



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

MENTION BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Master

Parcours : Biochimie, Biodiversité et Santé

**PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE
L'HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE D'ECORCES
D'*Ocotea macrocarpa*, UNE LAURACEAE ENDEMIQUE DE
MADAGASCAR**

Présenté par :

RAKOTOARISOA Fara Tiana

Maître-ès Sciences

Soutenu le 21 Avril 2017 devant la commission du jury, composé de :

Président : Professeur RANDRIANARIVO Ranjàna
Rapporteur : Professeur RASOLOMAMPIANINA Rado
Examineurs : Docteur RAZAFINDRAZAKA Vonimanitra
Docteur RANDRIAMIHARISOA Onja

REMERCIEMENTS

Nous remercions le **Seigneur** de nous avoir guidé chaque jour et de nous avoir donné la santé et la détermination à travers son Amour. Que son Nom soit glorifié !

Nous souhaiterions également adresser, à travers ces quelques lignes, notre plus profonde reconnaissance envers l'Université d'Antananarivo, le domaine des Sciences et Technologies, particulièrement, la mention de Biochimie Fondamentale et Appliquée, tous nos enseignants et plus particulièrement aux membres du Jury de ce mémoire :

Monsieur le Professeur **RANDRIANARIVO Ranjàna**, Chef de parcours de Biochimie, Biodiversité et Santé ; qui a bien voulu nous faire l'honneur d'être le Président du Jury et qui, malgré ses multiples engagements, a accepté d'apporter ses remarques et critiques constructives afin d'améliorer ce travail de recherches.

Madame le Docteur **RAZAFINDRAZAKA Vonimanitra**, qui a consenti à examiner avec attention ce document. Merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce travail, pour vos remarques pertinentes et votre disponibilité qui nous ont considérablement aidés.

Madame le Docteur **RANDRIAMIHARISOA Onja**, que nous ne remercierons jamais assez pour avoir accepté d'apporter ses considérations à ce mémoire, pour avoir su pardonner nos maladresses et rectifier nos erreurs et ce, malgré ses nombreuses obligations et responsabilités. Votre présence parmi les membres du Jury nous honore.

Monsieur le Professeur **RASOLOMAMPIANINA Rado**, rapporteur de ce mémoire, vous nous avez accordé une grande partie de votre temps tout au long de la réalisation de nos travaux de recherches mais a aussi su s'armer de patience et de dévouement pour que les fruits de ces travaux se concrétisent dans ce document. Vos précieux conseils nous ont beaucoup aidé. Nous vous adressons notre profonde gratitude pour votre grande disponibilité et vos conseils fructueux, mais aussi et surtout pour votre détermination, votre rigueur, ainsi que vos encouragements permanents.

Nous ne saurons oublier Madame le Professeur **REJO Fienena Félicitée**, Directeur du Centre National de Recherches sur l'Environnement (**CNRE**), pour son accueil chaleureux au sein de cette institution.

Nos sincères remerciements sont pour toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie de l'environnement (**LME**), à savoir, les chercheurs : le Professeur **RAMANANKIERANA**

Heriniaina, les Docteurs : **RANDRIAMBANONA Herizo**, **RAKOTOARIMANGA Nirina** et **BAOHANTA Rondro** et les stagiaires pour leur aide et conseils avisés.

Nous ne saurons passer sous silence la précieuse contribution de Monsieur **RALAMBONDRAHETY Rahanira**, un grand merci de nous avoir transmis l'estime de la recherche et de nous avoir guidé pas à pas tout au long de la réalisation des études physico-chimiques. Votre patience, votre disponibilité et vos nombreuses suggestions ont permis d'améliorer grandement la qualité de ce travail. Nous remercions également toute l'équipe du laboratoire de Chimie «Extraction et Analyse des produits naturels », à savoir, Monsieur **ANDRIANANTENAINA Rigobert**, Mademoiselle **CLEMENCE**, notre profonde gratitude vous revient pour votre soutien moral, vos encouragements et vos services.

Nous souhaiterions remercier le Docteur **RANDRIAMAMPIANINA Lovarintsoa**, responsable du LABASM (Laboratoire de Biochimie appliquée au Sciences Médicales) et toute son équipe de nous avoir accueilli et rendu service à la réalisation du test de toxicité dans son laboratoire.

Nous tenons à remercier vivement Monsieur **RABEHAJA Delphin**, Chercheur au sein de l'IMRA, pour la réalisation de la CPG dans son laboratoire.

Merci également à **toute la famille**, envers qui nous serons éternellement redevables pour tous les sacrifices, le dévouement et le soutien aussi bien moral que matériel dont elle a fait preuve depuis toujours.

Enfin, merci à tous ceux et toutes celles qui, de près ou de loin, nous ont aidés à mener à bien ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

GLOSSAIRE.....	i
LISTE DES ABREVIATIONS	ii
LISTE DES TABLEAUX	iii
LISTE DES FIGURES.....	iv
INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. GENERALITES SUR LA PLANTE	3
1.1. Le genre <i>Ocotea</i> à Madagascar	3
1.2. Usages du genre <i>Ocotea</i>	3
1.3. <i>Ocotea macrocarpa</i>	3
1.3.1. Classification	3
1.3.2. Description botanique	4
1.3.3. Distribution géographique	4
2. GENERALITE SUR LES HUILES ESSENTIELLES	5
2.1. Définitions	5
2.2. Caractéristiques	5
2.3. Localisation et rôles biologiques des huiles essentielles chez les végétaux.....	6
2.4. Composition chimique	6
2.5. Domaines d'utilisation des huiles essentielles	6
2.6. Différents procédés d'extraction	7
2.7. Toxicité des huiles essentielles	7
PREMIERE PARTIE : EXTRACTION ET ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'HE	
I.1. MATERIELS ET METHODES	8
I.1.1. Matériels.....	8
I.1.1.1. Le matériel végétal	8
I.1.1.2. Préparation du matériel végétal	8
I.1.2. Méthodes	8
I.1.2.1. Méthode d'extraction : l'hydrodistillation	8
a) <i>Principe</i>	8
b) <i>Mode opératoire</i>	9
I.1.2.2. Méthodes de caractérisation physique	9
I.1.2.2.1. Détermination de la densité relative	9
a) <i>Définition</i>	9

b) Principe	9
c) Mode opératoire	9
I.1.2.2.2. Détermination de l'indice de réfraction	10
a) Définition	10
b) Principe	10
c) Mode opératoire	10
I.1.2.2.3. Détermination du pouvoir rotatoire	10
a) Définition et principe	10
b) Mode opératoire	11
I.1.2.3. Méthodes de caractérisation chimique	11
I.1.2.3.1. Détermination de l'indice d'acide	11
a) Définition	11
b) Principe	12
c) Mode opératoire	12
I.1.2.3.2. Détermination de l'indice d'ester	12
a) Définition	12
b) Principe	12
c) Mode opératoire	12
I.1.2.3.3. Evaluation de la miscibilité à l'éthanol	13
a) Définition	13
b) Principe	13
c) Mode opératoire	13
I.1.2.4. Caractères organoleptiques	13
I.1.2.5. Analyse chimique	14
I.1.2.5.1. Chromatographie en phase gazeuse	14
a) Principe	14
b) Mode opératoire	14
I.1.2.6. Criblages phytochimiques	14
I.1.2.6.1. Préparation des extraits	14
a) Extrait brut	15
b) Extrait hydroéthanolique	15
I.1.2.6.2. Les différents tests de criblage phytochimique	15
I.1.2.6.2.1. Tests des Alcaloïdes	15
I.1.2.6.2.2. Tests des Flavonoïdes, des Leucoanthocyanes et d'Anthocyanes	16

I.1.2.6.2.3. Tests des Triterpènes et des Stérois insaturés.....	17
I.1.2.6.2.4. Test des Anthraquinones.....	17
I.1.2.6.2.5. Test des Saponosides	18
I.1.2.6.2.6. Tests des Tanins et des Polyphénols.....	18
I.1.2.6.2.7. Test des Polysaccharides	19
I.1.2.6.2.8. Test des Hétérosides cyanogénétiques.....	19
I.1.2.6.2.9. Test des Coumarines.....	19
I.2. RESULTATS	20
I.2.1. Rendement d'extraction de l'huile essentielle	20
I.2.2. Cinétique d'extraction.....	20
I.2.3. Caractéristiques physiques de l'huile essentielle	21
I.2.3.1. Densité relative.....	21
I.2.3.2. Indice de réfraction	21
I.2.3.3. Pouvoir rotatoire	21
I.2.4. Caractéristiques chimiques de l'huile essentielle.....	21
I.2.4.1. Indice d'acide	21
I.2.4.2. Indice d'ester	21
I.2.4.3. Miscibilité à l'éthanol.....	22
I.2.5. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle.....	22
I.2.6. Analyse chimique.....	22
I.2.6.1. Chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle.....	22
I.2.7. Criblage phytochimique	24
I.3. DISCUSSION	25
DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIOLOGIQUE DE L'HE	
II.1. MATERIELS ET METHODES	29
II.1.1. Matériels	29
II.1.1.1. Matériels biologiques.....	29
II.1.1.1.1. Les souches microbiennes.....	29
II.1.1.1.2. Les souris.....	29
II.1.1.1.3. Les larves de moustique	29
II.1.1.2. Les milieux de culture	30
II.1.2. Méthodes.....	30
II.1.2.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	30
II.1.2.1.1. Méthode des disques sur milieu solide ou aromagramme	30
a) Principe	30

b) <i>Mode opératoire</i>	30
II.1.2.1.2. Détermination de la CMI et CMB.....	31
a) <i>But</i>	31
b) <i>Définitions et principe</i>	31
c) <i>Mode opératoire</i>	31
II.1.2.2. Mise en évidence de l'activité antioxydante	33
a) <i>Test qualitatif par révélation au DPPH</i>	33
b) <i>Test quantitatif par mesure de l'activité antioxydante de l'huile essentielle</i>	33
II.1.2.3. Evaluation de la toxicité aiguë	34
a) <i>Définition</i>	34
b) <i>Principe</i>	34
c) <i>Mode opératoire</i>	34
II.1.2.4. Mise en évidence de l'activité sur les larves de moustique	34
a) <i>Test préliminaire</i>	34
b) <i>Test proprement dit</i>	35
c) <i>Détermination de la concentration létale (CL₅₀)</i>	35
II.2. RESULTATS.....	36
II.2.1. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle	36
II.2.1.1. Aromatogramme	36
II.2.1.2. Détermination de la CMI en milieu liquide	36
II.2.1.3. Détermination de la CMB	37
II.2.2. Activité antioxydante de l'huile essentielle	38
II.2.2.1. Test qualitatif par révélation au DPPH	38
II.2.2.2. Test quantitatif par mesure de l'activité antioxydante de l'huile essentielle suivant la méthode spectrophotométrie	38
II.2.3. Toxicité aiguë sur souris	39
II.2.4. Activité larvicide de l'huile essentielle.....	39
II.3. DISCUSSION.....	40
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	42
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	43
ANNEXES	

GLOSSAIRE

Acuminé : dont l'extrémité présente une pointe allongée et étroite

Anti-infectieuse : qui permet de lutter contre l'infection

Anti-inflammatoire : qui combat l'inflammation

Antioxydant : une substance ou molécule qui protège contre l'oxydation

Antiseptique : qui peut interrompre ou prévenir le développement de bactéries ou d'autres microorganismes

Aromathérapie : art de se soigner avec des huiles essentielles

Aromatogramme : une méthode *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

Apicule : pointe abrupte, courte, aiguë, non effilée à l'extrémité d'un limbe

Axillaire : situé à l'aisselle d'une feuille ou d'une bractée

Baie : petit fruit charnu contenant des pépins ou des graines

Condiment : substance ajoutée à un aliment pour l'assaisonner, en relever le goût

Coriace : ayant la consistance du cuir

Cupule : élément écailleux en forme de coupe protégeant les fruits

Discoïde : circulaire et aplati comme un disque

Glabre : dépourvu de toute pilosité

Lancéolé : dont la forme allongée et pointue aux extrémités, ressemble à un fer de lance

Panicule : type d'inflorescence dérivé d'un épi

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association Française de Normalisation

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

ATCC : American Type Culture Collection

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CL₅₀ : Concentration Létale à 50%

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNRE : Centre National de Recherches sur l'Environnement

CPG/DIF : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Détecteur à Ionisation de Flamme

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

ED : Eau Distillée

HE : Huile Essentielle

IA : Indice d'Acide

IC₅₀ : Concentration d'Inhibition 50%

IE : Indice d'Ester

IMRA : Institut Malgache de Recherches Appliquées

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

LME : Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement

MH : Mueller-Hinton

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ppm : partie par million

v/v : volume par volume

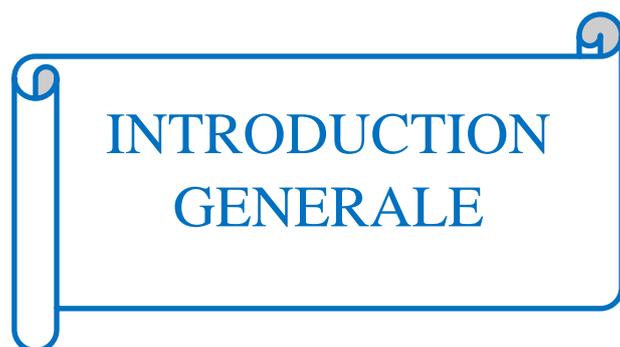
WHO : World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Rendement d'extraction de l'huile essentielle.	20
Tableau 2 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle.	20
Tableau 3 : Résumé des caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle.....	21
Tableau 4 : Résultat de la miscibilité à l'éthanol	22
Tableau 5 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle.....	22
Tableau 6 : Résultat de l'analyse par CPG/DIF de l'huile essentielle	23
Tableau 7 : Résultats du criblage.phytochimique	24
Tableau 8 : Lecture des résultats du test aromatogramme	31
Tableau 9 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle.	36
Tableau 10 : Détermination de la CMI en milieu liquide de l'HE vis-à-vis de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
Tableau 12 : Détermination de la CMB de l'HE sur <i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
Tableau 13 : Effets de l'huile essentielle sur les larves de moustique.	39

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Pied et rameau d' <i>Ocotea macrocarpa</i> .	4
Figure 2 : Répartition géographique de l'espèce <i>Ocotea macrocarpa</i> à Madagascar.....	5
Figure 3 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle.....	20
Figure 4 : Profil chromatographique de l'huile essentielle.	22
Figure 5 : Halos d'inhibition des deux souches sensibles à l'huile essentielle	36
Figure 6 : Résultats des cultures bactériennes pour la détermination de la CMB	37
Figure 7 : Profil chromatographique du criblage de l'activité antioxydante de l'huile essentielle.	38
Figure 8 : Courbe représentative de la concentration d'inhibition 50% du DPPH ou IC ₅₀	38
Figure 9 : Droite de régression linéaire pour la détermination de la CL ₅₀	39



INTRODUCTION
GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leur utilisation pour le traitement de plusieurs maladies chez l'homme est très ancienne (Svoboda et Svoboda, 2000) et s'améliore avec le temps grâce à l'évolution des recherches.

Les plantes offrent une solution de rechange aux médicaments. Les métabolismes des nutriments produisent plusieurs métabolites secondaires, que l'homme utilise dans son réserve thérapeutique. Il s'agit des principes actifs connus par leurs diverses activités biologiques, on en distingue plusieurs catégories telles que les polyphénols dont les principales sont les flavonoïdes, les huiles essentielles et les alcaloïdes. Cependant, cette utilisation ne se base sur aucun critère scientifique, elle tient compte simplement des observations au cours des siècles. Par ailleurs, les extraits des plantes et huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source de molécules naturelles bioactives (Von, 1958).

D'après l'estimation de l'OMS, environ 80% de la population mondiale ont essentiellement recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire (WHO, 1986). Cette dernière se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique ou mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, transmise de génération en génération (Bourgaud et *al.*, 2001). Les plantes médicinales constituent un groupe numériquement vaste et économiquement important. Elles demeurent encore une des formes de médecine la plus répandue dans les pays en voie de développement (Bahorun, 1997).

A partir des années 1970, quelques avancées scientifiques et thérapeutiques sur les huiles essentielles, démontrées par des chercheurs et des médecins, ont permis à l'aromathérapie de se positionner en tant que médecine de l'avenir et de sortir de son image d'utilisation issue de la tradition. Les chercheurs ont voulu lui donner une valeur scientifique en étudiant la composition des huiles essentielles et en attribuant aux propriétés thérapeutiques des molécules qu'elles contiennent (Zhiri, 2006). Ainsi, l'aromathérapie consiste à l'utilisation des huiles essentielles pour prévenir ou traiter les maladies et améliorer la santé et le bien-être. C'est une thérapeutique naturelle d'une remarquable efficacité, qui repose sur la relation existant entre les principes actifs contenus dans les huiles essentielles et les propriétés thérapeutiques qui en découlent (Wilson, 2002). De nos jours, nous comprenons de plus en plus que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits

des métabolites secondaires, qui sont largement utilisés en thérapie, comme des agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, mais aussi des antioxydants qui protègent contre le stress oxydatif (Bourgaud et *al.*, 2001).

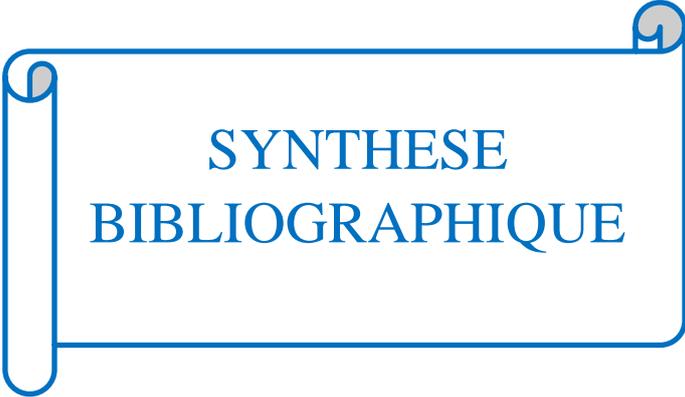
Madagascar abrite plusieurs écosystèmes très variés avec une nature extrêmement riche. La flore possède un très grand nombre d'espèces endémiques évaluées à 80% parmi les 12000 végétaux recensés. Cette flore est surtout connue pour son abondance en plantes médicinales et aromatiques (Rabesa, 1986).

En dépit des inventaires déjà effectués sur les espèces de plantes de Madagascar, un grand nombre d'entre elles n'ont pas encore été étudiées. *Ocotea macrocarpa*, de la famille des Lauracées, peut être comptée parmi ces dernières. En effet, à notre connaissance, aucune étude approfondie n'a été accomplie sur cette plante.

C'est dans ce contexte que ce présent travail, intitulé «Propriétés physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite d'écorces d'*Ocotea macrocarpa*, une Lauracée endémique de Madagascar» a été choisi. L'objectif principal de cette étude est de valoriser les plantes médicinales et aromatiques malagasy ainsi que de découvrir des propriétés biologiques intéressantes du matériel végétal. Cette plante fut utilisée en menuiserie et bois de construction, alors que par sa nature aromatique, elle pourrait être valorisée dans d'autres domaines comme l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire ou la cosmétologie.

Le présent travail a bénéficié des apports matériels, techniques et scientifiques du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE) et a été réalisé dans le cadre de son programme de recherche en collaboration avec l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA) pour la détermination des constituants chimiques de l'huile essentielle.

Cette étude se divise en deux parties : la première partie est consacrée à l'extraction et étude physico-chimique de l'huile essentielle et la seconde partie à l'étude biologique. La conclusion générale et les perspectives seront présentées à la fin de ce document.



SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur la plante

La famille des Lauracées est une grande famille botanique comportant plus de 2000 espèces réparties dans une cinquantaine de genres. Le genre *Ocotea* est représenté par environ 360 espèces dont 35 endémiques de Madagascar. C'est un grand arbre hermaphrodite à feuilles alternes. Ce genre est le seul représentant de la famille à Madagascar dont les fruits, ellipsoïdes à ovales, sont placés dans une cupule distincte (Schatz, 2001).

1.1. Le genre *Ocotea* à Madagascar

Ocotea appelé aussi « Varongy » est un arbre de dimension moyenne à grande, atteignant 20 à 30 m de haut et environ 80 cm de diamètre, à l'âge adulte. Les espèces d'*Ocotea* sont réparties dans les régions tropicales et subtropicales, souvent en haute altitude (jusqu'à 1300 m d'altitude). Ce sont aussi des plantes caractéristiques des forêts denses humides de l'île (Blaise et al., 2003).

1.2. Usages du genre *Ocotea*

Son bois est très connu et c'est l'un des plus utilisés sur les hautes terres et dans la partie orientale de Madagascar en menuiserie ordinaire. Ce bois est de couleur beige grisâtre, à la fois mi-lourd et mi-dur (Blaise et al., 2003). L'*Ocotea* est aussi exploité pour son aromaticité. En effet, il tient son titre de « plante médicinale » par sa capacité à produire des huiles essentielles (Jouhault, 2012), pourvues de propriétés antimicrobiennes.

1.3. *Ocotea macrocarpa*

1.3.1. Classification (Kostermans, 1950)

La plante appartient au :

Règne	:	Végétal
Sous-règne	:	Métaphytes
Embranchement	:	Spermaphytes
Sous-Embranchement	:	Angiospermes
Classe	:	Dicotylédones
Ordre	:	Lurales
Famille	:	Lauraceae
Genre	:	<i>Ocotea</i>
Espèce	:	<i>macrocarpa</i>
Nom vernaculaire	:	Varongy mainty

1.3.2. Description botanique

La figure 1 montre des photos d'un pied et d'un rameau feuillé d'*Ocotea macrocarpa*



Figure 1 : Pied et rameau d'*Ocotea macrocarpa*

Ocotea macrocarpa est un arbre persistant de hauteur entre 20 à 25 m, à rameaux grisâtres. Les feuilles sont alternes, raides-coriaces, glabres, lancéolées-elliptiques, les faces supérieures sont vertes, brillantes et lisses à nervures médianes saillantes, les faces inférieures sont plus pâles à nervures médianes saillantes. Des panicules axillaires, groupées au sommet des rameaux. Les fleurs sont à tépales assez étalés. C'est un arbre hermaphrodite dont l'ovaire est glabre, ellipsoïdal-ovoïde à stigmathe discoïde. Les baies sont ellipsoïdales-ovoïdes, souvent déprimées au sommet apicule, à cupules grandes et à pédoncule obconique (Kostermans, 1950).

1.3.3. Distribution géographique

Endémique de Madagascar, elle est répartie dans les provinces d'Antananarivo dans la région Analamanga, de Toamasina dans la région Alaotra-Mangoro et de Fianarantsoa dans la région Amoron'i Mania où le climat est humide ou subhumide (Web 1).



Figure 2 : Répartition géographique de l'espèce *Ocotea macrocarpa* à Madagascar

2. Généralités sur les huiles essentielles

2.1. Définitions

Le terme « huile essentielle » a été inventé au XVI^{ème} siècle par le médecin Suisse Parascelsus Von Hohenheim pour désigner le composé actif d'un remède naturel (Clevenger, 1928). C'est un produit volatil et odoriférant, généralement de composition complexe, obtenu par distillation à la vapeur des plantes aromatiques (Clarke, 2008).

L'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000) a défini les huiles essentielles comme étant des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de *Citrus* par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.

2.2. Caractéristiques

Les huiles essentielles (HE) sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles. Elles sont plus ou moins colorées, liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraînaibles à la vapeur d'eau (AFSSAPS, 2008). Les huiles essentielles se différencient entre elles par leurs caractéristiques organoleptiques, physiques et chimiques (Traore, 2001).

2.3. Localisation et rôles biologiques des HE chez les végétaux

Les huiles essentielles sont largement répandues chez les végétaux supérieurs. Elles sont élaborées au sein du cytoplasme de certaines cellules sécrétrices et peuvent être stockées dans tous les organes. Les constituants des HE permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement, ils peuvent agir comme des molécules d'interactions, attirent les agents pollinisateurs et assurent la défense des plantes. En effet, étant fixées au sol, les plantes n'ont que les composés chimiques issus du métabolite secondaire, stockés à l'endroit où ils seront plus utiles comme arme de défense contre les parasites et les prédateurs (Houël, 2011).

2.4. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants variés en concentration variable. Elles peuvent contenir jusqu'à 300 composés différents. Ces constituants appartiennent pour la grande majorité à la famille des terpènes (Bastien, 2008; Piochon, 2008). Les structures chimiques de quelques constituants des HE sont données en *annexe 1*.

Une même plante aromatique peut sécréter des HE de composition différente dans ses différents organes (par exemple, l'essence contenue dans le zeste d'oranger amer est différente de celle présente dans la fleur ou dans la feuille) selon le lieu géographique ou le biotope (nature du sol, climat, altitude, autres plantes présentes à proximité...) dans lequel elle est cultivée. Les essences sécrétées peuvent également varier en fonction du degré d'ensoleillement, de la saison ou du moment du cycle végétatif (Chassaing, 2006) d'où l'importance de connaître avec précision l'origine exacte d'une huile essentielle (type de plante, partie de la plante utilisée, origine géographique, moment de la récolte, technique de distillation adoptée,...) avant d'en envisager une quelconque utilisation à des fins thérapeutiques.

2.5. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Actuellement, près de 3000 huiles essentielles sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans le cadre d'applications pharmaceutiques, cosmétiques, agro-alimentaires ou dans le domaine de la parfumerie (Bakkali et *al.*, 2008 ; Tajkarimi et *al.*, 2010).

-En thérapie : les HE ont des applications importantes en médecine soit pour soulager la douleur, soit pour d'autres propriétés physiologiques, par exemple, l'HE d'*Eucalyptus globulus* (kininim-potsy) est très efficace pour le traitement de l'asthme et la sinusite, elle

possède des propriétés antiseptiques, l'HE d'*Eugenia caryophyllata* (girofle) est utilisée dans les extractions dentaires pour combattre les infections et les douleurs ainsi que d'empêcher le développement des germes microbiens en les détruisant, l'HE de *Cinnamomun zeylanicum* (cannelle) a des activités antispasmodique et anti-inflammatoire.

-En parfumerie : les HE constituent les matières premières indispensables pour la fabrication des parfums, l'industrie de la parfumerie traite d'importants tonnages d'essences telles que celles de jasmin, de rose, de citron,...

-En cosmétologie : grâce à leurs propriétés antiseptique et antioxydante, les HE permettent de conserver les produits cosmétiques dans lesquels elles sont incorporées, tout en gardant une odeur agréable comme le cas du basilic et du romarin à propriétés tonifiantes, du thym à propriété antipelliculaires,...

-En alimentation : les HE donnent la saveur aux condiments (gingembre, poivre). Elles sont aussi utilisées comme suppléments diététiques (Mohammedi, 2006).

2.6. Différents procédés d'extraction

Il existe actuellement plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles mais le choix du procédé se fait en fonction de la nature de la matière végétale à étudier ainsi que par le type de produits que l'on veut obtenir (Rabesa, 1986). L'extraction des HE peut s'effectuer par expression à froid, ce qui préserve l'intégrité de l'essence mais ne peut s'appliquer qu'aux plantes appartenant à la famille des Rutacées (Masango, 2005).

L'extraction par distillation se fait en exploitant la volatilité des composés aromatiques pour les séparer. Il existe deux formes de distillation : l'hydrodistillation où l'eau et le végétal sont chauffés ensemble dans un ballon et l'hydrodistillation par entraînement à la vapeur d'eau, où la vapeur est d'abord produite dans un ballon puis acheminée dans un second ballon, dans lequel elle va remonter en passant à travers le matériel végétal et en entraînant les composants aromatiques (El Haib, 2011). D'autres méthodes d'extraction ont également été mises au point comme l'hydrodiffusion pulsée et l'extraction aux fluides comme le CO₂ supercritique (Tuley, 1995).

2.7. Toxicité des huiles essentielles

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL₅₀ supérieures à 5g/kg. Chez l'Homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles (Laib, 2011).



PREMIERE PARTIE :
EXTRACTION ET ETUDE
PHYSICO-CHIMIQUE DE
L'HUILE ESSENTIELLE

A notre connaissance, aucune étude approfondie n'a été réalisée sur *Ocotea macrocarpa*. Dans cette première partie, l'étude des propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle d'*Ocotea macrocarpa* a été abordée. Elle concerne :

- l'extraction de l'huile essentielle d'écorces ;
- les indices physiques : densité relative, indice de réfraction et pouvoir rotatoire ;
- les indices chimiques : indice d'acide, indice d'ester et miscibilité à l'éthanol;
- les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle,
- l'analyse de la composition chimique par la chromatographie en phase gazeuse (CPG/DIF) ;
- le criblage phytochimique de la poudre et d'extrait d'écorces.

I.1. MATERIELS ET METHODES

I.1.1. Matériels

I.1.1.1. Le matériel végétal

La plante a été récoltée dans la forêt dense humide de Mandraka (18°54'32 42''S et 47°53'28 09'' E, 1300 m d'altitude) en avril 2016. Au cours de cette période, elle était au stade végétatif.

La plante a été ensuite identifiée au laboratoire de botanique du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza (PBZT) par comparaison avec l'herbier de référence n° 5260, déterminé en 1938 par André Kostermans.

I.1.1.2. Préparation du matériel végétal

Après triage, les écorces du tronc, séchées à température ambiante dans un endroit sec, propre et aéré pendant deux semaines, constituent notre matériel d'étude.

Les différents réactifs utilisés pour l'étude physico-chimique avec leurs compositions respectives sont donnés en *annexe 3*.

I.1.2. Méthodes

I.1.2.1. Méthode d'extraction : l'hydrodistillation

a) Principe

Le matériel végétal immergé dans l'eau a été porté à ébullition. Les principes aromatiques, libérés par les cellules de stockage, entraînés par la vapeur d'eau passent dans un réfrigérant puis recueillis dans l'essencier où ils se séparent par différence de densité.

b) Mode opératoire

Les écorces sèches du tronc d'*Ocotea macrocarpa* ont été découpées en petits morceaux. Elles ont été pesées et introduites dans le ballon d'extraction où l'eau distillée a été rajoutée de façon à les recouvrir. L'extraction a duré 8 h. Le rendement en HE est donné par la formule suivante:

$$R = \frac{\text{masse de l'huile essentielle obtenue (g)}}{\text{masse du matériel végétal utilisé (g)}} \times 100$$

L'appareillage utilisé pour l'extraction, de type Clevenger, est présenté en *annexe 3*.

I.1.2.2. Méthodes de caractérisation physique

Toutes les méthodes d'analyse et les formules présentées dans ce paragraphe proviennent du recueil de normes AFNOR (1992) (voir. *annexe 2*).

I.1.2.2.1. Détermination de la densité relative (NF-T 75-111)

a) Définition

La densité relative à 20°C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à 20°C.

b) Principe

A l'aide d'un pycnomètre, la mesure de la densité consiste à peser successivement de volumes égaux d'eau distillée et d'huile essentielle, à la température de 20°C.

c) Mode opératoire

Le pycnomètre de 5 ml, nettoyé et séché, a été pesé sur une balance de précision (Precisa XT 220A) et sa masse à vide est notée m_0 . Il a été ensuite rempli avec de l'eau distillée, puis pesé et sa masse est notée m_1 . Après séchage du pycnomètre, la même opération a été répétée cette fois avec l'HE en effectuant trois pesées successives dont la moyenne des trois valeurs obtenues est notée m_2 . Chaque lecture a été effectuée après une attente de 15 mn afin que la température se stabilise à l'intérieur de la balance. La densité relative à 20°C est donnée par la formule suivante :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

d_{20}^{20} : densité relative à 20°C

m_0 : masse du pycnomètre vide (g)

m_1 : masse du pycnomètre rempli d'eau (g)

m_2 : masse du pycnomètre rempli d'huile essentielle (g)

Si l'expérience a été effectuée à la température t , un facteur de correction selon (NF-T 75 -111) nous donne la valeur de la densité de l'échantillon à 20°C.

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} + 0,0007 (t - 20)$$

t : température ambiante au cours de la manipulation

I.1.2.2.2. Détermination de l'indice de réfraction (NF-T 75-112)

a) Définition

L'indice de réfraction notée n_D^t est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et celui de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

b) Principe

La mesure de l'indice de réfraction a été effectuée soit par mesure directe de l'angle de réfraction, soit par observation de la limite de réflexion totale, à l'aide d'un réfractomètre (KRÜSS A KRÜSS Optronic Germany).

c) Mode opératoire

Quelques gouttes d'HE ont été déposées sur le prisme du réfractomètre de manière à recouvrir complètement celui-ci. La lecture se fait par l'oculaire, lorsqu'une ligne de séparation entre la partie claire et la partie sombre apparaît dans le champ de vision. Le résultat considéré est la moyenne des valeurs obtenues après trois mesures. L'indice de réfraction des huiles essentielles varie de 0,0004 par degré autour de 20°C.

La formule suivante permet de calculer sa valeur à 20°C :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004 (t' - t)$$

n_D^t : La valeur de l'indice de réfraction à la température 20°C
 $n_D^{t'}$: La valeur de l'indice de réfraction à la température t'
 t' : température de la salle au moment de la mesure (°C)
 t : température de référence (20°C)

I.1.2.2.3. Détermination du pouvoir rotatoire (NF-T 75-113)

a) Définition et principe

Le pouvoir rotatoire noté α_D^t d'une HE est l'angle exprimé en milliradians et/ou en degrés d'angle avec lequel tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de

longueur d'onde correspondant aux raies D du sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 mm d'HE dans des conditions déterminées de température.

L'orientation du plan de vibration dépend de la capacité de la substance à dévier la lumière :

- si la substance est lévogyre (-), le plan tourne vers la gauche
- si la substance est dextrogyre (+), le plan bascule vers la droite

Remarque : la quantité de notre HE est insuffisante pour une mesure directe de son pouvoir rotatoire, le « pouvoir rotatoire spécifique apparent » noté $[\alpha]$ de l'HE est déterminé.

b) Mode opératoire

Un tube de 100 mm de longueur a été rempli d'eau distillée (ED), puis placé dans le polarimètre (KRÜSS A KRÜSS Optronic Germany) afin d'étalonner l'appareil. L'ED a été ensuite remplacée par de l'HE (0,48 mg) dans de l'éthanol 95° (10 ml). Après 10 à 15 mn, la valeur de l'angle de rotation du plan de polarisation a été lue sur l'oculaire de l'appareil lorsque la position d'équilibre entre les plages claires et sombres a été obtenue. Le pouvoir rotatoire est donné par la relation :

$$\alpha_D^t = \frac{A}{l} \times 100$$

Où α_D^t : pouvoir rotatoire

A : angle de rotation (en degré ou milliradian)

l : longueur du tube utilisé (mm)

Le pouvoir rotatoire spécifique apparent $[\alpha]$ est le rapport entre le pouvoir rotatoire α_D^t et la concentration C de l'HE dans la solution.

$$[\alpha] = \frac{\alpha_D^t}{C}$$

α_D^t : pouvoir rotatoire

C : concentration de l'HE exprimée en mg/ml de solution (0,048 mg/ml)

I.1.2.3. Méthodes de caractérisation chimique

I.1.2.3.1. Détermination de l'indice d'acide (NF-T 75-103)

a) Définition

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaires à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'huile essentielle.

b) Principe

Les acides libres de l'huile essentielle sont neutralisés par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée.

c) Mode opératoire

Deux grammes d'huile essentielle sont introduits dans un ballon, puis 5 ml d'éthanol 95° et 5 gouttes d'indicateur coloré (phénolphtaléine) y ont été rajoutés. Le tout a été ensuite titré avec la solution d'hydroxyde de potassium (0,1 N) contenu dans une burette. Le dosage s'est poursuivi jusqu'à l'obtention du virage persistant de la solution (rose). Le volume V de la solution de KOH utilisé est noté. L'indice d'acide est donné par la formule :

$$IA = \frac{5,61V}{m}$$

IA : indice d'acide

V : volume de KOH (0,1 N) utilisé (ml)

m : masse de la prise d'essai (g)

Remarque : la solution (rose) obtenue lors de la détermination de l'indice d'acide était réservée pour la détermination de l'indice d'ester.

I.1.2.3.2. Détermination de l'indice d'ester (NF-T 75-104)

a) Définition

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1 g d'huile essentielle.

b) Principe

Les esters contenus dans l'HE ont été hydrolysés par chauffage, en présence d'une solution éthanolique titrée de KOH (0,1 N). L'excès de KOH (qui n'a pas été fixé par les acides libérés) a été ensuite dosé avec une solution titrée de HCl (0,5 N).

c) Mode opératoire

Vingt-cinq millilitres de solution de KOH (0,5 N) avec quelques fragments de pierres ponce ont été ajoutés dans la solution précédente. Le tout a été porté à ébullition par chauffage à reflux pendant 1 h 30 mn. Après refroidissement, 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphtaléine à 2‰ y ont été rajoutés. Le KOH en excès a été dosé avec du HCl (0,5 N). Le volume de ce dernier ayant induit un virage persistant de la coloration a été noté V₁.

Parallèlement à cette manipulation, un essai à blanc (sans échantillon) était effectué dans les mêmes conditions.

La formule suivante permet de calculer l'indice d'ester puisque la détermination a été effectuée sur la solution provenant de la détermination de l'indice d'acide :

$$\text{IE} = \frac{28,05 (V_0 - V'_1)}{m}$$

IE : indice d'ester

V_0 : volume de HCl (0,5 N) utilisé pour l'essai à blanc (ml)

V'_1 : volume de HCl (0,5 N) utilisé pour la détermination (ml)

m : masse de la prise d'essai (g)

I.1.2.3.3. Evaluation de la miscibilité à l'éthanol (NF-T 75-101)

a) Définition

Une huile essentielle est dite miscible à V volumes d'éthanol de titre alcoométrique déterminé, à la température de 20°C, lorsque le mélange de 1 volume d'huile essentielle considérée avec V volumes de cet éthanol est limpide et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre, jusqu'à un total de 20 volumes.

b) Principe

Le test de miscibilité se fait par addition graduelle d'une solution titrée d'éthanol à une prise d'essai de l'huile essentielle, à 20°C, jusqu'à un certain volume.

c) Mode opératoire

Dans une éprouvette graduée de 50 ml, 1 ml d'HE a été introduit. Sous agitation constante à l'aide d'un vortex (Fisher Scientific Top Mix F315024), 20 ml d'éthanol à 90° y ont été versés progressivement par fractions de 0,1 ml. Quand le mélange devient limpide, le volume V d'éthanol versé est noté. Le dosage s'est poursuivi jusqu'à la dernière goutte d'éthanol.

I.1.2.4. Caractères organoleptiques

Pour pouvoir caractériser les HE, il est indispensable d'étudier leurs caractères organoleptiques, à savoir principalement leur aspect, leur couleur et leur odeur. Il s'agit d'utiliser les organes de sens humains, notamment les yeux pour l'aspect et la couleur, ainsi que le nez pour l'odeur.

I.1.2.5. Analyse chimique

I.1.2.5.1. Chromatographie en phase gazeuse

La CPG/DIF ou Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme est une méthode d'analyse par séparation des composés gazeux.

a) Principe

La séparation par CPG consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases : une phase mobile et une phase stationnaire. Les constituants de l'HE après son introduction dans la colonne chromatographique ont été immédiatement vaporisés sous l'effet de la chaleur. Ils ont été entraînés et séparés dans cette colonne par un courant de gaz vecteur et cheminant à des vitesses inégales par ce dernier. Ainsi, ils en sortent les uns après les autres.

b) Mode opératoire

Le dispositif de la CPG avec ses différents composants est donné en *annexe 1*. L'analyse par CPG de l'huile essentielle d'*Ocotea macrocarpa* a été réalisée au moyen d'un Chromatographe GC TRACE 1300 avec un injecteur automatique AI 1310, à colonne capillaire polaire UB-WAX (0,32 mm × 30 m × 0,25 µm). La température du four a été programmée de 50°C à 250°C. La température de l'injecteur et celle du détecteur FID ont été fixées à 250°C. Le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène (H).

Un volume de 0,2 µl d'HE a été introduit dans la colonne, une fois ionisées par la flamme, les molécules sortent en fonction de leur polarité et émettent des signaux qui seront capturés par l'enregistreur, puis intégrés sous forme de pics. L'ensemble de ces pics constitue le chromatogramme. Chaque constituant isolé correspond alors à un pic qui est caractérisé par un temps de rétention déterminé.

I.1.2.6. Criblage phytochimique

Le screening ou criblage phytochimique est une série de tests spécifiques pour détecter les grandes familles chimiques présentes dans la plante étudiée (Rahanira, 1994). Il a été caractérisé par des réactions de coloration et de précipitation des composés des grandes familles chimiques présentes dans les extraits.

Les méthodes décrites par Fong *et al.* (1974, 1977) ont été appliquées

I.1.2.6.1. Préparation des extraits

Les solutions à tester ont été préparées :

- soit à partir de la poudre végétale;
- soit à partir du résidu d'évaporation à sec de l'extrait à analyser.

a) Extrait brut

Les écorces séchées ont été broyées à l'aide d'un mixeur (Moulinex) afin d'obtenir des poudres pulvérisées. Ces dernières ont été conservées dans une boîte bien sèche à la température du laboratoire.

b) Extrait hydroéthanolique

La poudre du matériel d'étude (20 g) a été macérée à chaud avec 250 ml de mélange hydroéthanolique 80%. L'ensemble a été porté à reflux dans un bain-marie bouillant pendant une heure. Après, le mélange a été refroidi puis filtré sur Büchner. Le filtrat recueilli correspond à l'extrait hydroéthanolique.

Dans notre cas, le volume total de la solution hydroalcoolique était de 224 ml qui correspond à 20 g de poudre de matériel d'étude soit 1 g de plante en poudre équivaut à 11,15 ml d'extrait hydroéthanolique.

I.1.2.6.2. Les différents tests de criblage phytochimique

I.1.2.6.2.1. Tests des Alcaloïdes

Les tests de caractérisation de leurs présences se font en milieu chlorhydrique au moyen des réactifs de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF.

Le screening a été effectué en 2 étapes :

➤ Test préliminaire

Une poudre de 2,5 g a été humectée avec 10 ml de HCl 5%. Après filtration, le filtrat obtenu a été reparti en fractions égales dans 4 tubes à essai soit 2 ml dans chaque tube.

Le premier sert de témoin tandis que les trois autres sont utilisés pour les tests, respectivement à l'aide des réactifs de MAYER, de WAGNER et de DRAGENDORFF.

☐ *Test de MAYER*

Dans le tube n°2, 4 gouttes de réactif de MAYER y ont été ajoutées. L'apparition d'un précipité blanc ou d'une floculation indique la présence d'alcaloïdes dans l'extrait à analyser.

☐ *Test de WAGNER*

Dans le tube n°3, l'apparition d'un précipité blanc ou d'une floculation après ajout de 4 gouttes de réactif de WAGNER, montre la présence d'alcaloïdes dans l'extrait à analyser.

☐ *Test de DRAGENDORFF*

Dans le tube n°4 sont additionnées 4 gouttes de réactif de DRAGENDORFF. L'apparition d'un précipité dans ce tube désigne la présence d'alcaloïdes.

Si un précipité apparaît dans les 3 tubes, un test de confirmation est nécessaire.

➤ Test de confirmation

Un volume d'extrait hydroalcoolique équivalent à 2,5 g de matériel végétal a été évaporé à sec dans un cristalliseur au bain-marie bouillant jusqu'à obtention d'un résidu de consistance sirupeuse. 5 ml de HCl 2 N y ont été ajoutés, puis le mélange a été de nouveau porté au bain-marie pendant 5 mn, tout en agitant avec une baguette de verre. Après refroidissement, 0,25 g de NaCl a été additionné dans le mélange, puis le tout a été agité et filtré. Le filtrat a été ramené à 10 ml avec du HCl et divisée dans 4 tubes à essai. Les mêmes tests que précédemment ont été répétés.

I.1.2.6.2.2. Tests des Flavonoïdes, des Leucoanthocyanes et d'Anthocyanes

Deux tests sont mis à profit pour détecter la présence de plusieurs classes de flavonoïdes : le test de WILLSTÄTER et celui de BATE-SMITH.

□ Test de WILLSTÄTER ou test à la cyanidine

L'analyse a été effectuée sur l'extrait hydroéthanolique: dans un cristalliseur, l'équivalent à 3 g de poudre a été évaporé à sec au bain-marie. Après refroidissement, le résidu a été dépigmenté avec le *n*-hexane puis filtré. Cette opération doit répéter plusieurs fois jusqu'à l'élimination totale des pigments. Le résidu ainsi obtenu a été dissout dans 30 ml d'Et OH 80° puis filtré à nouveau. Le filtrat obtenu a été partagé en fractions égales dans 5 tubes à essai :

➤ Le premier sert comme témoin.

➤ Dans le deuxième tube, 0,5 ml de HCl concentré avec 3 ou 4 tournures de magnésium y ont été ajoutés. Après 10 mn, le changement de coloration a été observé :

- le rouge indique la présence de flavones,
- le rouge pourpre, celle de flavonols,
- le rouge violacé, celle de flavanones et de flavanols

➤ Dans le troisième tube, 0,5 ml de HCl concentré, 1 ml d'alcool isoamylique, puis 1 ml d'eau distillée et 3 ou 4 tournures de magnésium y ont été additionnés. Après 10 mn, si la coloration de la phase supérieure est :

- rouge, des flavones sont présents ;
- pourpre, des flavonols sont présents.

□ *Test de BATE-SMITH*

➤ Dans le quatrième tube, un volume de 0,5 ml de HCl concentré y a été versé, puis la solution a été chauffée dans un bain-marie à 100°C durant 30 mn. L'apparition d'une coloration rouge violacée indique la présence de leucoanthocyanes.

➤ Dans le cinquième tube, 0,5 ml de HCl concentré y a été versé, puis le tout a été laissé à une température ambiante pendant 30 mn. L'apparition d'une coloration rouge violacée montre la présence d'anthocyanes.

I.1.2.6.2.3. Tests des Triterpènes et des Stéroïdes insaturés

Ils sont mis en évidence par le test de LIEBERMANN – BURCHARD et celui de SALKOWSKI.

□ *Test de LIEBERMANN-BURCHARD*

Une solution hydroalcoolique équivalente de 10 g a été évaporée à sec, le produit obtenu a été traité plusieurs fois avec le *n*-hexane jusqu'à l'élimination des pigments. Puis 10 ml de chloroforme (CHCl₃) a été ajouté dans le résidu obtenu et en agitant pendant 5 à 10 mn. Après la décantation, la solution a été séchée avec du sulfate de sodium (Na₂SO₄), après filtration le filtrat obtenu a été reparti dans 3 tubes à essai :

➤ Le premier sert comme témoin.

➤ Trois gouttes d'anhydride acétique O(Ac)₂ ont été ajoutées dans le deuxième tube. Après une agitation légère, une goutte de H₂SO₄ concentré a été additionnée dans le mélange. Au bout de 1 h, si la coloration de la solution vire en bleu-vert, des stéroïdes sont présents, tandis que l'apparition d'une coloration rouge violacée ou rose indique la présence de triterpènes. Les deux phénomènes peuvent être observés simultanément.

□ *Test de SALKOWSKI*

➤ Le troisième tube a été incliné d'un angle de 45° puis 1 à 2 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré a été versé sur sa paroi en évitant d'agiter. Après 1h, le changement de coloration a été observé, l'apparition d'un anneau rouge à l'interface indique la présence de stéroïdes insaturés.

I.1.2.6.2.4. Test des Anthraquinones

Ces composés sont mis en évidence par le test de BÖRNTRAGER.

□ *Test de BÖRNTRAGER*

Une solution hydroalcoolique équivalente de 1g a été évaporée à sec, le résidu obtenu a été ensuite dissout dans 30 ml d'eau distillée puis filtré, le filtrat est extrait avec 10 ml de

benzène puis 5 ml de NH_4OH est ajouté dans l'extrait benzénique. Après la décantation, on observe le changement de coloration de la phase alcaline. Si la phase inférieure est colorée en rouge, les anthraquinones sont présentes dans le matériel d'étude.

I.1.2.6.2.5. Test des Saponosides

Les saponosides possèdent un pouvoir moussant en solution aqueuse. De ce fait, leur existence dans le matériel végétal étudié pourrait être mise en évidence. Pour cela, 100 mg de poudre ont été introduites dans un tube à essai avec 10 ml d'eau distillée. Puis l'ensemble a été agité vigoureusement en bouchant avec le pouce l'ouverture du tube durant 30 s. La présence des saponines se traduit par la formation d'une mousse de 3 cm de hauteur, persistant pendant 30 mn.

I.1.2.6.2.6. Tests des Tanins et des Polyphénols

Les tanins ont la propriété de précipiter en présence de gélatine. Ils réagissent aussi avec le chlorure ferrique (FeCl_3) en donnant une coloration bleu-noir ou vert-noir aux tanins « catéchiques » et une coloration noir-bleuâtre en présence de tanins « pyrogalliques ».

Un extrait hydroalcoolique équivalent de 10 g de poudre a été évaporé à sec dans un cristalliseur. 25 ml d'eau distillée chaude a été ajouté dans le résidu obtenu ainsi que 3 à 4 gouttes de NaCl 10%. Après filtration, le filtrat a été reparti en fractions égales dans 4 tubes à essai:

- Le premier sert comme témoin

☐ *Test à la gélatine*

- Quatre gouttes de gélatine 1% ont été ajoutées dans le deuxième tube, l'apparition d'un précipité indique la présence des polyphénols.

☐ *Test à la gélatine salée*

- Quatre gouttes de gélatine salée 10 % ont été ajoutées dans le troisième tube. La formation d'un précipité montre la présence de tanins.

☐ *Test au FeCl_3*

- Le dernier tube reçoit 4 gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3) en solution méthanolique. L'apparition d'une coloration bleu-vert ou vert-noir désigne la présence de tanins de type « Catéchiques », tandis que la coloration noir-bleuâtre indique la présence de tanins de type « Pyrogalliques ».

Notons qu'une réaction négative à la gélatine salée et une réaction positive au FeCl_3 signalent la présence de composés phénoliques autres que les tanins.

I.1.2.6.2.7. Test des Polysaccharides

Il se fait par macération à chaud d'une petite quantité d'extrait à analyser. Pour cela, 500 mg de poudre ont été placées dans un tube à essai puis de l'eau distillée a été versée à la moitié du tube, le tout a été porté à ébullition pendant 30 mn. Après filtration, de l'éthanol 95° à 3 fois de son volume a été additionné au filtrat obtenu. La formation d'un précipité indique la présence de polysaccharides.

I.1.2.6.2.8. Test des Hétérosides cyanogénétiques

Le test de GRIGNARD a été mis à profit pour détecter la présence de ces composés. Il a été effectué en 2 étapes :

➤ Préparation de bande

Le papier WHATMAN N°1 a été coupé sous forme de bande. Après avoir trempé dans une solution de picrate de sodium, la bande se colore en jaune, puis elle a été séchée en la laissant s'égoutter à l'air libre.

➤ Détection de la présence des hétérosides cyanogénétiques

Une poudre de 2 à 5 g a été humectée dans une cuve avec une quantité suffisante d'eau distillée et en ajoutant 1 ml de chloroforme. Après, la bande déjà séchée a été suspendue juste au-dessus de la poudre en pliant sa partie supérieure sur le bord interne du couvercle de la cuve puis fermée. L'observation du changement de coloration de la bande se fait pendant 3 h. Le dégagement de l'acide cyanique (HCN) est indiqué par un changement de coloration du papier test du jaune au rouge.

I.1.2.6.2.9. Test des Coumarines

Il se fait par observation sous UV (à $\lambda = 254$ nm) de la présence de fluorescence jaune-vert sur le papier Whatman imbibé de la soude (NaOH) 10%.

Un extrait hydroalcoolique équivalent de 100 mg de poudre a été évaporé à sec dans un cristalliseur sur bain-marie. 3 ml de méthanol a été additionné dans le résidu, puis le contenu a été versé dans un tube à essai ; ensuite le tube a été recouvert par un petit morceau de papier Whatman imbibé par une solution de soude (NaOH) 10%

Une observation sous une lampe à UV $\lambda = 254$ nm a été effectuée. La fluorescence jaune-vert sur le morceau du papier Whatman témoigne la présence de coumarines.

I.2. RESULTATS

I.2.1. Rendement d'extraction de l'HE d'*Ocotea macrocarpa*

L'HE d'*Ocotea macrocarpa* a été extraite par la méthode d'hydrodistillation. Le rendement en HE (tableau 1) est calculé selon la formule donnée au § I.2.1. (p.8).

Tableau 1 : Rendement d'extraction de l'huile essentielle

Matériel végétal	Masse moyenne (g) (± 0.05)	Masse d'HE obtenue (g) (± 0.0001)	Rendement (%)
écorces du tronc	400,50	2,98	0,74 ± 0.00

Le rendement d'extraction de l'HE des écorces d'*Ocotea macrocarpa* est de 0,74%

I.2.2. Cinétique d'extraction

Elle permet d'observer la quantité en ml d'huile essentielle obtenue en fonction du temps (tableau 2). 400,50 g de matériel végétal utilisé a donné après extraction 3,5 ml d'HE.

Tableau 2 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle

Temps (h)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8
Quantité ± 0,05 (ml)	0	0,6	1,2	1,4	1,6	1,9	2,1	2,3	2,4	2,6	2,8	3	3,2	3,4	3,5	3,5	3,5

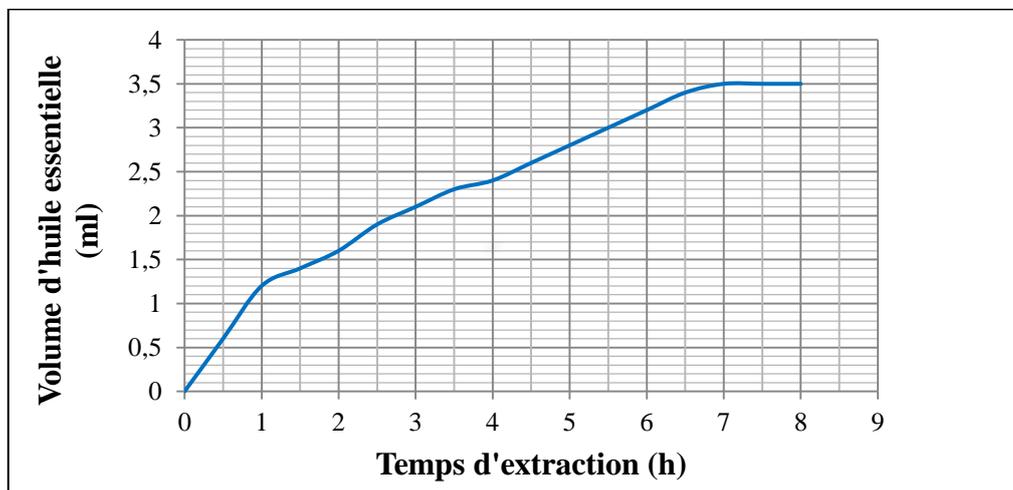


Figure 3 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle

La courbe comporte 2 parties successives :

- La première phase correspond à une phase ascendante de la quantité d'huile essentielle récupérée (1-7 h). La quantité d'HE obtenue augmente en fonction du temps.
- Au cours de la deuxième phase (7-8 h), un palier a été observé où la quantité d'HE ne croît plus en fonction du temps, elle est épuisée.

I.2.3. Caractéristiques physiques de l'huile essentielle

I.2.3.1. Densité relative

L'expérience a été réalisée avec une température de 23°C et la densité relative de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* à 20°C, calculée selon la méthode décrite au § I.1.2.2.1. (p.9) est:

$$d_0^{20} = 0,9629 \pm 0,001$$

I.2.3.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* à 20°C, calculée selon la méthode décrite au § I.1.2.2.2. (p.10) est:

$$n_0^{20} = 1,5050 \pm 0,0002$$

I.2.3.3. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire spécifique apparent $[\alpha]$ de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* à 20°C, calculée selon la formule donnée au § I.1.2.2.3. (p.10) est :

$$[\alpha] = + 22^{\circ}55$$

I.2.4. Caractéristiques chimiques de l'HE d'*Ocotea macrocarpa*

I.2.4.1. Indice d'acide

L'indice d'acide de l'HE d'*Ocotea macrocarpa*, obtenu en utilisant la méthode décrite au § I.1.2.3.1. (p.11) est :

$$IA = 4,07$$

I.2.4.2. Indice d'ester

L'indice d'ester de l'HE d'*Ocotea macrocarpa*, calculé en utilisant la formule décrite au § I.1.2.3.2. (p.12) est :

$$IE = 5,61$$

Le tableau 3 ci-dessous résume tous les résultats des caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle.

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle

Caractéristiques physico-chimiques	Densité (d_0^{20})	Indice de réfraction (n_0^{20})	Pouvoir rotatoire $[\alpha]$	Indice d'acide (IA)	Indice d'ester (IE)	Miscibilité à l'éthanol 90°
Valeurs obtenues	0,9629	1,5050	+ 22°55	4,07	5,61	5V/1V

I.2.4.3. Miscibilité à l'éthanol

Les volumes de l'huile essentielle et de l'éthanol utilisés pour la détermination de la miscibilité de l'huile sont présentés dans le tableau 4 suivant:

Tableau 4 : Résultat de la miscibilité à l'éthanol

Miscibilité à l'éthanol 90°	5V/1V
-----------------------------	-------

D'après ce résultat, il ne doit pas être nécessaire d'utiliser plus de 5 ml d'éthanol 90° (v/v) pour obtenir une solution limpide avec 1 ml d'HE.

I.2.5. Caractères organoleptiques

L'HE a un aspect limpide et colorée en vert-olive avec une odeur ressemblant à celle de la banane, caractéristique de la plante. Cette opération a été effectuée juste après l'extraction de l'HE. Le tableau 5 ci-après récapitule les caractères organoleptiques de l'HE :

Tableau 5 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle

Organe étudié	Aspect	Couleur	Odeur
écorces	limpide	vert-olive	Semblable à celle de la banane

I.2.6. Analyse chimique

I.2.6.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) de l'huile essentielle

L'analyse de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* par CPG/DIF donne le profil chromatographique présenté dans la figure 4 suivante.

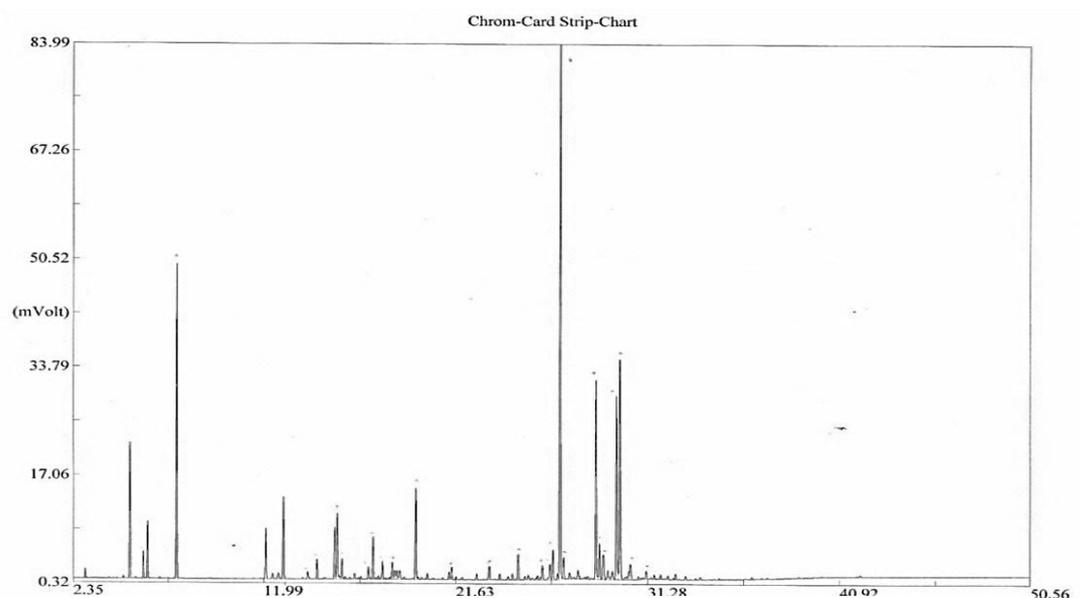


Figure 4 : Profil chromatographique de l'huile essentielle

Seuls les composés identifiés sont résumés dans le tableau 6 ci-après.

Tableau 6 : Résultats de l'analyse par CPG/DIF de l'huile essentielle

Pic n°	Temps de rétention (mn)	Nom du composé	Pourcentage du composé dans l'échantillon (%)
1	2,940	α -pinène	0,22
2	2,993	α -thujène	0,02
3	4,157	β -pinène	0,02
5	4,888	δ -3-carène	0,08
6	5,210	β-myrcène	3,98
7	5,503	α -terpinène	0,04
8	5,900	limonène	0,80
9	6,105	1,8-cinéole	1,69
10	6,718	(Z)- β -ocimène	0,05
11	7,577	<i>p</i>-cymène	9,40
13	12,092	α -cubébène	1,84
14	12,425	δ -élémente	0,21
16	12,963	α-copaène	3,06
18	14,185	benzaldéhyde	0,30
20	14,645	linalol	0,64
25	15,532	β-élémente	2,03
26	15,663	(E)-β-caryophyllène	2,65
28	15,898	terpinène-4-ol	0,82
31	16,537	cadina-3,5-diène	0,21
36	17,475	α -humulène	1,68
39	17,952	néral	0,83
42	18,353	α -terpinéol	0,07
43	18,448	germacrène D	0,76
44	18,565	β -sélinène	0,49
45	18,683	α -sélinène	0,41
46	18,827	α -muurolène	0,53
47	19,332	γ -cadinène	0,02
48	19,462	δ -cadinène	0,07
49	19,627	cadina-1,4-diène	3,64
57	21,425	germacrène-B	0,49
59	21,868	géraniol	0,04
68	24,783	oxyde de caryophyllène	1,04
73	25,770	époxyde de humulène II	0,17
76	26,275	cinnamaldéhyde	0,08
80	26,895	β-élémol	20,37
81	27,067	guaïol	0,94
83	27,578	épi- γ -eudesmol	0,05
85	27,850	rosifoliol	0,12
92	28,682	asaracin	7,55
95	29,283	δ -cadinol	0,54
96	29,510	γ -eudesmol	0,49
97	29,728	α-eudesmol	7,56
98	29,897	β-eudesmol	8,70

L'analyse par CPG/DIF de l'HE a permis de détecter 125 composés dont 43 sont identifiés (84,70%), et 83 (15,30%) sont inconnus. Les composants majoritaires sont : β -élémol (20,37%), *p*-cymène (9,40%), β -eudesmol (8,70%), α -eudesmol (7,56%), Asaracin (7,55%), β -myrcène (3,98%), cadina-1,4-diène (3,64%), β -élémane (3,06%), (*E*)- β -caryophyllène (2,65%) et β -élémane (2,03%).

I.2.7. Criblage phytochimique

Le tableau 7 ci-dessous résume les résultats de la détection des grandes familles chimiques. Les résultats détaillés sont développés en *annexe 3*.

Tableau 7 : Résultats du criblage phytochimique

Familles chimiques	Tests	Observations	Résultats
Alcaloïdes	Mayer	Précipitation très abondante	+++
	Wagner	Trouble très abondante	+++
	Dragendorff	Trouble très abondante	+++
Flavonoïdes	Willstätter	Coloration rouge violacé	++
	Willstätter modifié	Coloration rouge violacé	++
Leucoanthocyanes	Bate-Smith	Coloration rouge violacé	+++
Anthocyanes	Bate-Smith modifié	Coloration rouge pourpre	+++
Triterpènes	Liebermann Burchard	Coloration violet	+
Stérols insaturés	Salkowski	Anneau de séparation rouge	+++
Anthraquinones	Bornträger	Sans changement de coloration	-
Saponosides	Hauteur de la mousse	A t = 0 mn (h = 2 cm) ; à t = 30 mn (h = 0,5 cm)	-
Polyphénols	Gélatine 1%	Précipitation très abondante	+++
Tanins	Gélatine salée	Formation de précipité	+++
	FeCl ₃	Solution vert-noir	++
Polysaccharides		Précipitation faible	+
Hétérosides cyanogénétiques	Grignard	Sans changement de coloration	-
Coumarines		Fluorescence bleu-violacé	-

+++ : Très abondante, ++ : Abondante, + : Faible quantité, - : Absence

I.3. DISCUSSION

D'une part, la connaissance des caractéristiques physico-chimiques d'une huile essentielle est primordiale puisqu'elle permet de la caractériser ou même de l'identifier (Lazouni et *al.*, 2007). D'autre part, l'identification de ses constituants est aussi très importante car ses propriétés biologiques sont directement liées à sa composition chimique.

La méthode d'hydrodistillation a été utilisée pour extraire l'HE d'*Ocotea macrocarpa*. Le rendement d'extraction est de 0,74%. Il est inférieur à celui des autres espèces d'*Ocotea* : *Ocotea laevis* (0,77%), *Ocotea cymosa* (1,50%) et *Ocotea zahamenensis* (4,5%) (Razafindrakoto, 2010 ; Sehenaspiera, 2011 ; Mohamed, 2011). Cela prouve que la teneur en HE peut varier d'une plante à l'autre et aussi suivant l'organe sécréteur. Cependant, il est supérieur à celui de Katrafay (*Cedrelopsis grevei*, RUTACEES) 0,1% (Michat, 2006).

La densité à 20°C de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* est égale à 0,9629. Elle est qualifiée de HE légère de même que celle d'*Ocotea cymosa* (0,8618) et d'*Ocotea laevis* (0,9118) car elles ont des densités inférieures à celle de l'eau (densité = 0,9982). Il existe cependant des huiles lourdes qui ont une densité supérieure à l'eau comme celle d'*Ocotea zahamenensis* qui est de 1,085 (Mohamed, 2011) ; de la canelle (*Cinnamomum zeylanicum*, LAURACEES) et du girofle (*Eugenia caryophyllata*, MYRTACEES) dont les densités sont respectivement de 1,042 à 1,063 et 1,025 à 1,065 (Michat, 2006).

L'indice de réfraction (Ir) de l'HE est de 1,5050, identique à celui de l'HE de *Pogostemon cablin* (LAMIACEES) (AFNOR, 1992) et à peu près semblable à celui de l'HE d'*Ocotea laevis* (1,4944), supérieur à ceux des HE de *Cinnamomum camphora* (LAURACEES) et d'*Eucalyptus globulus* (MYRTACEES) dont les Ir sont respectivement de 1,465 et 1,459 à 1,467. Selon la littérature, les HE ont un Ir généralement élevé, supérieur à celui de l'eau (Ir de l'eau= 1,333) (Guenter, 1975). L'Ir permet de vérifier la pureté de l'HE ou d'un produit c'est-à-dire qu'un indice de réfraction constant indique que le produit est pur (AFNOR, 1992).

Le pouvoir rotatoire spécifique apparent de l'HE est de + 22°55, cela indique que l'HE d'*Ocotea macrocarpa* contient en majorité des molécules chirales qui sont optiquement actives et capables de dévier le plan de polarisation de la radiation lumineuse vers la droite (dextrogyres). Il a été démontré que la plupart des HE sont douées d'un pouvoir rotatoire (Guenter, 1975) et selon des normes plus récentes, une HE est de bonne qualité si son pouvoir

rotatoire est positif. (Ranaivoarisoa et Randriamiharisoa, 1989). On peut dire donc que l'HE d'*Ocotea macrocarpa* dispose, à ce point de vue, de cette bonne qualité.

L'indice d'acide (IA) d'une HE est un critère d'estimation de sa qualité, plus elle est faible, plus l'HE est de bonne qualité (De Cliff et Harerimana, 2013). L'IA de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* qui est de 4,07 s'avère supérieur à celui d'*Ocotea zahamenensis* (2,53) et *Ocotea laevis* (2,80) (Razafindrakoto, 2010 ; Mohamed, 2011). Autrement dit, *Ocotea macrocarpa* renferme plus d'acides libres que les deux autres plantes. Ce fait s'explique soit par la dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation, soit par la présence de groupements acides libres dans l'HE, notamment sur les sesquiterpènes bicycliques. Par ailleurs, une IA inférieure à 2 est une preuve de bonne conservation de l'HE (Boukhatem *et al.*, 2010) d'où, l'HE d'*Ocotea macrocarpa* n'a pas été conservée dans les meilleures conditions qui sont encore à déterminer.

L'indice d'ester (IE) permet de déterminer la qualité d'une HE. Il est admis que plus l'indice d'ester est élevée plus l'huile essentielle est de bonne qualité (Hilan *et al.*, 2006). L'IE de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* est de 5,61 contre 12,62 et 8,69 toujours pour les deux échantillons cités ci-dessus. Ainsi, l'HE d'*Ocotea macrocarpa* contient moins d'acides libérés par hydrolyse que celle de ces deux autres plantes. Ceci peut être dû à une faible teneur en esters de l'HE. D'après la valeur de l'IA (voir § précédente), les acides libres sont abondants, donc il y a peu d'estérification.

L'huile essentielle d'*Ocotea macrocarpa* est miscible à l'éthanol 90° avec des volumes d'éthanol et d'HE respectivement de 5 ml et 1 ml. Il s'agit d'une huile limpide, de couleur vert-olive et d'odeur semblable à celle de la banane, caractéristique de la plante.

L'analyse de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* par CPG/DIF a révélé 125 pics correspondant donc à 125 composés. Les composés identifiés sont constitués par des monoterpènes (14,61%), sesquiterpènes (18,09%) et des produits oxygénés (52%). Des propriétés pharmacologiques spécifiques sont liées à chaque composé des huiles essentielles. Pour le cas d'*Ocotea macrocarpa*, citons uniquement quelques composants majoritaires :

- Le β -élémol (20,37%), un composé organique aromatique de la famille des sesquiterpènes oxygénés. Il est utilisé : comme agent fixatif, en parfumerie, soin de beauté, dans la blanchisserie, dans les produits de ménage (Web 2).

- Le *p*-cymène (9,40%), un composé organique aromatique naturellement présent dans certaines plantes, notamment le cumin. De la famille des monoterpènes, le *p*-cymène est

l'analogue du *p*-menthane, il est inaltérable à l'air, insoluble dans l'eau, mais miscible en toutes proportions dans l'éthanol et l'éther.

- Le β -eudesmol (8,70%), un composé organique aromatique de la famille des sesquiterpènes oxygénés. Il possède des propriétés anti-inflammatoire et antimicrobienne (Web 3).

- Le β -myrcène (3,98%) de la famille des hydrocarbures monoterpéniques peut être extrait de plusieurs plantes comme la menthe, le persil ou l'ylang-ylang. Il est un intermédiaire essentiel utilisé en parfumerie. Il est donc de plus grande valeur en tant qu'intermédiaire pour la préparation des arômes et parfums tels que le menthol, le citral, citronellal et linalol. Le β -myrcène est réputé pour ses propriétés anti-inflammatoire, sédative et jouent un rôle important dans le traitement de la douleur. Selon une étude plus récente, neuf composés (α - pinène, β - pinène, β - élémène, β - caryophyllène, α - humulène, germacrène-D, γ - cadinène, δ -cadinène et α - cadinol) sont communs pour dix espèces d'*Ocotea*. Ces neuf composés sont aussi apparemment les composants communs d'autres genres des lauracées (par exemple : *Cinnamomum*, *Laurus*, ...). (Sayaka et al., 2007). L'HE d'*Ocotea macrocarpa* contient huit des neuf composés communs, l' α - cadinol n'a pas été rapporté, ce dernier est l'une des différences existantes entre l'HE d'*Ocotea macrocarpa* et les dix autres espèces d'*Ocotea*. Les composés oxygénés (52% pour l'HE d'*Ocotea macrocarpa*) sont très odorants donc plus précieux (Cheetham, 2010).

Ainsi, l'HE d'*Ocotea macrocarpa* aurait des propriétés thérapeutiques qui seraient encore à confirmer. Le criblage phytochimique de la poudre et l'extrait des écorces d'*Ocotea macrocarpa* a révélé la présence :

- Des alcaloïdes qui affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques et possèdent plusieurs propriétés biologiques: analgésique (cocaïne), anti-malaria (quinine), stimulant centrale (caféine), anti-hypertensive (reserpine), antitussive (codeine),... (Badiaga, 2011).

- De tanins qui ont un pouvoir cicatrisant en favorisant la régénération des tissus en cas de blessure superficielle (Brunet, 2008). Ils sont aussi reconnus comme des antioxydants, ayant une propriété astringente, anti-diarrhéique, antimicrobienne et anti-inflammatoire dans les brûlures (Paris, 1965).

- Des polyphénols : L'activité antioxydante des polyphénols assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant

contre la production des radicaux libres néfastes pour la santé et la beauté de la peau. (Hennebelle et *al.*, 2004).

- Des leucoanthocyanes : ces substances ont une action diurétique (Pousset, 2004).

- Des anthocyanes : en phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes de polyphénols, les propriétés vasculo-protectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes (Hennebelle et *al.*, 2004).

- Des triterpènes : ces composés ont des activités cytostatique, anti-inflammatoire, analgésique et insecticide. Ils sont aussi utilisés comme produits pharmaceutiques, colorants alimentaires, arômes ou parfums.

- Des stérols insaturés : jouent un rôle important dans la défense contre les microorganismes (Bruneton, 1987). Ils ont un rôle vital dans la maintenance de l'intégrité structurale de la plupart des structures membranaires des organismes (Benaïssa, 2011).

- Des flavonoïdes : ces substances ont des activités antiallergique, anti-inflammatoire, hépato-protective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne et cardio-protective (Middleton et *al.*, 2000 ; Ksouri et *al.*, 2007). Ils ont montré des effets protecteurs contre les cancers de la prostate, du côlon et du poumon (Nkhili, 2009).

- Des polysaccharides : elles sont connues pour l'amélioration du transit intestinal et ont un effet favorable sur la flore intestinale. Elles jouent le rôle de protection de tissu contre la dessiccation du fait de leur pouvoir hydrophile et maintenir la rigidité des parois cellulaires (Charrouf et Guillaume, 1999).



DEUXIEME PARTIE :
ETUDE BIOLOGIQUE DE
L'HUILE ESSENTIELLE

L'extraction de l'huile essentielle d'écorces d'*Ocotea macrocarpa* a abouti à l'obtention d'une huile essentielle, en quantité suffisante, pour réaliser les tests de ses activités biologiques sur certains organismes. Les huiles essentielles constituent une source intéressante de nouvelles molécules bioactives (Piochon, 2008). Ainsi, cette deuxième partie servira à l'étude de :

- l'activité antimicrobienne ;
- l'activité antioxydante ;
- la toxicité aigüe sur souris;
- l'activité sur les larves de moustique.

II.1. MATERIELS ET METHODES

II.1.1. Matériels

II.1.1.1. Matériels biologiques

II.1.1.1.1. Les souches microbiennes

Les germes-tests utilisés lors de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'HE proviennent de la collection des souches du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du CNRE. Ces souches comprennent 3 bactéries Gram positive : *Bacillus cereus* ATCC 13061, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301 ; 5 bactéries Gram négative : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteridis* ATCC 13067, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterobacter cloacae* ATCC 700323 et une levure *Candida albicans*.

II.1.1.1.2. Les souris

Les souris (*Mus musculus*) de souches OF1, stabilisées depuis plusieurs années à l'IPM, de race TANA-SWISS, et élevées dans le laboratoire de Biochimie Fondamentale et Appliquée ont été utilisées durant le test de toxicité.

II.1.1.1.3. Les larves de moustique

Les larves de moustique *Culex quinquefasciatus* au stade III de leur développement ont été utilisées pour évaluer l'activité larvicide. Elles ont été recueillies dans les eaux stagnantes aux alentours du Parc Tsimbazaza.

Les différents réactifs utilisés pour l'étude biologique sont donnés en *annexe 4*.

II.1.1.2. Les milieux de culture

Quatre milieux de culture ont été utilisés pour l'étude de l'activité antimicrobienne :

- *Milieu Gélose Nutritif*: un milieu solide employé pour la culture des bactéries non exigeantes en éléments nutritifs. Il permet aussi de détecter la pureté des souches.
- *Milieu Mueller-Hinton (MH)*: un milieu solide utilisé pour mettre en évidence l'activité de l'huile essentielle vis-à-vis des germes pathogènes.
- *Milieu Sabouraud* : un milieu solide qui sert à cultiver les champignons
- *Bouillon Nutritif (BN)* : un milieu liquide utilisé pour revivifier les souches de microorganismes

La composition de chaque milieu est donnée en *annexe 4*.

II.1.2. Méthodes

II.1.2.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne :

II.1.2.1.1. Aromatogramme

a) Principe

Le principe de l'aromatogramme repose sur la diffusion du composé antimicrobien sur milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le composé et le microorganisme-cible (Benjelali et *al.*, 1986).

b) Mode opératoire

➤ **Préparation de l'inoculum**

Pour chaque souche-test, un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 24 h sur gélose nutritive pour les bactéries et sur milieu Sabouraud pour la levure. Trois à cinq colonies bien isolées ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile et diluées dans 10 ml d'eau distillée, puis la turbidité de l'ensemble a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de manière à obtenir une densité optique égale à 0,125 (DO= 0,125) à une longueur d'onde de 550 nm qui correspond à 10^6 cellules/ml (Isu et Onyeagba, 2002).

➤ **Ensemencement**

La surface entière du milieu Mueller-Hinton solide a été inondée avec 10 ml d'inoculum de 10^6 cellules/ml de germe. La culture a été incubée dans une étuve à 37°C pendant 15 mn afin que les germes puissent adhérer au milieu. Puis, l'excès de liquide a été aspiré à l'aide d'une pipette stérile et le milieu a été séché pendant 15 mn dans une étuve à 37°C.

➤ **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, des disques de 6 mm de diamètre préalablement imbibés de 10 µl d'HE à tester ont été déposés sur le milieu Mueller-Hinton pré-ensemencé avec des cultures pures des germes-tests. Les boîtes de Pétri ont été ensuite fermées et laissées à température ambiante pendant 30 mn; puis mises à l'étuve à 37°C pendant 24 h. Les résultats exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque sont interprétés comme suit selon la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle (tableau 8).

Tableau 8 : Lecture des résultats du test aromatoگرامme selon Ponce et *al.* (2003)

Diamètre d'halo d'inhibition (x)	Degré de sensibilité des germes
x < 8 mm	Insensible ou résistante
9 mm < x < 14 mm	Sensible
15 mm < x < 19 mm	Très Sensible
x > 19 mm	Extrêmement sensible

II.1.2.1.2. Détermination de la CMI et CMB

a) But

Déterminer la CMI ou concentration minimale inhibitrice et la CMB ou concentration minimale bactéricide de l'huile essentielle sur une souche très sensible du test aromatoگرامme précédent.

b) Définitions et principe

-La CMI est la plus petite concentration de l'HE à tester capable d'inhiber la croissance des microorganismes après un temps d'incubation de 24 h (Duval et Soussy, 1990). Elle a été déterminée soit par la méthode des disques sur milieu solide, soit par la méthode de dilution en milieu liquide.

- La CMB est définie comme étant la plus faible concentration de l'HE à tester qui tue 99,9% des bactéries après 24 h d'incubation (Benjlali et *al.*, 1984). Elle a été évaluée par numération sur milieu solide des cellules viables provenant des milieux liquides limpides obtenus lors de la détermination de la CMI.

c) Mode opératoire

Toute détermination a été faite sur la souche *Streptococcus pneumoniae* qui est la plus sensible à notre HE.

c₁) Détermination de la CMI

➤ **Méthode utilisée pour déterminer la concentration de l'HE**

A partir de sa densité relative, la concentration de l'huile essentielle pure (mg/ml) a pu être calculée. En effet, la valeur de la densité absolue exprimée en g/ml est donnée par la formule :

Densité absolue = d x 0,9982

Densité relative de l'HE à 20°C = 0,9629

0,9982 : densité absolue de l'eau à 20°C (g/ml)

D'après cette formule, la densité absolue (donc la concentration) de l'huile essentielle d'*Ocotea macrocarpa* est égale à **0,9629 g/ml** soit **962,9 mg/ml**.

➤ **Préparation de l'inoculum**

Une colonie isolée de la souche microbienne à tester a été prélevée à l'aide d'une anse stérile et homogénéisée dans 10 ml de bouillon nutritif liquide. Le tout a été ensuite incubé pendant 24 h à 37°C pour avoir une pré-culture. Cette dernière, diluée de manière à obtenir une densité optique égale à 0,125 (DO= 0,125) à une longueur d'onde de 550 nm correspondant à 10⁶ cellules/ml, sert d'inoculum.

➤ **Gamme de concentrations de l'huile essentielle**

Parmi les 11 tubes préparés, 10 tubes renferment 5 ml de bouillon nutritif (BN) stérile et le dernier contient 9 ml de BN et 1 ml d'huile essentielle pure servant de solution mère (SM) dont la concentration est de 96,29 mg/ml. A partir de cette solution mère, une série de 10 dilutions avec du BN liquide (coefficient de dilution égal à 0,5) a été réalisée dans les tubes restants. Les concentrations sont donc de 48,14 mg/ml, de 24,07 mg/ml, de 12,03 mg/ml, de 6,01 mg/ml, de 3 mg/ml, de 1,5 mg/ml, de 0,75 mg/ml, de 0,37 mg/ml, de 0,18 mg/ml et de 0,09 mg/ml respectivement.

Deux tubes sont aussi préparés, le premier contient 10 ml de BN stérile qui sert de témoin positif (présence d'activité antibactérienne) et le deuxième a reçu 9 ml de BN et 100 µl d'inoculum mais dépourvu d'huile essentielle servant de témoin négatif.

➤ **Inoculation**

L'inoculum a été distribué dans tous les tubes expérimentaux (numérotés de 1 à 10) et dans la solution mère, à raison de 100 µl par tube. Par la suite, ils ont été incubés dans une étuve à 37°C pendant 24 h. La lecture des résultats a été effectuée par comparaison de la

turbidité du contenu des tubes expérimentaux avec les tubes témoins. La croissance des bactéries se traduit par un aspect trouble du milieu de culture. Par contre, le milieu reste limpide en cas d'inhibition de la multiplication bactérienne. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'HE pour laquelle l'aspect de la culture demeure limpide.

C₂) Détermination de la CMB

Les contenus des tubes utilisés pour la détermination de la CMI en milieu liquide qui ne présentaient pas de trouble visible à l'œil nu ont été repiqués séparément en traits horizontaux à l'aide d'une anse stérile à la surface du milieu Mueller-Hinton coulé en boîte de Pétri. Les boîtes étaient incubées à 37°C pendant 24 h. La lecture des résultats se fait par observation de l'importance de la croissance des souchesensemencées dans les boîtes. La CMB correspond à la concentration minimale pour laquelle 0,01% à 0,1% des bactéries restent survivantes.

II.1.2.2. Mise en évidence de l'activité antioxydante

Une analyse par Chromatographie sur couche mince préliminaire révélée au DPPH permet d'avoir une approche qualitative de l'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle étudiée. La méthode de mesure quantitative de l'activité anti-radicalaire permettra de déduire la concentration inhibitrice IC₅₀ de l'HE pour piéger l'activité du DPPH à 50%. Ce dernier est un radical libre stable. Sous forme libre, il est de couleur violette mais une fois réduit par un donneur d'hydrogène (ou piégeur des radicaux libres), sa coloration devient jaune (Maataoui et al., 2006).

a) Test qualitatif par révélation au DPPH

La méthode consiste à déposer l'huile essentielle à tester sur une plaque CCM qui a été développée par la suite avec un mélange de solvants (*n*-hexane/Et₂O; 9/1; v/v). La plaque chromatographique a été trempée dans une solution méthanolique de DPPH pendant quelques secondes. Après séchage, les taches de migration relatives aux substances à activité antioxydante apparaissent en jaunes pâles sur fond violet (ou pourpre).

b) Test quantitatif par mesure de l'activité antioxydante de l'HE

La capacité antioxydante de l'huile essentielle a été évaluée suivant la méthode décrite par Kivrak et al. (2009). L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif.

Vingt microlitres de chaque solution d'huile essentielle diluée dans du méthanol, de concentration finale : 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml et 80 mg/ml ont été mélangés dans 2 ml de solution méthanolique de DPPH à 0,004% ($0,2 < DO < 0,6$ à $\lambda=517$ nm). Après 30 mn d'incubation à l'obscurité à une température ambiante, une mesure de la DO à 517 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'activité antioxydante qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Elle est donnée par la formule suivante (Yoo et *al.*, 2008).

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Abs: absorbance à longueur d'onde de 517 nm.

La valeur de l'IC₅₀ a été définie comme étant la concentration de l'HE qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH, elle est déterminée graphiquement par les régressions linéaires de la relation suivante:

$$\% \text{ inhibition} = f(C)$$

C : Concentration de l'huile essentielle dans le mélange (MeOH).

II.1.2.3. Evaluation de la toxicité aigüe

a) Définition

C'est une étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenues dans un extrait ou une huile essentielle (Fontenelle et *al.*, 2007).

b) Principe

Cette étude consiste à observer pendant 24 h les symptômes ainsi que les comportements des souris suite à l'administration orale de l'huile essentielle.

c) Mode opératoire

Les souris de sexe féminin, ayant un poids compris entre 25 g et 28 g, étaient utilisées pendant le test de toxicité. Quatre doses croissantes de l'HE (50 mg/ml, 100 mg/ml, 250 mg/ml et 500 mg/ml) ont été testées respectivement sur 4 lots de 5 souris, un autre lot de 5 souris sert comme témoin et ne reçoit que de l'eau distillée. L'administration a été faite par voie orale (gavage), à raison de 0,3 ml pour une souris de 25 g. L'observation des symptômes a été faite pendant les 24 h qui ont suivi l'administration.

II.1.2.4. Mise en évidence de l'activité sur les larves de moustique

Ce test a pour but de déterminer les différentes concentrations de l'HE utilisées qui entraînent la mort des larves à 100% et à 50%.

a) Test préliminaire

Une expérience préliminaire a été réalisée afin d'estimer si l'HE d'*Ocoetea macrocarpa* possède une activité larvicide. Pour cela, deux lots de 25 larves placées dans des béchers ont été exposés à des concentrations élevées de l'HE (respectivement de 100 ppm et de 200 ppm). Un troisième lot non traité sert de témoin. Les étapes de préparation de ces deux concentrations sont données en *annexe 4*

b) Test proprement dit

Six lots de 25 larves ont été utilisés pour le test. Les lots ont été déposés dans des béchers contenant chacun une solution-test avec les concentrations suivantes : 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm et 100 ppm. Un autre lot de 25 larves placé dans 1 ml d'éthanol absolu dilué dans 249 ml d'eau distillée sert de témoin. Notons que trois répétitions ont été réalisées afin de confirmer les résultats.

Après 24 h d'exposition, les larves mortes ou moribondes sont comptées, une larve est considérée comme:

- morte lorsqu'elle ne bouge plus et reste immobile au fond de l'eau
- moribonde, quand elle est incapable de remonter à la surface après une agitation du milieu.

c) Détermination de la concentration létale 50% (CL₅₀)

Selon Boyd (1966), la CL₅₀ (24 h) ou la concentration qui tue 50% des animaux testés en 24 h, est déterminée par la méthode graphique utilisant la régression linéaire de la relation:

$$\% \text{ mortalité} = f(\log C)$$

C : Concentration de l'HE en mg/ml

L'équation de la droite de régression est de la forme :

Y: pourcentage de mortalité

A: une constante

B: coefficient de régression

X: logarithme décimal de la concentration de l'HE

$$Y = A + BX$$

II.2. RESULTATS

II.2.1. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle

II.2.1.1. Aromatogramme

Parmi les neuf souches testées, *Bacillus cereus* et *Streptococcus pneumoniae* se sont avérées sensibles à l'HE, avec des diamètres de zone d'inhibition respectivement de **12 mm** et de **20 mm**. Les résultats du test d'aromatogramme de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle

Souches	Bactéries à Gram (+)			Bactéries à Gram (-)					Levure
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteridis</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>C. albicans</i>
Diamètre d'halo d'inhibition	12	6	20	6	6	6	6	6	7
Sensibilité de la souche	Sensible	Insensible	Extrêmement sensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible

Avec *B* : *Bacillus*, *S* : *Staphylococcus*, *S* : *Streptococcus*; *E* : *Escherichia*, *S* : *Salmonella*, *K* : *Klebsiella*, *P* : *Pseudomonas*, *E* : *Enterobacter*, *C* : *Candida*.

La figure 5 ci-après présente les halos d'inhibition des 2 souches (*Bacillus cereus* et *Streptococcus pneumoniae*) sensibles à l'HE.



Effet de l'HE sur *Bacillus cereus*



Effet de l'HE sur *Streptococcus pneumoniae*

Figure 5 : Halos d'inhibition des deux souches sensibles à l'HE

II.2.1.2. La CMI en milieu liquide

La CMI en milieu liquide de l'HE vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae* est estimée à **0,75 mg/ml**. Les résultats sont donnés dans le tableau 10 ci-après.

Tableau 10 : Détermination de la CMI en milieu liquide de l'HE vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae*



N° Tubes	T+	SM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T-
HE (mg/ml)	0	96,2	48,1	24	12	6	3	1,5	0,75	0,37	0,18	0,09	0
Aspect de la culture	LIMPIDE								CMI	TROUBLE			

II.2.1.3. Détermination de la CMB

La CMB de l'HE vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae* est égale à **3 mg/ml**.

Les résultats sont présentés dans le tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 : Détermination de la CMB de l'HE sur *Streptococcus pneumoniae*

N°	T+	SM	1	2	3	4	5	6	7	8
HE (mg/ml)	0	96,2	48,1	24,05	12,02	6,01	3	1,5	0,75	0,37
Observation	-	-	-	-	-	-	CMB	+	+	+

+ : survie des microorganismes ;

- : mort des microorganismes

La figure 6 ci-après présente les résultats des cultures bactériennes de *Streptococcus pneumoniae* pour la détermination de la CMB.



Figure 6 : Résultats des cultures bactériennes pour la détermination de la CMB

II.2.2. Activité antioxydante de l'huile essentielle

II.2.2.1. Test qualitatif par révélation au DPPH

L'apparition de la couleur jaune pâle sur la plaque CCM démontre que l'huile essentielle a une activité antioxydante.

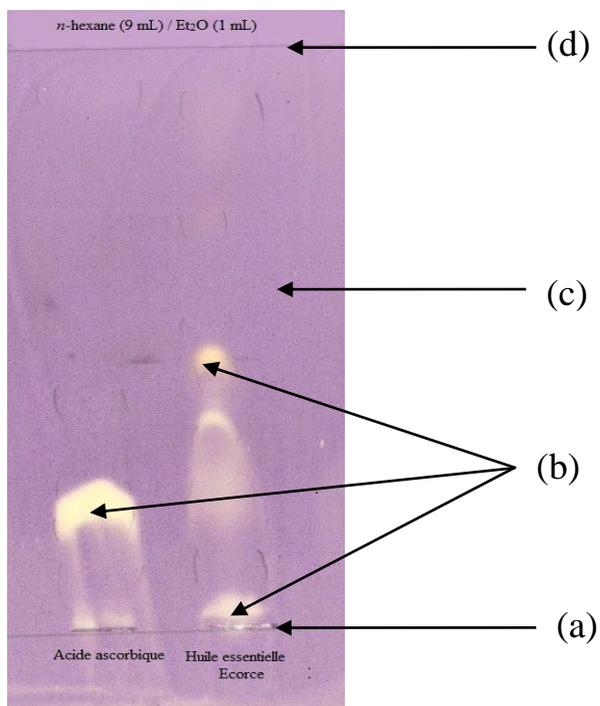
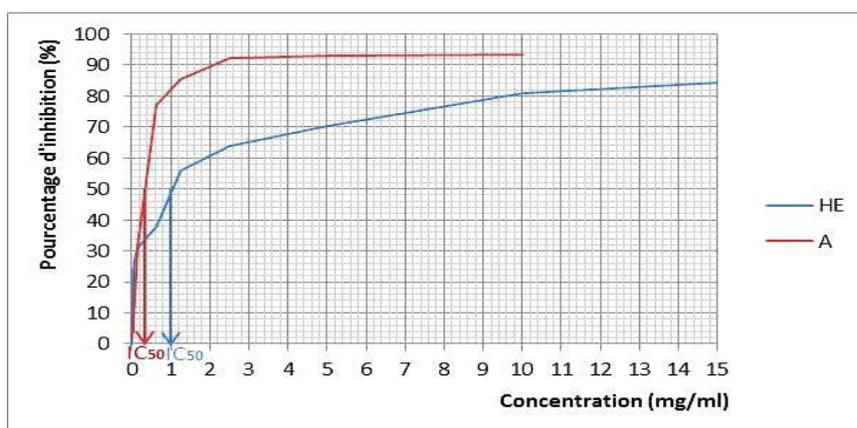


Figure 7 : Profil chromatographique du criblage de l'activité antioxydante de l'HE Avec (a) : ligne de dépôt, (b) : trainées de bandes des molécules anti-radicalaires, (c) : DPPH, (d) : ligne de front.

II.2.2.2. Test quantitatif par mesure de l'absorbance de l'activité antioxydante



HE : Huile essentielle ; A : Acide ascorbique ; IC₅₀ : Concentration d'inhibition 50%

Figure 8 : Courbe représentative de la concentration d'inhibition 50% du DPPH ou IC₅₀.

D'après ces résultats, l'IC₅₀ de l'huile essentielle est de **1 mg/ml** tandis que celle de l'acide ascorbique est de **0,4 mg/ml**. Il paraît que le taux d'inhibition augmente en fonction de la concentration.

II.2.3. Toxicité aiguë sur souris

Après l'intoxication, il n'y a aucun souris morte parmi les quatre lots. Cependant, quelques symptômes ont été observés :

- après 10 mn, les souris présentent une baisse de l'activité motrice et se tachent dans le coin ;
- paralysie des pattes postérieures pour les deux doses plus élevées (250 mg/ml, 500 mg/ml) suivi de convulsion abdominale.

Les symptômes durent environ 2 h selon les doses administrées et les souris se sont toutes remises à l'état normal après 3 h au plus tard.

II.2.4. Activité larvicide de l'huile essentielle

D'après le test préliminaire, l'HE d'*Ocotea macrocarpa* possède une activité larvicide. En effet, toutes les larves sont mortes (100% de mortalité) pour les 2 concentrations utilisées (200 ppm et 100 ppm). Ainsi, les effets de l'HE à des concentrations différentes sur les larves de moustique ont été étudiés. Les résultats sont présentés dans le tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12 : Effets de l'HE sur les larves de moustique

Concentration de l'huile essentielle (ppm)	Concentration de l'huile essentielle (mg/ml)	Log C	Nombre de larves testées	Nombre de mortes	Taux de mortalité (%)
0 (témoin)	0	0	25	0	0
50	12,5	1,70	25	4	16
60	15	1,78	25	8	32
70	17,5	1,84	25	12	48
80	20	1,90	25	14	56
90	22,5	1,95	25	20	80
100	25	2	25	25	100

L'équation de la droite de régression linéaire est de : $Y = -67,23 + 1,63X$ avec un coefficient de corrélation $r = 0,992$. La valeur de $\log CL_{50}$, déterminée graphiquement est de 1,86 ; ce qui correspond à une CL_{50} de 71,92 ppm soit 17,98 mg/ml.

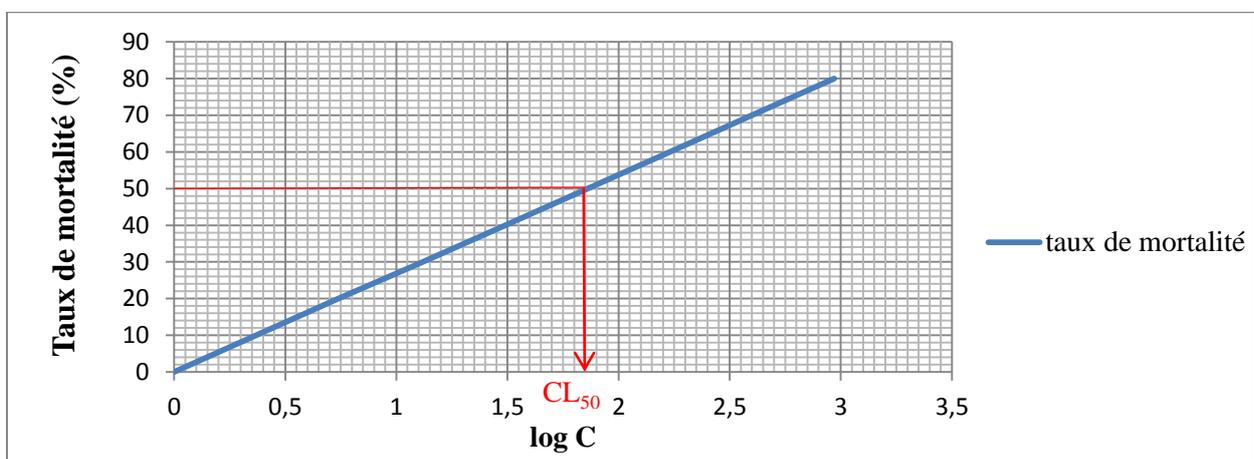


Figure 9 : Droite de régression linéaire pour la détermination de la CL_{50}

II.3. DISCUSSION

Les résultats de ces tests biologiques montrent que l'HE d'*Ocotea macrocarpa* exerce une activité toxique sur certains organismes.

Pour les activités antimicrobiennes : le test d'aromatogramme effectué sur les neuf germes-tests a montré que les bactéries Gram positif tels que *Streptococcus pneumoniae* et *Bacillus cereus* sont plus sensibles à l'HE d'*Ocotea macrocarpa*. Les halos d'inhibition sont respectivement de 20 mm et de 12 mm. Les bactéries Gram négatif et la levure s'avèrent insensibles vis-à-vis de l'HE. Des études ont montré que le mode d'action des HE dépend du type de microorganismes : en général, les bactéries Gram négatif sont plus résistantes que les bactéries Gram positif grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des bactéries Gram négatif est plus riche en lipopolysaccharides et en protéines que ceux des bactéries Gram positif, ce qui la rend plus hydrophile et empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Cette propriété hydrophobe des HE la permet de pénétrer dans la membrane externe des bactéries Gram positif (Malecky, 2008). Cependant, certains constituants chimiques de l'huile essentielle possèdent des propriétés bactéricides. L'activité biologique de l'huile essentielle est liée à sa composition chimique (Zhiri, 2006). Dans le cas présent, le β -eudesmol, qui est parmi les composés majoritaires, présente une activité antimicrobienne (voir § I.3., p 27).

La plus grande valeur d'inhibition enregistrée est de 20 mm sur *Streptococcus pneumoniae*. La CMI et la CMB sont respectivement de 0,75 mg/ml et de 3 mg/ml. Ces valeurs sont inférieures à celles de l'HE de *Micronychia tsiramiramy* (ANACARDIACEAE) qui sont estimées respectivement à 3,31 mg/ml et 13,25 mg/ml pour *Streptococcus pneumoniae* (Rakotondramiada, 2016). L'HE d'*Ocotea macrocarpa* est donc plus active sur cette souche que l'HE de *Micronychia tsiramiramy*. La CMI et la CMB apportent une indication sur la nature de l'activité d'un composé sur les microorganismes. En effet, un produit antibactérien est considéré comme bactéricide si le rapport CMB/CMI est ≤ 4 et comme bactériostatique si CMB/CMI est > 4 (Bouharb et al., 2014). Dans le cas présent, le rapport CMB/CMI = 4, d'où l'HE d'*Ocotea macrocarpa* possède un effet bactéricide sur *Streptococcus pneumoniae*. Il serait donc intéressant de l'exploiter comme anti-infectieux.

L'HE a montré un pouvoir antioxydant remarquable vu l'apparition nette de la coloration jaune pâle sur la plaque CCM. Le test quantitatif a révélé que l'HE a présenté un effet antioxydant dont la valeur de l'IC₅₀ est de 1 mg/ml. Cette activité est 2,5 fois plus basse

que celle de l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0,4$ mg/ml). Ainsi, l'activité antioxydante de l'HE est plus faible que celle de la substance de référence. Le pouvoir antioxydant d'une huile essentielle est particulièrement lié à la présence de composés phénoliques dont le rôle principal est la réduction des radicaux libres (Nakatani, 2000 ; Villano et al., 2007).

Pour l'activité toxique chez la souris, l'administration de l'HE à différentes doses (50 mg/ml, 125 mg/ml, 250 mg/ml et 500 mg/ml), provoque chez la souris des symptômes d'intoxication caractérisés principalement par une diminution progressive de leur activité motrice, une convulsion abdominale, une paralysie des pattes postérieures. Ces symptômes incitent à penser que l'HE agit au niveau des systèmes nerveux (neurotoxine) (Razafinoro, 2015). Malgré ces troubles, aucune souris n'est morte après 24 h, bien que les doses administrées aient été assez élevées. La DL_{50} (24 h) n'a donc pu être déterminée.

L'huile essentielle s'est révélée toxique pour les larves de moustique *Culex quinquefasciatus*. La CL_{50} a été estimée à 71,92 ppm (17,98 mg/ml). L'activité larvicide de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* est supérieure à celle des HE de *Cymbopogon citratus* (GRAMINEES) et de *Pinus longifolia* (PINACEES) qui ont respectivement une CL_{50} de 165,7 ppm et de 85,7 ppm (Rabehaja, 2007 ; WHO, 1970). Par contre, en comparaison avec les larvicides de référence comme le pyrimiphos-méthyle dont la CL_{50} est de 0,057 ppm sur les mêmes types de larves, son activité est faible (Ansari et al., 2005 ; Pushpanathan et al., 2006). Ce fait pourrait être dû à la liaison entre la composition chimique de l'HE et leurs activités biologiques car l'HE d'*Ocotea macrocarpa* renferme des hydrocarbures (monoterpènes et sesquiterpènes) et les terpènes sont les moins actifs sur les larves de moustique à cause de leur faible pouvoir de pénétration (Thormar, 2011). L'activité larvicide serait donc probablement due à des composés non terpéniques de notre HE.

Cette étude biologique a montré que l'HE d'*Ocotea macrocarpa*, bien qu'elle ne soit pas toxique sur souris, possède une activité antibactérienne, antioxydante et larvicide. Ainsi, il serait favorable d'approfondir l'étude de cette essence à des fins thérapeutiques.

Les résultats obtenus ont permis de vérifier l'hypothèse que la plante pourrait être utilisée dans le domaine pharmaceutique (comme bactéricide,...). Par ailleurs, son pouvoir antioxydant lui permet d'être utile dans l'industrie alimentaire.



CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

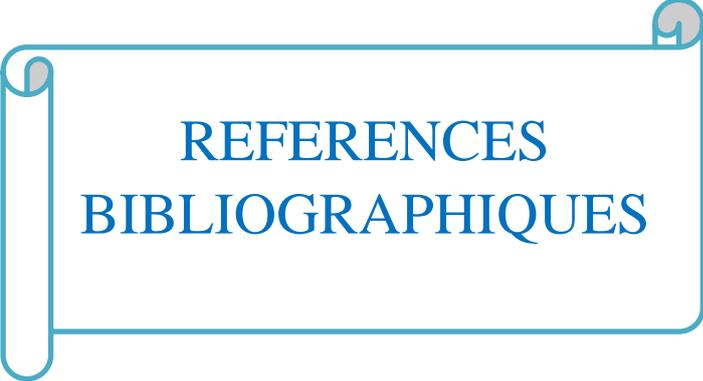
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le présent travail portant sur «Propriétés physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite d'écorces d'*Ocotea macrocarpa*, une Lauracée endémique de Madagascar », nous a permis d(e) :

- valoriser une plante médicinale et aromatique endémique de Madagascar.
- maîtriser des techniques usuelles en microbiologie et de nous initier aux techniques employées en chimie organique.
- extraire l'huile essentielle d'écorces d'*Ocotea macrocarpa* et de déterminer certaines de ses caractéristiques physico-chimiques et quelques-unes de ses caractères organoleptiques.
- identifier la composition chimique de l'huile essentielle d'écorces d'*Ocotea macrocarpa* par CPG/DIF.
- identifier les grandes familles chimiques présentes dans l'extrait d'écorces d'*Ocotea macrocarpa*
- mettre en évidence les propriétés biologiques de l'huile essentielle.
- apporter davantage de connaissances concernant l'espèce *Ocotea macrocarpa*.

Cependant, ce travail n'est qu'une première étape pour l'étude de l'huile essentielle d'*Ocotea macrocarpa*. Dans l'avenir, nous envisageons d'entreprendre des travaux de recherches sur :

- L'essai d'autres procédés d'extraction afin d'établir la meilleure méthode pour améliorer le rendement et d'obtenir une huile aussi proche que possible de l'essence ;
- La détermination des autres propriétés physico-chimiques de l'HE d'*Ocotea macrocarpa* comme l'indice de saponification et le point d'éclair.
- L'étude de la variabilité en travaillant sur du matériel végétal à différents stade végétatifs de la plante, sur des organes de la plante autres que les écorces et sur des pieds différents de la plante ;
- L'identification des composés non déterminés en utilisant d'autres méthodes fiables comme le couplage CPG/SM (CPG couplée à la spectrométrie de masse) ou CPG/IRTF (CPG/spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) ;
- L'approfondissement des études sur la toxicité et le pouvoir antimicrobien ;
- L'exploration d'autres propriétés biologiques sur d'autres organismes.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **AFNOR (1992)**. Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris.
2. **AFNOR (2000)**. Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris.
3. **AFSSAPS (2008)**. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.
4. **Ansari M.A., Mittal P.K., Razdan R. K., Sreehari U. (2005)**. Larvicidal and mosquito repellent activities of pine (*Pinus longifolia*) oil. *J Vect Borne Dis*, 42: 95-99.
5. **Badiaga, M. (2011)**. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. [Thèse de Doctorat] université de Bamako. 10 p.
6. **Bahorun T., Troitin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C., Pinkas M. (1996)**. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung/Drug Research* 46 II (11), 1086-1089.
7. **Bahorun T. (1997)**. Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural research council, Reduit, Mauritius*, 83-94.
8. **Bakkali F., Averbeck D., Idaomar M. (2008)**. Biological effects oils. A review Science Direct. *Food and Chemical Toxicology*. Vol 46 : 446-475.
9. **Bastien F. (2008)**. Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* à la Réunion [Thèse de Doctorat]. Toulouse: Université Paul Sabatier, 25-26.
10. **Benaissa, O. (2011)**. Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.
11. **Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A.O., Ayadi A. (1984)**. Method to study antimicrobial effect of essential oils: application to the antifungal activity of 6 Moroccan essences. *J. Food Prot.*, 47: 748 - 752.
12. **Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A.O., Esmaili-Alaoui M. (1986)**. Méthodes d'études des propriétés antiseptiques par contact direct sur milieu gélosé. *Plantes médicinales et Phytothérapie*.
13. **Blaise C., Christian B., Rakotoniaina M.J. (2003)**. « Fiches techniques pour promouvoir les plantations des arbres (3^e partie), 74-75 »

14. **Bouharb H.**, Badaoui K.E., Ziar T., Alri E.J., Chakir S. Alaoui T. (2014). «Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. »*Journal of Applied Biosciences*; 78 : 6685 -6693.
15. **Boukhatem M.**, Hamaidi M., Saidi F., Hakim Y. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimique de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Revue « *Nature et Technologie* », 3 : 37 - 45.
16. **Bourgaud F.**, Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: an historical perspective; *Plant Science* vol.161, p: 22.
17. **Boyd W.C.** (1966). *Fundamentals of Immunology*. 4^{ème} éd New York: Wiley and Sons Editors. ; 503 p
18. **Bruneton J.** (1987). *Elément de phytochimie et pharmacognosie*. Paris : *Lavoisier Tech et Doc*, 254-300.
19. **Charrouf Z.**, Guillaume D. (1999). Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L) Skeels, *J Ethnopharmacol*, 67:7–14.
20. **Chassaing V.** (2006). *L'Aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval*; Ed: *Violaine Chassaing* ; p: 4- 8.
21. **Cheetham P.S.J.** (2010). Natural sources of flavours. Cited In: *Taylor A.J. and Linforth R.S.T. Food flavour technology*. Ed. Wiley-Blackwell, second edition. 360p.
22. **Clarke S.**, (2008). *Essential oils*; Ed 2: *Churchill Livingstone*, Elsevier; p: 42- 77.
23. **Clevenger J.F.** (1928). Apparatus For Volatil Oil Déterminations Description Of New Type J.F.Clevenger, *American Perfumer & Essential Oil Review*, 467-503.
24. **De Cliff S.**, Harerimana P.C. (2013). Extraction de l'huile essentielle complète des fleurs de *Cananga odorata* de la plaine de l'Imbo: vers la vulgarisation d'une nouvelle filière de plantes industrielles au Burundi. Revue : *Série Sciences Exactes V* : 28 : 1-17.
25. **Duval J.**, Soussy C.J. (1990). *Antibiothérapie ; Base bactériologique pour l'installation des antibiotiques*. 4^{ème} éd. Paris : Masson, 188 p.
26. **El haib A.** (2011). *Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique*. [Thèse de Doctorat]. Université de Toulouse. 195p.
27. **Fong H.H.S.**, Tin-Wa M., Farnsworth N.R. (1974). *Phytochemical screening Plants*, Documents of Departement of Pharmacognosy and Pharmacology, University of Illinois, Chicago.
28. **Fong H.H.S.**, Tin-Wa M., Farnsworth N.R. (1977). *Phytochemical screening review*. Chicago: University of Illinois, 73-126.

29. **Fontenelle R. O. S.**, Morais S. M., Brito E. H. S., Kerntopf M. R., Brilhante R. S. N., Cordeiro R. A., Tome A. R., Queiroz M. G. R., Nascimento N. R. F., Sidrim J. J. C., Rocha M. F. G. (2007). Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *J Antimicrob Chemother*, 59: 934-940.
30. **Guenter E.** (1975). The essential oils Vol II-VI, D. Van Nostrand. Ed. New Y. 117p.
31. **Hilan C.**, Sfeir R., Jawish D., Aitour S. (2006). Huiles essentielles de certaines plantes médicinales de la famille des Lamiaceae. *Lebanaise Science Journal*. Vol. 7 (2) : 13-22.
32. **Hennebelle, T.**, Sahpaz, S., Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. p1, 3-6.
33. **Houël E.**, (2011). Etude des substances bioactives issues de la flore amazonienne. Analyse de préparations phytothérapeutiques à base de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) et *Psidium acutangulum* D.C. (Myrtaceae) utilisées en Guyane Française pour une indication antipaludique. Identification et analyse métabolique d'huiles essentielles à activité antifongique. [Thèse de Doctorat]. Université des Antilles et de la Guyane. 220p.
34. **Jouhault S.** (2003). La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité.
35. **Kivrak I.**, Duru M.E., Oztürk M., Mercan N., Harmandar M., Topçu G. (2009). Antioxydant, anticholinesterase and antimicrobial.
36. **Kostermans A. J. G. H.** (1950). Flore de Madagascar et des Comores : 81^{ème} famille. Lauraceae. Ed. Firmin-Didot et C^{ie}. Paris, 90p.
37. **Ksouri R.**, Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxydant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant. Physiol Bioch*, 45: 244-249.
38. **Laib, I.** (2011). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, diplôme de Magister en Sciences Alimentaires, université Mentouri Constantine. p23, 25- 27.
39. **Lazouni H. A.**, Benmansour A., Taleb-Bendiab S.A., Chabane D. (2007). Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritive du *Foeniculumvulgare*, Mill. *Science & Technologie*, 25 : 7-12.
40. **Maataoui B.S.**, Hmyene A., Hilali S. (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Sciences. Journal*, 7(1):3-8.
41. **Malecky M.** (2008). Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins ; [Thèse de Doctorat] de l'Institut des Sciences et Industries de Vivant et de l'Environnement (Agro. Paris. Tech), INRA; p: 27-35.

- 42. Masango P. (2005).** Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner production*. Vol. 13 (8) : 833-839.
- 43. Michat L. (2006).** De l'or en bouteille : les huiles essentielles de Madagascar. Ed. Medicis. Paris, 203p.
- 44. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C. (2000).** The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation. Heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52 : 673-839.
- 45. Mohamed S.B. (2011).** Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite d'écorces d'*Ocotea zahamenensis* (LAURACEAE), [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 79p.
- 46. Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 155p.
- 47. Nakatani N. (2000).** Phenolic antioxidants from herbs and spices. *In Biofactors*, 13: 141-146.
- 48. Nkhili, Ez-zohra. (2009).** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Doctorat en Sciences des Aliments. Université Cadi Ayyad. Ecole Doctorale 306 – SPSA, Montpellier. 378p.
- 49. Noudogbessi JP., Dansou Kossou, Dominique C. K. Sohounhloue. J. (2008).** Composition Chimique et Propriétés Physico-Chimiques des Huiles Essentielles de *Pimenta racemosa* (Miller) et de *Chromolaena odorata* (L. Robinson) Acclimatées au Bénin.
- 50. Paris R., Moysse H. (1965).** Précis de matière médicale. Ed. Masson et Curie. Tome 1, 416p.
- 51. Piochon M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. 200 p.
- 52. Ponce A., Fritz R., Del V.C., Roura S. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*.
- 53. Pousset J.L. (2004).** Plantes médicinales d'Afrique. Comment les reconnaître et les utiliser ? Secum/Ed. Sud, Paris, ACCT, 287p.
- 54. Pushpanathan T., Jebanesan A., Govindarajan M. (2006).** Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera : Culicidae). *Trop Biomed*, 23(2): 208-212.

- 55. Rabehaja R.D. (2007).** Contribution à la valorisation de *Cymbopogon giganteus* (Chiov) *madagascariensis* (A. Camus). [Mémoire de DEA de Génie Chimique] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 79p.
- 56. Rabesa Z.A. (1986).** Pharmacopée d'Alaotra. Antananarivo, 287p.
- 57. Rahanira R. (1994).** Etudes préliminaires des constituants chimiques d'une plante endémique de Madagascar *Gambeya boviniana* (SAPOTACEAE) [Mémoire de DEA : Chimie] Antananarivo : Université d' Antananarivo, 66p.
- 58. Rakotondramiadana N. H. (2016).** Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Micronychia tsiramiramy* (ANACARDIACEAE), [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 63p.
- 59. Ranaivoarisoa L., Randriamiharisoa P.R., (1989).** Valorisation des huiles essentielles de l'*Ocimum basilicum* et *Ocimum canum*, Archives du Centre National et de Recherches pharmaceutiques 8: 279p.
- 60. Ratompomalala H. (2007).** Recherche d'antioxydants d'origine végétale. [Mémoire de DEA : Chimie organique] Antananarivo, 178p.
- 61. Razafindrakoto R. (2010).** Etude chimique et biologique de l'huile essentielle d'*Ocotea laevis kost* (LAURACEAE), [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 60p.
- 62. Razafindramaka A. F. (2008).** Contribution à l'étude chimique et biologique de *Brunfelsia eximia* (SOLANACEAE) et d'une espèce d'Euphorbiaceae codée FD [Mémoire de DEA : Chimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 72p.
- 63. Razafinoro N. (2015).** Etudes chimique et toxicologique des extraits de feuilles de *Crotalaria trichotoma* (fabaceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo: Université d'Antananarivo; 72 p.
- 64. Sayaka T., William A.H., William N.S. (2007).** Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (LAURACEAE) from Montverde, Costa Rica. *In Biochemicals Systematics and Ecology* 35: 525-532;
- 65. Schatz E. (2001).** Flore générique des arbres de Madagascar. Ed. Royal Botanic Garden, 419 p.
- 66. Sehenaspiera M. N. (2011).** Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Ocotea cymosa* (LAURACEAE), [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 84p.

- 67. Séverine, Brunet. (2008).** Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. [Thèse de Doctorat] spécialité : Pathologie et Nutrition. Université De Toulouse. 246p.
- 68. Svoboda K., Svoboda T. (2000).** Secretary structures of aromatic and medicinal plants; Ed: Microscopix publications, 7-12.
- 69. Tajkarimi M., Ibrahim S., Cliver D. (2010).** Antimicrobial herb & spice compounds in food. *Food control*. Vol 21: 1199-1218.
- 70. Traore B (2001).** «Screening de l'activité biologique de deux espèces de *tapinanthus* poussant sur *Butyrosermmum paradoxum* (Gaertn F) Herpper (SAPOTACEAE), [Thèse de pharmacie], Bamako.
- 71. Tuley de silva K. (1995).** United Nations industrial development organization, Vienne 232p.
- 72. Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M., Gracia-Parilla M.C. (2007).**Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*71: 230-235.
- 73. Von O.W.F. (1958).** Poisoning- A Guide to Clinical Diagnosis and Treatment. 2nd edition^{W.B.} Saunders Co., Philadelphia, p: 322.
- 74. Wilson R. (2002).** Aromatherapy: Essential oils for Vibrant Health and Beauty; Ed: Penguin putnam; 1- 24.
- 75. WHO. (1970).** Organisation Mondiale de la Santé, 95p.
- 76. WHO. (1981).** Instruction for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Mimeographed Document, WHO/VBC/81.807.
- 77. WHO. (1986).** Bulletin de l'organisation mondiale de la santé 64 (2), 159-175.
- 78. Yoo M.K., Lee H.C., Moon B.K., LEE Y.C. (2008).** Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106: 929-936.
- 79. Zhiri A. (2006).** Aromathérapie: Nutranews; Ed: Fondation libre choix; 2-16.

REFERENCE WEBOGRAPHIQUE

Catalogue of the vascular plant of Madagascar:

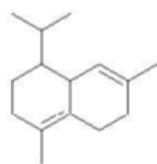
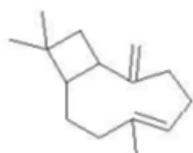
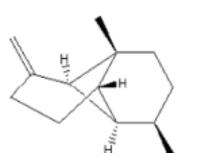
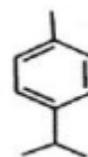
1. <http://www.tropicos.org>
2. <http://www.Farwell>
3. <http://www.Eudesmol-WikiPhyto.htm>



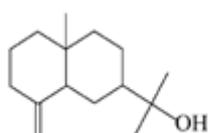
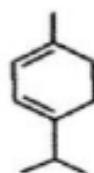
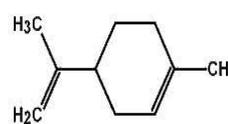
ANNEXES

ANNEXE 1

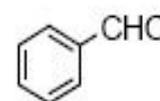
Les structures chimiques de quelques constituants des HE :

 δ -cadinène β -caryophyllène α -copaène*p*-cymène

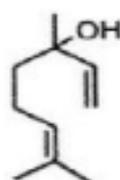
myrcène

 α -pinène β -eudesmol α -terpinène

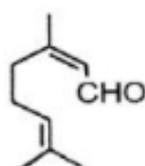
limonène



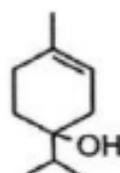
Benzaldéhyde



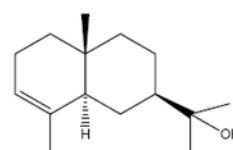
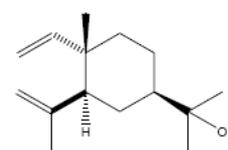
linalol



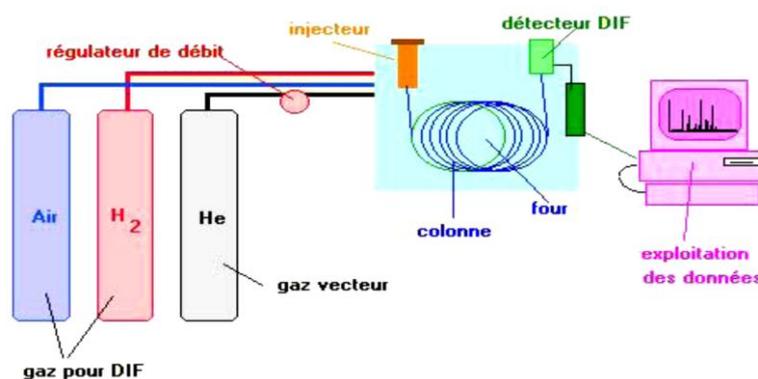
néral



terpinèn-4-ol

 α -eudesmol β -élémol

Un appareil de CPG comprend schématiquement 3 modules spécifiques : un injecteur, une colonne contenue dans une enceinte thermostatée (four) et un détecteur relié à un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme.



Chromatographe en phase gazeuse, muni d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF).

ANNEXE 2

Caractérisation physico-chimique

Nous avons suivi les indications de la norme AFNOR (1992) pour déterminer les caractéristiques physico-chimique de l'huile essentielle.

➤ Densité relative

-Calcul de l'incertitude :

$$\frac{\Delta d}{d} = \frac{\Delta m_1}{m_1 - m_0} + \Delta m_0 \left(\frac{1}{m_2 - m_0} - \frac{1}{m_1 - m_0} \right) + \frac{\Delta m_2}{m_2 - m_0}$$

Avec $\Delta m = 0,0001\text{g}$

AN : après calcul, on a trouvé $0,00004 \cong 0,0001$

➤ Pouvoir rotatoire

-Méthode de conversion: relation entre le degré et le radian : 1 radian = $57,30^\circ$

➤ Indice d'acide

-Calcul de l'incertitude :

$$\Delta IA = IA \left(\frac{\Delta V}{V} + \frac{\Delta m}{m} \right)$$

Avec $\Delta V = 0,05\text{ ml}$

$\Delta m = 0,0001\text{ g}$

AN : après calcul, on a trouvé 0,14

➤ Indice d'ester

-Calcul de l'incertitude :

$$\Delta IE = IE \left(\frac{\Delta V}{V_0 - V_1} + \frac{\Delta m}{m} + \frac{\Delta IA}{IA} \right)$$

Avec $\Delta V = 0,05\text{ ml}$

AN : après calcul, on a trouvé 0,24

ANNEXE 3

Les réactifs utilisés pour le criblage phytochimique :

Réactif de MAYER :

Chlorure de mercure	1,36 g
Iodure de potassium	5 g
Eau distillée (quantité suffisante pour)	100 ml

Réactif de DRAGENDORFF :

Mélange à volume égal des deux solutions suivantes :

Solution A :

Nitrate de bismuth	1,7 g
Acide tartrique concentré	20 g
Eau distillée (quantité suffisante pour)	30 ml

Solution B :

Iodure de potassium	10 g
Eau distillée	40 ml

Réactif de WAGNER :

Iodure de potassium	2 g
Iode	1,27 g
Eau distillée	100 ml

Les résultats détaillés du criblage phytochimique :

Les résultats de la détection des familles chimiques présentes dans la poudre d'écorces d'*Ocotea macrocarpa* sont détaillés dans ce tableau.

Les résultats détaillés du criblage phytochimique

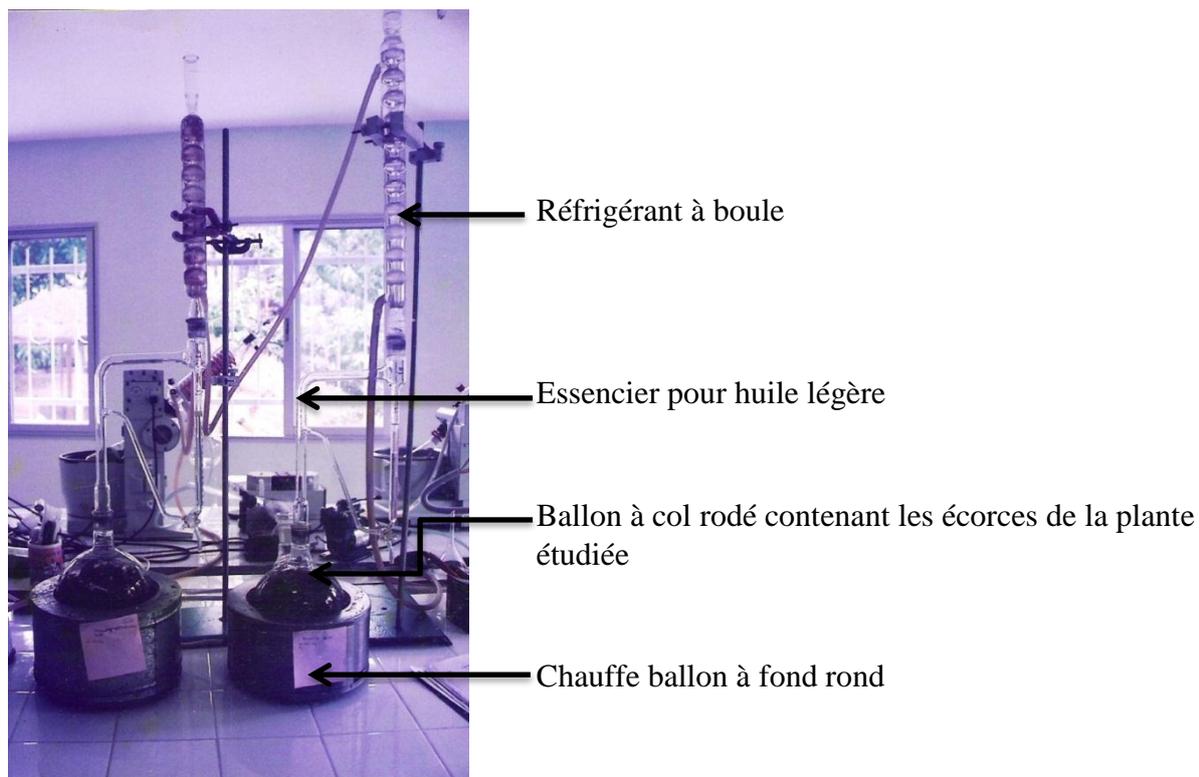
Types de Tests		Observations	Observation pour un test positif	Conclusions
ALCALOIDES				
Test préliminaire		MAYER	Trouble de couleur jaune blanchâtre	Présence d'alcaloïdes
		WAGNER	Trouble de couleur rouge sang	
		DRAGENDORFF	Trouble de couleur orange clair	
Test de confirmation	Phase chloroformique	MAYER	Précipités abondants de couleur blanche	Présence d'alcaloïdes primaire, secondaire et tertiaire
		WAGNER	Trouble de couleur blanche	
		DRAGENDORFF	Trouble de couleur blanche	
	Phase aqueuse alcaline	MAYER	Aucun changement de coloration (jaune claire)	Absences d'ammoniums quaternaires et de N-Oxydes
		WAGNER	Changement de coloration orange clair	
		DRAGENDORFF	Changement de coloration orange clair	
		Précipitation, floculation, trouble		

Types de Tests	Observations	Observation pour un test positif	Conclusions
FLAVONOÏDES, LEUCOANTHOCYANES et ANTHOCYANES			
TEST DE WILLSTÄTER	Changement de coloration en rouge violacée (témoin de couleur marron clair)	Rouge (flavones) Rouge pourpre (flavonols) Rouge violacée (Flavanones et flavanonols)	Présence de flavonoïdes (flavanones ou flavanonols)
TEST DE WILLSTÄTER (MODIFIÉ)	La phase supérieure est colorée en rouge violacée	<i>Changement de coloration de la phase supérieure :</i> Rouge (flavones) Rouge pourpre (flavonols) Rouge violacée (Flavanones et flavanonols)	Présence de flavonoïdes (flavanones ou flavanonols)
TEST DE BATE-SMITH	Après 30 mn au bain marie, changement de coloration en rouge violacée	Rouge pourpre ou rouge violacée	Présence de leucoanthocyanes
TEST DE BATE-SMITH (MODIFIÉ)	Après 30 mn, changement de coloration en rouge pourpre	Rouge pourpre ou rouge violacée	Présence d'anthocyanes

Types de Tests	Observations	Observation pour un test positif	Conclusions	
TRITERPENES et STEROLS INSATURES				
TEST DE LIEBERMANN BURCHARD	Changement de coloration en violet	Bleu-vert (stéroïdes) Rouge-violet-rose (Triterpènes)	Présence de triterpènes et absence de stéroïdes	
TEST DE SALKOWSKI	Anneau de séparation de couleur rouge	Anneau de séparation de couleur rouge	Présence de stéroïdes insaturés	
ANTHRAQUINONES				
TEST DE BORNTRÄGER	Pas de changement de coloration (Phase inférieure incolore)	Phase inférieure de couleur rouge	Absence d'anthraquinones	
SAPONOSIDES				
Hauteur de la mousse	à t= 0 mn	2 cm	3 cm de hauteur après 30 mn	Absence de saponosides
	à t= 30 mn	0,5 cm		

Types de Tests	Observations	Observation pour un test positif	Conclusions
TANINS et POLYPHENOLS			
Test à la gélatine 1%	Précipités abondants de couleur blanche	Précipitation	Présence de polyphénols
Test à la gélatine salée	Précipités abondants de couleur blanche		Présence de tanins
Test au FeCl ₃	Changement de coloration en vert- noir	Coloration vert- noir ou bleu- noir (type catéchique) Coloration noir-bleuatre (type pirogallique)	Présence de tanins de type «catéchique »
POLYSACCHARIDES			
	Précipités de couleur blanche	Précipités	Présence de polysaccharides
HETEROSIDES CYANOGENETIQUES			
TEST DE GRIGNARD	Pas de changement de coloration du papier WATHMAN (jaune)	Rouge après 3 h	Absence de glycosides cyanogénétiques
COUMARINES			
	Après observation sous UV 254 nm, présence de fluorescence bleu violacée	Fluorescence jaune-vert	Absence de coumarines

L'appareil utilisé pour l'extraction de l'HE d'*Ocotea macrocarpa*.



Appareil de type CLEVANGER (essencier pour huiles légères).

ANNEXE 4

Les étapes de préparation des deux concentrations (100 ppm et 200 ppm) pour la mise en évidence de l'activité larvicide de l'HE

L'huile essentielle est diluée dans de l'éthanol absolu à 50 mg/ml et à 25 mg/ml respectivement. Un millilitre de chacune de ces solutions est ensuite mélangé à 249 ml d'eau distillée pour avoir des concentrations finales respectives de 200 ppm et 100 ppm. Le témoin contenant uniquement 1 ml d'éthanol et 249 ml d'eau distillée.

Les différents réactifs utilisés pour l'étude biologique (test d'activité antioxydante):

Réactifs :

DPPH

Méthanol

n-hexane

Et₂O

Appareillage :

Plaques de gel de silice

Cuve à chromatographie

Micropipettes

Spectrophotomètre

Composition des milieux de culture :

-**Mueller Hinton** : milieu utilisé pour le test aromatoigramme

Extrait de bœuf	3 g/l
Hydrolysate de caséine	17,5 g/l
Amidon	1,5 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,2± 0,2

-Bouillon nutritif : milieu pour la revivification des souches à tester

Peptone	15 g/l
Extrait de levure	5 g/l
NaCl	15 g/l
pH	7,4

-Gélose nutritive : milieu pour la purification des souches à tester

Extrait de viande	3 g/l
Peptone	5 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,4

AUTHOR: RAKOTOARISOA Fara Tiana

TITLE: Physico-chemical and biological proprieties of essential oil from *Ocotea macrocarpa* barks, a Lauraceae endemic of Madagascar

ABSTRACT

The essential oil of *Ocotea macrocarpa* barks (LAURACEAE), an endemic plant of Madagascar was extracted by hydrodistillation method. Physico-chemical, organoleptic, biological proprieties and chemical composition of the essential oil were determined in this study.

Extraction yield of the essential oil is 0.74%, its density at 20°C is 0.9629 (light oil) and its optical rotating power is +22°55. Refractive, acid and ester indexes were respectively, 1.5050, 4.07 and 5.61. The oil is miscible with the ethanol 90°. It is limpid, olive-green color with characteristic good odor of the plant.

Gas chromatography analysis of essential oil revealed 125 compounds in which 84.70% were identified and 15.30% unknown. Identified compounds are constituted by terpenes (32.70%) and oxygenated products (52%).

Phytochemical screening of the barks revealed the presence of alkaloids, tanins, polyphenols, leucoanthocyan, anthocyan, triterpene, unsaturated sterols, flavonoids and polysaccharides.

Antimicrobial test on solid medium showed that the essential oil inhibited *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus cereus* growth with inhibition zone diameters of 20 mm and 12 mm, respectively. The MIC in liquid medium on *Streptococcus pneumoniae* was estimated at 0.75 mg/ml and the MBC at 3 mg/ml.

The essential oil had larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*; the LC₅₀ was evaluated at 17.98 mg/ml.

Concerning toxicity test in mice, any mortality wasn't observed. Therefore, the essential oil caused nervous system damage symptoms.

According to the DPPH assay, the essential oil exhibited antioxidant activity with IC₅₀ value of 1 mg/ml.

ADVISOR: Professor RASOLOMAMPIANINA Rado

KEY-WORDS: *Ocotea macrocarpa*, Lauraceae, essential oil, antimicrobial, larvicidal, toxicity, antioxidant.

AUTEUR : RAKOTOARISOA Fara Tiana

TITRE : Propriétés physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite d'écorces d'*Ocotea macrocarpa*, une Lauraceae endémique de Madagascar

RESUME

L'huile essentielle d'écorces d'*Ocotea macrocarpa* (LAURACEAE), une plante endémique de Madagascar a été extraite par la méthode d'hydrodistillation. Ses propriétés physico-chimiques, organoleptiques, biologiques et sa composition chimique ont été déterminées dans cette étude.

Le rendement d'extraction de l'huile est de 0,74%, sa densité relative à 20°C est de 0,9629 (huile légère) et son pouvoir rotatoire est de + 22°55. Les indices de réfraction, d'acide et d'ester sont respectivement de 1,5050, 4,07 et 5,61. L'huile essentielle est miscible à l'éthanol 90°. C'est une huile essentielle limpide de couleur vert-olive et d'odeur agréable, caractéristique de la plante.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle a permis de détecter 125 composés dont 84,70% ont été identifiés et 15,30% inconnus. Les composés identifiés sont constitués par des terpènes (32,70%) et des produits oxygénés (52%).

Le criblage phytochimique d'écorces a révélé la présence d'alcaloïdes, de tanins, de polyphénols, de leucoanthocyanes, d'anthocyanes, de triterpènes, de stérols insaturés, de flavonoïdes et de polysaccharides.

D'après le test d'activité antimicrobienne sur milieu solide, l'huile essentielle a inhibé la croissance de *Streptococcus pneumoniae* et de *Bacillus cereus* avec des diamètres d'halo d'inhibition respectivement de 20 mm et 12 mm. La CMI en milieu liquide sur *Streptococcus pneumoniae* est de 0,75 mg/ml tandis que la CMB est de 3 mg/ml.

L'huile essentielle a montré une activité larvicide sur *Culex quinquefasciatus*, la CL₅₀ a été estimée à 17,98 mg/ml. Pour le test de toxicité aiguë sur souris, aucune mortalité n'a été observée ; cependant, l'huile essentielle a provoqué des symptômes suggérant des atteintes du système nerveux.

Selon le test du pouvoir de piégeage du radical DPPH, l'huile essentielle a présenté une activité antioxydante dont l'IC₅₀ est de 1 mg/ml.

ENCADREUR : Professeur RASOLOMAMPIANINA Rado

MOTS- CLES : *Ocotea macrocarpa*, Lauraceae, huile essentielle, antimicrobienne, larvicide, toxicité, antioxydant.