriodora Hook and the incidences of its physiological form. Researches on essential oils of the Australian Flora.
Museum of Applied Arts and Sciences, Sydney, 1950, **2**, 12-14.
- 174 - C. M. HARRIS and H. H. G. McKERN ,
A note on the occurrence of guarol in some essential oils of E. citriodora Hook .
Researches on essential oils of the Australian Flora , Museum of Applied Arts and Sciences , Sydney , 1950 , **2** , 15-17 .
- 175 - Unpublished records , Museum of Applied Arts and Sciences , Sydney . Referred to in PENFOLD and J. L. WILLIS 1961 , the Eucalyptus , Leonard Hill (Books) Ltd , London.
- 176 - K. M. KIYABOU,
Etude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de six espèces d'Eucalyptus cultivés au Congo .
Thèse DEA : Montpellier II , (1987).
- 177 - A. R. PENFOLD, F. R. MORRISON et H. H. G. McKERN ,
Studies in the Myrtaceae and their essential oils . Part II. Some source of error in the study of plant populations : Eucalyptus citriodora Hook .
Researches on essential oils of the Australian flora , Museum of Applied Arts and Sciences , Sydney , 1948, **1** ,8-11.
- 178 - A. R. PENFOLD, F. R. MORRISON, J. L. WILLIS, H. H. G. McKERN and M. C. SPIES ,
The essential oil of a physiological form of Eucalyptus citriodora Hook .
J. Proc . Roy. Soc.,N.S.W. , 1951, **85** , 120-122.
- 179 - J. C. CHALCHAT, R. Ph. GARRY, A. MUHAYIMANA ,
J. B. HABIMANA and J. L. CHABARD ,
Aromatic plants of Rwanda Chemical composition of essential of ten. Eucalyptus species growing in ruhande arboretum , Butare Rwanda . J Essent oil Res. , Mar /Apr 1997 , 9 , 159-165 .
- 180 - S. FRAZAO ,
Eucalyptus globulus , Aspect botanique , économique , technologique et analytique ,
thèse de doctorat , Université de Montpellier II , (1981).
- 181 - E. GILDMEISTER and F. HOFFMAN ,
Die Atherischen Ole ,
Akademie- Verlag ,Berlin 1961 , vol . **6** , 196.
- 182 - A. R. PENFOLD and F. R. MORRISON ,
Notes of the essential oils from some cultivated Eucalyptus . part II.
J. Proc . Roy. Soc . N. S. W. , 1930 , **64** , 210-223 .

- 183 - H. NISHIMURA , Y. FUKAZAWA, J. MIZUTAMI, M. CALVIN and D. M. PATTON,
Essential oils of Eucalyptus as reproducible biomass .
 Koen Yoshishu-Koryo ,Terupen oyobi. Seryu .Kagaku ni Kausura Toronkai , 1979 ,23 rd,
 195-197 .
- 184 - A. F .M . BASLAS and S . SAXESA ,
Chemical examination of essential oil from the fruits of Eucalyptus globulus Labill .
 Herba Hungarica , 1984, **23** , 21-23.
- 185 - S. N. MEHRA et M. P. SHIVA,
Fractional distillation of Eucalyptus hybrid (E.tereticornis) oil . α and β -pinenes recovery for commercial usage .
 Indian Perfum , 1984 , **110** , 23-27 .
- 186 - R. PANDA et H. PANDA ,
Studies on Eucalyptus oil .
 India forest .1987 ,434 .
- 187 - O. M. MIRANDA, L. T. M'BOUMA ,T. M. J. QUITERO ,O. ,J. R. P. ZAYAS
 et O.A. ROSADO,
Analyses of the essential oil of Eucalyptus tereticornis Sm.
 Rev. Cub .Farm ,1987, **21** (2) ,177-185.
- 188 - E. C. De RISCALA , H. R. JULIANI, M. J. FUMAROLA et J. A. RETAMAR ,
Essential oils of Eucalyptus tereticornis (E .Umbellata)
 Essenz .Deriv . Agrum , 1976, **46** (2), 176-180.
- 189 - J. F. CHERRIER,
Les essences forestières exploitables en nouvelle-Calédonie : Botanique, Technologie, Usage ;
 Service des Eaux et Forêts : Paris (1983).
- 190 - T. G. H. JONES, W. L. HAENKE,
Essential Oils from the Queensland flora : X. Melaleuca viridiflora.
 Pro. R soc. Queensl; , 1938, **49**, 95-98.
- 191 - S. T. BLAKE,
Contributions from the Queensland herbarium. I. A. Revision of Melaleuca leucadendron and its allies (Mirtaceae) ;
 Queensland herbarium Département of primaries industris : Brisbane, Australia (1968).
- 192 - N. B. BYRNES,
A revision of Melaleuca L. (Myrtaceae) in Northern and Eastern Australia,
 Austrobaileya 1984, **1**, 65-76.
- 193 - J. W. DAWSON,
Flore de Nouvelle-Calédonie, myrtaceae,
 bull. Mous. Hist. Nat., Paris 1992, **14**, 216-229.

- 194 - H. HUMBERT,
Flore de Madagascar et des Comores.
Perrier de la Bathie, H. , Ed. Mus. Nat. , Paris 1953, 74-75.
- 195 - Y. CABANIS, L. CABANIS, F. CHABOUIS,
Végétaux et Groupements : Végétaux de Madagascar et des Mascareignes ;
B.A.P.A. Tananarive, 1970, Tome1.
- 196 - P. A. R. RAMANOELINA, J. P. BIANCHI and E. M. GAYDOU,
Occurrence of Various chemotypes in Niaouli (Melaleuca quiquenervia) Essential Oils from Madagascar using Multivariate statistical Analysis.
J. Agr. Food Chem., 1994, **42**, 1177-1182.
- 197 - R. HEGNAUER,
Chemotaxonomie pflanzen, Tome V. Birkhauser Verlag Baselung.
Stuttgart, (1969).
- 198 - S. DESHAMPS,
60 huiles essentielles de plantes.
Revue Santé et Beauté. H. S. 17, La vie Naturelle , (1991).
- 199 - S. DE-SOUZA, M. A. AYEDOUN, A. BATONON, J. AYISSE et A. B. AKPLOGAN,
Essai d'Aromathérapie par l'huile essentielle de Niaouli du Bénin
Revue Méd. Pharm. Afr. 1994 - Vol-8, N° 1.
- 200 - T. G. H. JONES, W. L. HAENKE,
Essential oils from the Queensland Flora : IX. Melaleuca viridiflora.
Proc. C. Soc. Queensl. 1937, **48**, 41, 44.
- 201 - O. E. GUENTHER,
The essential Oils, Van Nostrand
New York, 1950, vol. V. 537-540.
- 202 - O. EKUNDAYO, I. LAAKSO, E. HILTUNEN,
Volatile components of Melaleuca Leucadendron (cajuput) oils.
Acta Pharm. Fenn. 1987, 96, 79-84.
- 203 - M. TODOROVA, I. OGNANOV, T. T. PHARM TRONG,
Composition of Vietnamese Essential Oil from Melaleuca Leucadendron L.
Perfum. Flavor. 1988, **13** (1), 17-18.
- 204 - O. MOTL, J. HODAKOVA, K. UBIK,
Composition of Vietnamese cajuput essential oil.
Flavour Fragrance J. , 1990, **5**, 39-42.
- 205 - A. R. P. RAMANOELINA, J. VIANO, J. P. BIANCHI, E. M. GAYDOU, M. ADRIANT-SIFERANA,
Chemical composition of Niaouli essential oils from Madagascar.
J. Essent. Oil Res., 1992, **4** (6), 657-658.

- 206 - M. MOUDACHIROU, J.D. GBENOU and al.,
Leaf oil of Melaleuca quinquenerva from Benin
J. Essent. Oil Res., 1996, **8** (1), 67-69.
- 207 - M. F. BEYLIER,
Bacteriostatic activity of some Australian essential oils,
Perfum, Flavor, 1979, **4**, 23-26.
- 208- J. J. BROPHY, E. V. LASSAK,
Melaleuca leucadendron L. Leaf oil two phenylpropanoid chemotypes
Flavour Fragrance J. 1988, **3**, 43-46.
- 209 - I. A. SOUTHWELL,
Australian tea tree Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type.
Chemistry in Australia, 1988, **55**, 400-402.
- 210 - J. J. BROPHY, N. W. DAVIES, I. A. SOUTHWELL, I. A. STIFF and L. R. WILLIAMS,
G. C. Quality control for oil of Melaleuca terpinen-4-ol type (Australian tea tree).
J. Agric. Food Chem., 1989, **37**, 1330-1335.
- 211 - J. J. BROPHY, and E. V. LASSAK,
Steam Volatile leaf oils of some Melaleuca species from W. Australia.
Flav. Frag. J., 1992, **7**, 27-31.
- 212 - J. J. BROPHY, D. J. BOLAND and E. V. LASSAK,
Leaf essential oils of Melaleuca and Leptospermum species from tropical Australia.
In Trees for the Tropics, p 193, ACIAR, Canberra (1989).
- 213 - M. KAWAKAMI, R.M. SACHS and T. SHIBAMOTO,
Volatile constituents of essential oils obtained from newly developed tea tree (Melaleuca alternifolia) clones.
J. Agric. Food chem., 1990, **38**, 1657-1661.
- 214 - G. R. DAVIS and R.M. SACHS,
Personal communication, (1990).
- 215 - I. A. SOUTHWELL and I. A. STIFF,
Definition between Melaleuca alternifolia and M. Linariifolia by monoterpenoid comparison.
Phytochemistry, 1990, **29**, 3529-3533.
- 216 - N. B. BYRNES,
A revision of Melaleuca L. (Myrtaceae) in northern and eastern Australia,
2 and 3.
Austrobaileya, 1985, **2**, 131-146, 354-373.
- 217 - R. T. BAKER and H. G. SMITH,
On the Australian Melaleucas and their essential oils Part III.
J. and Proc. Roy. Soc. NSW, 1910, **28**, 1047-1051.

- 218 - J. J. BROPHY and E. V. LASSAK,
The volatile leaf oils of Melaleuca armillaris, M. , disitiflora and M. trichostachya.
J. and Proc. ROY. Soc. NSW, 1983, **116**, 7-10.
- 219 - I. A. SOUTHWELL, I. A. STIFF and J. J. BROPHY,
Terpinolene Varieties of Melaleuca.
J. Essent. Oil Res., 1992, **4** (4), 363-367.
- 220 - J. P. M. WHISH and R. R. WILLAMS ,
Effect of post Harvest Drying on the Yield of Tea Tree oil (Melaleuca alternatifolia) ,
J. Essent. Oil Res. , 1996, **8** (1) 47-51.
- 221 - G. J. MURTAGH and A. CURTIS,
Post-Harvest Retention of oil in tea tree Foliage ,
J. Essent. Oil Res. , 1991, **3** (3), 179-184 .
- 222 - S-ZRIRA and B. BENJILALI,
Effect of Dryng on leaf Oil Production of Moroccan Eucalyptus camaldulensis,
J. Essent. Oil Res, 1991 , **3** (2) , 117-118.
- 223 - W. ROBYNS,
Flore du Congo Belge et du Rwanda-Urundi, Spermaphytes,
Vol.III, Bruxelles, (1951).
- 224- G. TROUPIN,
Flore du Rwanda. Spermaphytes,
INRS-Butane, Rwanda, Vol. I, (1985).
- 225 - U. KAZUYASU,
Essential oil of Chenopodium L. containg (-) - pinocarvéol as major component,
Nippon Nogei Kagaku Kaisha, 1978, **52** (3), 149-1950.
- 226 - F. BARDEAU et M. FELINEAU,
La médecine aromatique. Propriétés et utilisations des essences végétales,
Edition R. LAFFONT, Paris, (1981).
- 227 - D. L. J. OPDYKE,
Fragrance raw materials monograph. Chenopodium Oil Food Cosmet.,
Toxicol, 1974, **14**, Suppl., 713-715 .
- 228 -L. NTEZURUBANZA,
Journée nationale de concertation sur l'étude et l'exploitation des huiles essentielles au Rwanda,
Butare, Rwanda , (1988).
- 229 - L. VAN PUYELDE, N. DE KIMPE, F. X. AYOBANGIRA, E. HAKIZAMUNGU and
A. NSHIMYIMANA,
Screening of medecinal plants for ascaridal activity,
J. Ethnopharm. 1985, **13**, 209-215.

- 230 - W. KELLNER and W. KOBER,
Possibilities of the use of ethered oils for room disinfection,
Arzneimittel-forsch, 1954, **4**, 319-325.
- 231 - W. SIEVERS, A. ARCHER, R. N. MOORE and E. R. MC OVRAN,
Insecticidal tests of plants from Tropical America, *J. Econ.*
Entomol., 1949, **42**, 540-551.
- 232 - T. MORISHITA, T. TAGAMI and T. MATSUZAKA,
*Soil nematocide Control with *Chenopodium ambrosioides**,
JAPAN 77, **47**, 013, Nov. (1977).
- 233 - CONSEIL d'EUROPE 1981,
Flavoring substances and natural substances sources of flavoring,
3 th. ed., (1981).
- 234 - G. S. GUPTA and M. BEHARI,
*Chemical Investigation of *Chenopodium ambrosioides* oil*,
J. Indian Chem. Soc., 1972, **49** (3), 317-319.
- 235 - GUPTA G. S. and BEHARI M.,
*Indian *Chenopodium* oil*,
Indian Parfumer, 1975, **8** (2), 40-43
- 236 - B. LOUIZ, B. SIELVA and A. A GILBERTO,
*Essential oil of *Chenopodium ambrosioides* and *Schinus terebinthifolium* from Rio Grande do Sul*,
Rev. Bras. Farm., 1973, **54** (5-6), 240-242.
- 237 - G. A. FESTER, E. A. MARTINUZZI and A. I. RICCIARDI,
Volatils Oils IV
Rev. Fac. Ing. Quim., 1951, **20**, 47-60.
- 238 - A. G. NIKOLAEV,
*The Chemical constitution of Volatil oil of *Chenopodium anthelminticum**,
Referat. Zhum. Khim., 1955, **17**, 912.
- 239 - A. BELANGER,
Communication personnelle.
- 240 - T. TSUKAMATO, N. TAKAHASHI and T. NAKAJIMA,
*Essential oil of Wild *Chenopodium* III*,
Pharma. Soc. Japon, 1953, **73**, 1021-1022 .
- 241 - T. TSUKAMATO, N. TAKAHASHI and T. NAKAJIMA,
*Essential oil of Wild *Chenopodium* III. Structure of Aritasone*,
J. Pharma. Soc. Japon, 1952, **72**, 1036-1039.
- 242 - J. A. SALT, J. H. ALDER,
*Diversity of sterocomposition in the family of *Chenopodiaceae**,
lipids, 1985, **20** (9), 594-601.

- 243 - M. ARISAWA,
Studies on unitized resources. V. Components of flavonoids of C. ambrosioides,
Yokagaku Zasshi, 1971, **92** (5), 522-524.
- 244 - M. U. AHMED, S. K. HUSAIN, A. A. ANSARI and S. M. OSMAN,
Studies on herbaceous seed oils,
Oil Technol-Assoc. India, 1979, **11** (3), 70-72.
- 245 - CHIA MU HSU,
Non Volatils Chemicals constituents of Chenopodium ambrosioides,
J. Naiwan Pharm. Assoc, 1951,B, 2-7.
- 246 - F. GALLERO, A. S. MIRSKI and V. VILLAJO,
Essential Oil of Chenopodium botrys,
Farmacognosia, 1065, **25** (1-2),69-85.
- 247- J. DE PASCUAL- TERESA, I. S. BELLIDO, M. S. GONZALES,
Essential Oil from Young of Chenopodium botrys.
- 248 - J. DE PASCUAL- TERESA, I. S. BELLIDO, M. S. GONZALES,
Components of Chenopodiaceae. I. Sesquiterpenoids from Chenopodium botrys.
Ann, Quim., 1978, **74** (1), 91-96.
- 249 - A. M. EL-SAYED and M. A. YAHYA,
Chemical Component and microbial activity of the essential oil of Chenopodium botrys growing in Soudi Arabia,
Int.J. Crade Drug Res., **27** (4),185-188.
- 250 - G. B. RUTEMEKOVA, M. I. GORYAEV, A. D. DEMBISKII,
Substances Contained in essential oils. 58. Hydrocarbons of Jerusalem oak (Chenopodium botrys)
Izv. Akad. Nauk. S.S.R. Ser. Khim., **24** (1), 47-51.
- 251 - A. MUHAYIMANA,
Composition chimique d'huiles essentielles de plantes médicinales du Rwanda Etude particulière de Tagetes minotal. Activité antimicrobienne.
Thèse de Doctorat: Université Blaise Pascal de Clermont, Juillet (1995).
- 252 - R. R. PARIS et H. H. MOYSE,
Précis de matière médicale,
Masson édit., Paris, 1971, Vol 3.
- 253 - G. PETERSON, S. GLENN, M. A. KANDIL, M. D. ABDALLAH and A. A. FARAGAL,
Isolation and characterisation of biologicaly active Component from some extracts.
Pestic. Sci., 1989, **25** (4), 337-342.

- 254 - A. C. WILLIAMS and B. M. BARRY,
Essential Oils as noel Human skin penetration enhncers,
International Journal of Pharmaceutics. 1989, **57**, R7-R9.
- 255 - S. C. DATTA and K. N. GHOSH,
Allelopathy in two species of Chenopodium. Inhibition of germination and seedling growth of certains weeds,
Acta Soc. Bot. Pol., 1987, **2**, 257,270.
- 256 - M. JOHNSON and R. CROTEAU,
Biosynthesis of ascaridol. Iodide proxidase catalysed synthesis of a monoterpene endoperoxide of Chenopodium ambrosioides fruit.
Arch. Biophys., 1984, **51**, 254-256.
- 257 - T. YAMASHI,
Anthelmintic agent,
Brevet JAPAN 3644, (52) Sept., (1953).
- 258 - Y. HASHIMATO,
Anthelmintic comparaisn of effects on Ascaris suis Folia
Pharmacol.Japan., 1952, **48** (1), 52-64.
- 259 - B. M. WALTER, T. C. B. TOMASSINI, E. N. G. COULART, J. C. DE HOLANDA
and J. A. RIBERIO DA COSTA,
Anthelmintic activity of essential oil and their chemical component,
Acad. Bras. Science., 1972, **44**, suppl., 423-428.
- 260 - V. DAVIS and D. H. LE GEAR,
Oil of Chenopodium.
USA. 2, 742, 394, April 17, (1956).
- 261 - K. ENIGK,
Traitement of lungworms infections in ruminants withs aerosols,
Monutsh Twohelk, 1955, **5**, 14-22.
- 262 - G. DUVIAU,
Traitement of intestinal parasitism,
J. Med. Bordeaux, 1953, **130**, 44-51.

263- Y.R. NAVES,

Qu'est-ce qu'une huile essentielle?,

Parfum Cosm. Savons 1966, **9**, 200-209.

264- J. BRUNETON,

Eléments de phytochimie, Technique et Documentation

Lavoisier, 1986, Paris , 217-324.

265- A. M. JANSEN, J.J.C. SCHEFFER and A. BAERHEIN SVENDSEN,

Antimicrobial activities of essential oils.

A 1976-1986 Literature review on possible applications, Pharmaceutish weekblad
Scientific Edition, 1987, 193-197.

266- P. DUQUESNOIS,

Aromathérapie, mythe ou réalité,

Phytotherapy, 1986, **20**, 4-3.

267- R. ANTON,

Les médicaments aromatiques, une thérapeutique d'avenir,

Les Actualités pharmaceutiques, 1977, **154**, 23-30.

268- G. BALANSARD,

Plantes médicinales et phytothérapie,

Phytotherapy, 1985, 42-45.

269- M. GUILLOT,

Sur le pouvoir antiseptique des essences utilisées pour parfumer les cosmétiques,

Recherches, 1974, **19**, 119-130.

270- M. SIMEON DE BUOCHBERG,

*De l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Thymus vulgaris L. et de ses
constituants,*

Thèse Doct. Pharm., Université de Montpellier, 1976.

271- C. LENS-LISBONNE,

Evaluation de l'activité bactériologique d'huiles essentielles et de leurs constituants,
Thèse Doct. Pharm., Université de Marseille, 1988.

272- P. DUQUESNOIS,

Les médicaments aromatiques, leurs caractères, leurs contrôles,
Actualités pharmaceutiques, 1979, **154**, 17-22 .

273- R. MALHURET, P. BASTIDE, B. JOLY,

Essai d'utilisation pratique d'huiles essentielles en milieu hospitalier,
Phytotherapy, 1984, **11**, 17-24.

274- R. KOCH,

Zur untersuchung von pathogen organismen, Mitt. Kaiserl gesundb.
Amt., 1881, **1**, 234.

275- W. KELLNER, W. KOBERT,

Möglicheitein der verwendung ä therischer öle zur raumdesinfection,
Arzneim, 1954, **4**, 319-325.

276- J.C. MARUZZELLA and P.A. HENRY,

The antimicrobial activity of perfume oils,
J. Am. Pharm. Assoc., 1976, **47**, 471-476.

277- R. SARBACH,

Contribution à l'étude de la désinfection des atmosphères. Etude des propriétés antibactériennes de 54 huiles essentielles,
Thèse Doct. Pharm., Rennes, 1962.

278- T.L. JOUBERT, P. CHAMBON and M. GATTEFOSSE,

Détermination du pouvoir bactériostatique et bactéricide des essences pures et en mélanges,
Bull. Tec. Gattefossé S.F.P.A., 1958, **56**, 7-16.

279- D. FABRE,

Activité antimicrobienne des huiles essentielles: Comparaison de méthodes de détermination de l'activité de nouvelles huiles,

Thèse Doct. Pharm., Université de Clermont-Ferrand II, 1991.

280- J.G. VINCENT and V.N. VINCENT,

Filter paper disk modifications of the Oxford cup penicillin determination,

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1944, **55**, 162-164.

281- E. HETHELYI, B. DANOS, P. TETENYI and I. KOCZA,

G.C./M.S. analysis of the essential oils of four Tagetes species and antimicrobial activity of Tagetes minuta,

Flavour and Fragrance J., 1986,**1**,169-197.

282- S.R. JAIN and A. KAR,

The antimicrobial activity of some essential oils and their combinations,

Planta Med., 1971, **20**, 118-123.

283- R.T. YOUSSEF and C.G. TAWIL,

Antimicrobial activity of volatile oils,

Pharmazie, 1980, **35**, 698-701.

284- J.A. MORRIS, A. KHETTRY et E.W. SEITZ,

Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils,

J. Am. Oils Chem. Soc., 1978, **56**, 595-603.

285- A. MOREL et A. ROCHAIX,

Recherche sur le pouvoir interférant de quelques essences végétales,

Bull. Sci. Pharm., 1928, 631-634.

286- R. DABBACH, V. M. EDWARDS, W.A. MOATS,

Antimicrobial action of some Citrus fruit oils on selected food borne bacteria,

J. Appl. Microbiol., 1970, **19**, 27-31.

287- M. CHAMBERLAND,

Les essences au point de vue de leurs propriétés antiseptiques,
Ann. Inst. Pasteur, 1887, **1**, 153-154.

288- R. E. MILLER,

Bactericidal efficacy of some essential oils,
Am. J. Pharm., 1931, **103**, 324-328.

289- R. FABRE, L. CRUVEILLIER, B. MAGNIER DE LA SOURDE,

Exposés des procédés de contrôle appliqués aux appareils et aux produits destinés à la désinfection dite continue ou permanente,
Ann. Hyg. Publ. Ind. Soc., 1950, 250-277.

290- J. ALLEGRINI, M. SIMEON DE BUOCHBERG, H. MAILLOLS,

Emulsion d'huiles essentielles. Fabrication et applications en microbiologie,
Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1973, **33**, 73-86.

291- J. ALLEGRINI, M. SIMEON DE BUOCHBERG,

Une technique d'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles,
Prod. Prob., Pharm., 1972, **27**, 891-897.

292- K.A. BAUERSCHMITT et R. BENE,

Quelques notions concernant les substances tensioactives. Action du Tween 20 et du Tween 80,
Prod. Pharm., 1954, **9**, 644-647.

293- K.A. BAUERSCHMITT et R. BENE,

Quelques notions concernant les substances tensioactives,
Prod. Pharm., 1954, **9**, 715-721.

294- A.J. MONTE-BOVI,

The use of solubilized oils in the preparations of certain galenicals,
J. Am. Pharm. Assoc. Practical Pharm., 1950, **12**, 107-108.

302- D. LANGEVIN, J. MEUNIER et A.M. CEBAZAT,

Les microémulsions,

La Recherche, 1985, **16**, 700-728.

303- M. MARCHAMBON,

Solubilisation micellaire de l'huile de vaseline et de l'huile essentielle de bergamote.

Aspect physico-chimique et pharmacologique.

Thèse Doct. Pharm., Montpellier, 1982.

304- W.C. GRIFFIN, W.J. RANAUTO, A.D. ADAMS,

Nouvelles études sur les systèmes d'émulsions,

Parf. Cosmet. Savons, 1967, **10**, 113-120.

305- A. REMMAL, T. BOUCHIKKI, K. RHAYOUR, M. ETTAYEBI and A. TANTAOUI-ELAKI,

Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium,

J. Essent. Oil Res., 1993, **5**, 179-184.

306- J.C. CHALCHAT, R. Ph. GARRY, C. MENUT, G. LAMATY, J. CHOPINOT et R. MALHURET,

Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI- Activity of some african essential oils,

J. Essent. Oil Res., Jan./Feb.1997, **9**, 67-75.

307- A. GYSELINK,

Belg. Sto., 1959, 744, 16.

308- A. P. DEGTYAR'OVA et V. Y. POCHINOK,

Farm. Zhur., 1960, **15**, 47.

309- V. Y. RODINA,

Univ. Im. A. A. Zhdonova, Kiev, 1956, 32.

- 295- C.V. STEEN, A.D. MARCUS, P. MAZZOLA,
A study of aromatic water prepared by solubilizing oils
J. Am. Pharm. Assoc. Practical Pharm., 1952, **13**, 180-181.
- 296- P.J. SHINE, S. BASCOMB, H. GAYA, A. GLYNN, A.C. SPENCER and R.C. SPENCER,
Use of statical methods in rapid determination of bacterial susceptibility of Escherichia coli,
J. Antimicrob. Chemother., 1982, **9**, 343-355.
- 297- P.F. DOUGHERTY, D.W. YOTTER and T.R. MATTEWS,
Microdilutions transfer plate technique for determining in vitro synergy of antimicrobial agents,
Antimicrob. Agents Chemother. 1977, **11**, 225-228.
- 298- A. TURNER, P.M. HAWKEY, S.J. PEDLER,
Computer assisted determination of antibiotic susceptibility in photometer read microtiter plates,
J. Clin. Microb., 1983, **18**, 996-998.
- 299- A. LENS-LISBONNE, C. CREMIEUX, C. MAILLARD ET G. BALANSARD,
Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Applications aux essences de Thym et de Cannelle,
J. Pharm.Belge, 1987, **42**(5), 297- 302.
- 300- F. VENDEVILLE, P. LOISEL et E. GUIDE,
Intérêt d'une technique d'aromatogramme en phase liquide interprétable en 4 heures,
Phytotherapy, 1992, 20-25.
- 301- A. M. ORECCHIONI et M. SEILLER,
Solubilisation micellaire des huiles essentielles à l'aide de diagrammes ternaires,
Labo. Pharma. Plob. Tech. 1983, **31**, 333, 544-550.

310- M. GHUYSEN,

Microbiologie générale, t 1, 125, Ediscience/Mc Graw Hill, Paris, 1979.

311- S. PRAKASH, G. K. SINHA et., R. C. PATHAK,

I.O. & S. J, 1972, 230.

312- M. ADAMES, E. MENDOZA et L. S. O. DE NIGRINIS,

Revista Colombiana de Ciencias Quimico Farmaceuticas, 1983, 4 (1), 95.

313- M. F. BEYLIER,

Perfum. & Flavor., 1979, 4, 23.

314- J. C. MARUZELLA, J. BALTER et A. KATZ,

Am. Perfumer Aromat., 1959, 74 (2), 21.