



HAL
open science

Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar

Jean-François Cavalli

► **To cite this version:**

Jean-François Cavalli. Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Autre. Université Pascal Paoli, 2002. Français. NNT : . tel-00007939

HAL Id: tel-00007939

<https://theses.hal.science/tel-00007939>

Submitted on 7 Jan 2005

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

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

**UNIVERSITE DE CORSE PASCAL PAOLI
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE

Discipline : Chimie Organique et Analytique

présentée et soutenue publiquement

par

Jean-François CAVALLI

le 17-10-2002

CARACTERISATION PAR CPG/IK, CPG/SM ET RMN DU CARBONE-13 D'HUILES ESSENTIELLES DE MADAGASCAR

=====
Directeurs de thèse :

Pr. Antoine-François BERNARDINI

Pr. Joseph CASANOVA
=====

JURY

| | | |
|-----|---------------------|---|
| Mme | L. LIZZANI-CUVELIER | Professeur, Université de Nice Sophia-Antipolis (Rapporteur) |
| M. | E. GAYDOU | Professeur, Université de Marseille (Rapporteur) |
| M. | A.-F. BERNARDINI | Professeur, Université de Corse |
| M. | J. CASANOVA | Professeur, Université de Corse |
| M. | F. TOMI | Professeur, Université de Corse |

A mes parents,

A ma sœur.

AVANT PROPOS

Chaque société a codifié des usages, entre autres celui d'écrire des mots de remerciements dans certaines circonstances, c'est donc dans ce mémoire de thèse que toutes celles et tous ceux qui se sont penchés un tant soit peu sur ce travail trouveront mon message de profonde sympathie et de gratitude.

J'ai eu la chance d'effectuer ce travail de recherche dans les deux laboratoires de l'UMR-CNRS 6134 de l'Université de Corse au sein de l'équipe de « Chimie des Produits Naturels » de Corte ainsi qu'à l'Institut de recherche « Chimie et Biomasse » de Vignola à Ajaccio, sous la direction respective de Messieurs les professeurs Antoine-François Bernardini et Joseph Casanova.

Tout d'abord, je remercie sincèrement Monsieur le professeur Antoine-François Bernardini, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années. Ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche dans son laboratoire. J'ai trouvé en lui un directeur toujours disponible et ouvert.

Je veux exprimer ici ma vive reconnaissance à Monsieur le professeur Joseph Casanova pour son dévouement incomparable, son encadrement sans faille et pour ses nombreux avis éclairés durant nos entrevues. C'est grâce à sa bienveillance que j'ai pu réaliser dans son laboratoire de Vignola, à Ajaccio, les analyses par résonance magnétique nucléaire du carbone-13. J'ai pu constamment bénéficier de ses suggestions et de ses encouragements.

Mes plus vifs remerciements vont aussi à Monsieur le professeur Félix Tomi pour sa collaboration, sa disponibilité de tous les instants et pour m'avoir initié dans la réalisation des spectres de RMN du carbone-13. Sa grande expérience, sa gentillesse et ses grandes qualités scientifiques et humaines ont constitué un support permanent à ma réflexion.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Madame le professeur Lizzani-Cuvelier de l'Université de Nice Sophia-Antipolis et Monsieur le professeur Emile Gaydou de l'Université de Marseille en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je les remercie vivement pour cette marque d'intérêt et notamment de me faire l'honneur de participer à ce jury.

A Monsieur Jean-Marie Desjobert, Assistant Ingénieur, une vive reconnaissance pour son amitié constante, son soutien moral, sa disponibilité à mon égard, ses compétences ainsi que pour son aide technique si précieuse.

Je ne saurais oublier tous mes collègues et camarades chimistes de l'équipe « Chimie des Produits Naturels » : Messieurs Pierre Tomi et Alain Muselli (Maîtres de Conférences à l'Université de Corse), Mademoiselle Stéphanie Cozzani (Doctorante),

Monsieur Ange Bianchini (Docteur). J'ai apprécié leur amitié de tout instant et surtout la bonne ambiance au sein du laboratoire. Merci également à toute l'équipe de « Chimie et Biomasse » pour leur accueil à chaque fois chaleureux et amical : Madame Pascale Bradesi, Messieurs Ange Bighelli et Vincent Castola (Maîtres de conférences à l'Université de Corse), Mesdemoiselles Marcelle Gonny, Marie-Cécile Blanc et Monsieur Bernard Ferrari (Doctorants).

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur le professeur Jacques-Henri Balbi, Président de l'Université de Corse et à Monsieur le professeur Jean COSTA.

Je tiens à remercier particulièrement tous mes amis malgaches qui sont à Antananarivo et notamment Monsieur Jean-Claude Ratsimivony directeur de la société « Homéopharma » et toute son équipe pour leur gentillesse, leur disponibilité à mon égard et surtout pour l'obtention des huiles essentielles.

J'exprime également mes sincères remerciements à :

Madame Michelle Andriansifaritana, gérante du Comptoir des Iles de l'Océan Indien et toute sa famille pour leur amitié sincère et leur aide si précieuse tout au long de ces années. Un grand merci pour l'intérêt particulier qu'elle a démontré pour l'avancement de mes travaux et pour l'envoi des huiles essentielles.

Madame Florence Boyer, amie sincère, directrice de la société « Exaflor » qui grâce à ses nombreux contacts avec les producteurs a pu me fournir de nombreux échantillons d'huiles essentielles. Je lui suis extrêmement reconnaissant tant pour sa gentillesse à mon égard que pour avoir pris à cœur mon travail de thèse. J'ai été heureux de sa collaboration et d'avoir pu à mon tour lui rendre service.

Je remercie vivement pour leur collaboration Monsieur le professeur Michel Ratsinbason, ainsi que Madame Lalasoa Ranarivelo du Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques de Madagascar.

Monsieur le professeur et docteur en Pharmacie Roger Razafindranbao pour son dévouement à mon égard, pour ses longues lettres, ses nombreux conseils et qui lors de ses expéditions dans les forêts malgaches a pu récolter et m'expédier quelques échantillons de plantes. Madame le Docteur Lucile Allorge-Boiteau du Laboratoire de Phanérogamie du Muséum d'Histoire Naturelle.

Il est évident que je ne peux oublier de remercier ma famille, notamment mes parents et ma sœur Valérie, qui ont toujours répondu « présents » et ont été d'un grand secours moral en toutes situations.

Enfin, je ne saurais terminer mes remerciements sans souligner aussi que ce travail de thèse n'aurait pu être réalisé sans le soutien financier que m'a octroyé sous forme de bourse de recherche la Collectivité Territoriale de Corse (CTC).

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE I : LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES | 6 |
| I. LES TECHNIQUES D'ANALYSE CONVENTIONNELLES | 7 |
| 1. L'ANALYSE STRUCTURALE..... | 7 |
| 2. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DANS UN MELANGE COMPLEXE..... | 8 |
| A. ANALYSE PAR LES COUPLAGES CONVENTIONNELS (VOIE A).. | 9 |
| a. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) | 9 |
| b. Le couplage CPG/SM | 11 |
| c. Le couplage CPG/SM-ICP et CPG/SM-ICN | 17 |
| d. Le couplage CPG/SM/SM | 18 |
| e. Le couplage CPG/IRTF..... | 19 |
| f. Le couplage CPG/IRTF/SM | 19 |
| g. Les couplages CLHP/SM et CLHP/CPG/SM..... | 20 |
| h. Le couplage CLHP/RMN ¹ H | 20 |
| i. Les couplages, usage et abus | 21 |
| B. SEPARATION DES CONSTITUANTS PREALABLEMENT A LEUR IDENTIFICATION (VOIE B)..... | 21 |
| C. ANALYSE PAR RMN DU CARBONE-13 SANS SEPARATION PREALABLE (VOIE C)..... | 22 |
| a. Intérêt de la RMN du carbone-13..... | 23 |
| b. Principe | 24 |
| c. Observation et individualisation des signaux dans le spectre d'un mélange complexe..... | 25 |
| d. Identification des constituants d'un mélange complexe | 27 |
| II. PROBLEMATIQUE DE LA RECHERCHE | 32 |

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE II : CARACTERISATION DE DIVERSES HUILES ESSENTIELLES DE MADAGASCAR..... | 37 |
| I. L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>CINNAMOMUM CAMPHORA</i>..... | 38 |
| A. <i>CINNAMOMUM CAMPHORA</i> | 38 |
| B. LES HUILES ESSENTIELLES DU GENRE <i>CINNAMOMUM</i> | 39 |
| C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>CINNAMOMUM CAMPHORA</i> DE MADAGASCAR. | 41 |
| II. L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>TAGETES BIPINATA</i>..... | 44 |
| A. <i>TAGETES BIPINATA</i> | 44 |
| B. LES HUILES ESSENTIELLES DU GENRE <i>TAGETES</i> | 45 |
| C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>TAGETES BIPINATA</i> DE MADAGASCAR. | 47 |
| III. L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>LANTANA CAMARA</i>..... | 48 |
| A. <i>LANTANA CAMARA</i> | 48 |
| B. LES EXTRAITS ET L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>L. CAMARA</i> | 51 |
| C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>LANTANA CAMARA</i> DE MADAGASCAR. | 54 |
| IV. L’HUILE ESSENTIELLE D’<i>EUCALYPTUS CITRIODORA</i>..... | 63 |
| A. <i>EUCALYPTUS CITRIODORA</i> | 63 |
| B. LES HUILES ESSENTIELLES DU GENRE <i>EUCALYPTUS</i> | 64 |
| C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L’HUILE ESSENTIELLE D’ <i>EUCALYPTUS CITRIODORA</i> HOOKER DE MADAGASCAR. | 68 |
| V. L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>CUPRESSUS LUSITANICUS</i>..... | 74 |
| A. <i>CUPRESSUS LUSITANICUS</i> | 74 |
| B. LES EXTRAITS ET L’HUILE ESSENTIELLE DU GENRE <i>CUPRESSUS</i> | 74 |
| C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>CUPRESSUS LUSITANICUS</i> DE MADAGASCAR..... | 76 |
| VI. L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>CHENOPODIUM AMBROSIOIDES</i>..... | 81 |
| A. <i>CHENOPODIUM AMBROSIOIDES</i> | 81 |
| B. LES HUILES ESSENTIELLES DE <i>C. AMBROSIOIDES</i> | 83 |
| C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>CHENOPODIUM AMBROSIOIDES</i> DE MADAGASCAR. | 84 |
| CHAPITRE III : CARACTERISATION DE L’HUILE ESSENTIELLE DE <i>CEDRELOPSIS GREVEI</i> H. BAILLON DE MADAGASCAR. | 91 |
| I. <i>CEDRELOPSIS GREVEI</i> H. BAILLON. | 92 |

| | |
|---|------------|
| II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 94 |
| III. L'HUILE ESSENTIELLE D'ECORCE DE <i>CEDRELOPSIS GREVEI</i> DE MADAGASCAR..... | 96 |
| A. ANALYSE DETAILLEE D'UN ECHANTILLON D'HUILE ESSENTIELLE BRUTE..... | 96 |
| 1. Etude de la fraction hydrocarbonée..... | 97 |
| 2. Etude de la fraction oxygénée..... | 102 |
| 3. Identification des constituants de l'huile essentielle de <i>C. grevei</i> à partir des données de la littérature..... | 107 |
| a. Identification des sesquiterpènes hydrocarbonés : rotundène, 4,5-di-épi-aristolochène, trans-calaménène, cadalène et β -curcumène..... | 107 |
| b. Identification des sesquiterpènes oxygénés : sesquicinéole, hydrates du sesquisabinène, α -acorénol, gleenol, β -bisabolol, 6-épi-shyobunol, γ -eudesmol et 8-épi- γ -eudesmol..... | 112 |
| c. Identification de l'alloévodionol..... | 119 |
| d. Identification du 4-épi-cis-dihydroagarofurane..... | 119 |
| 4. Bilan de l'analyse détaillée de l'huile essentielle A de <i>C. grevei</i>..... | 125 |
| B. COMPOSITION CHIMIQUE DES CINQ AUTRES ECHANTILLONS (B-F) DE <i>CEDRELOPSIS GREVEI</i> | 126 |
| CHAPITRE IV : <i>HELICHRYSUM</i> DE MADAGASCAR : COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE DIFFERENTES ESPECES. 134 | |
| I. DESCRIPTION BOTANIQUE ET USAGES..... | 135 |
| II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 142 |
| III. COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'<i>HELICHRYSUM</i>..... | 144 |
| A. COMPOSITION CHIMIQUE DE TROIS HUILES ESSENTIELLES : <i>H. GYMNOCEPHALUM</i> , <i>H. BRACTEIFERUM</i> et <i>H. FARADIFANI</i> | 146 |
| 1. Composition chimique de l'huile essentielle d'<i>H. gymnocephalum</i>..... | 146 |
| a. Chromatographie sur colonne de silice « flash » de l'huile essentielle... 147 | |
| b. Analyses spectrales : identification des constituants de l'huile essentielle d' <i>Helichrysum gymnocephalum</i> | 150 |
| c. Bilan de l'analyse de l'huile essentielle d' <i>H. gymnocephalum</i> | 153 |
| 2. Composition chimique de l'huile essentielle d'<i>H. bracteiferum</i>..... | 154 |
| a. Chromatographie sur colonne de silice « flash » de l'huile essentielle... 155 | |
| b. Etude de la fraction hydrocarbonée de l'huile essentielle..... | 158 |
| c. Analyses spectrales : identification des constituants de l'huile essentielle d' <i>Helichrysum bracteiferum</i> | 162 |

| | |
|--|------------|
| d. Bilan de l'analyse de l'huile essentielle d' <i>H. bracteiferum</i> | 162 |
| 3. Composition chimique de l'huile essentielle d'<i>H. faradifani</i> | 166 |
| a. Chromatographie sur colonne de silice « flash » de l'huile essentielle... | 168 |
| b. Etude de la fraction hydrocarbonée de l'huile essentielle | 170 |
| c. Analyses spectrales : identification des constituants de l'huile essentielle d' <i>Helichrysum faradifani</i> | 173 |
| d. Bilan de l'analyse de l'huile essentielle d' <i>H. faradifani</i> | 176 |
| B. COMPOSITION CHIMIQUE DE QUATRE HUILES ESSENTIELLES : <i>H. SELAGINIFOLIUM</i>, <i>H. CORDIFOLIUM</i>, <i>H. HYPNOIDES</i>, <i>HELICHRYSUM SP</i> | 179 |
| C. BILAN DE L'ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES D'<i>HELICHRYSUM</i> DE MADAGASCAR..... | 182 |
| CONCLUSION | 184 |
| PARTIE EXPERIMENTALE..... | 189 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 193 |
| ANNEXES | 231 |

INTRODUCTION

L'île de Madagascar, située dans l'Océan Indien (Figure 1), présente tous les caractères d'un petit continent doté d'une nature extraordinairement variée. Sa flore a été reconnue déjà comme une des plus riches du monde et, de par sa situation géographique, elle possède un très fort taux d'endémisme, ce qui fait de l'île un remarquable laboratoire naturel.

Madagascar compte une gamme de climats très étendue, depuis l'Est, où les conditions sont presque équatoriales, jusqu'à l'extrême Sud, très sec, situé en dehors de la zone tropicale. Les sols sont également d'une grande diversité. En effet, le relief est très accentué et les variations des facteurs écologiques sont le plus souvent particulièrement brusques. Celles-ci entraînent des transitions brutales entre des types de végétation très différents : forêts à baobabs à l'Ouest, forêts denses humides à l'Est, fourrés à Didiéracées et à euphorbes au Sud, savanes, forêts sclérophylles et fourrés en altitude.

Madagascar possède de nombreuses espèces aromatiques susceptibles de fournir des huiles essentielles, utilisées dans différents domaines pour leurs propriétés thérapeutiques et organoleptiques, notamment odorantes (parfumerie, cosmétique), pharmaceutiques (aromathérapie), gustatives (additifs alimentaires) ou encore comme sources d'isolats pour les hémisynthèses. Ces plantes aromatiques sont à l'origine de produits à très forte valeur ajoutée qui peuvent contribuer au développement économique de l'île, à condition que soient respectés les critères de qualité exigés sur le marché international. C'est pourquoi la valorisation des huiles essentielles et extraits végétaux passe par une indispensable étape de caractérisation et d'analyse.

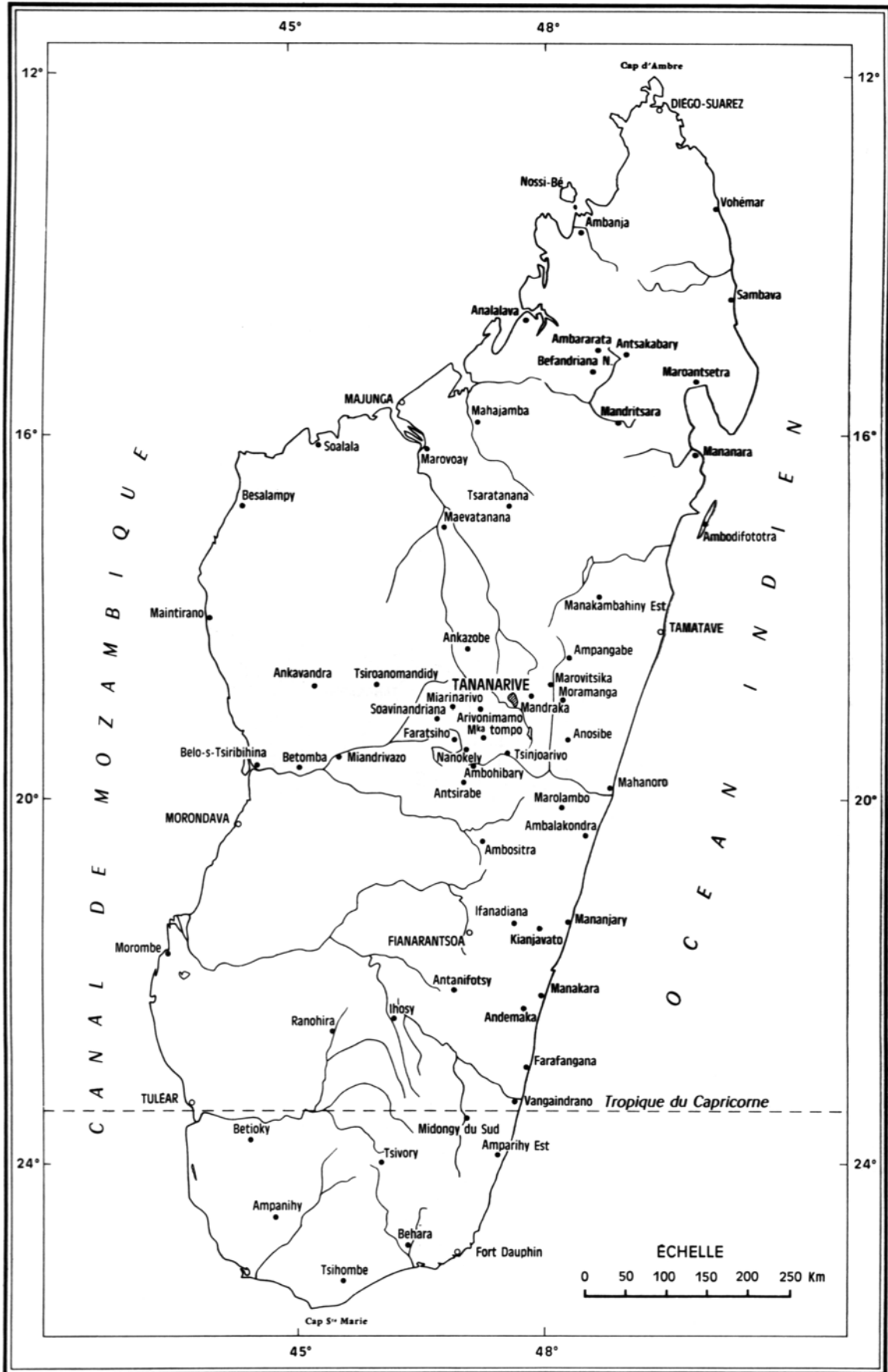


Figure 1 : carte de Madagascar.

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. La première approche, qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) permettant l'individualisation des constituants, avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM) et/ou la spectrométrie Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), permettant l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Les données spectrales sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane. Pour faciliter l'identification des composés minoritaires les huiles essentielles peuvent être soumises à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte.

La seconde approche, également développée dans nos laboratoires, met en œuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN ^{13}C) sans purification préalable des constituants. Depuis quelques années, cette technique est devenue une véritable méthode d'analyse, grâce notamment à l'informatisation de la recherche des composés dans un mélange à partir de bibliothèques de spectres. Elle est particulièrement intéressante car elle permet de prendre en compte des informations intrinsèques du squelette carboné des molécules (déplacement chimique des carbones). L'identification des constituants est basée sur l'examen du spectre de RMN du carbone-13 du mélange, sans séparation préalable ou après une étape de séparation réduite permettant l'obtention de résultats plus précis et plus fiables si nécessaire. Cette technique permet l'analyse de molécules quels que soient leur squelette et leur fonctionnalisation, incluant les molécules thermosensibles et les stéréoisomères difficilement différenciables par les techniques conventionnelles.

L'objectif de ce travail de thèse est double : d'une part méthodologique, par le développement et l'optimisation des différentes techniques d'analyses utilisées au laboratoire et par l'enrichissement des bibliothèques de spectres de référence, et

d'autre part finalisé par l'application de ces techniques à la caractérisation de diverses huiles essentielles de Madagascar.

Dans le premier chapitre, nous passerons en revue les principales techniques conventionnelles utilisées pour l'analyse des huiles essentielles à travers divers exemples, en mettant en évidence leurs avantages et leurs limites. Nous développerons également l'utilisation de la RMN du carbone-13 comme outil d'analyse pour l'identification et la quantification des composés de mélanges naturels, et nous montrerons sa complémentarité avec les autres techniques.

Dans le second chapitre, nous appliquerons notre méthodologie à la caractérisation de six huiles essentielles commerciales de plantes malgaches : *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl., *Tagetes bipinata* L., *Lantana camara* L., *Eucalyptus citriodora* Hooker, *Cupressus lusitanicus* Miller et *Chenopodium ambrosioides* L. Chacune d'entre-elles a été analysée par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 avec une étape de fractionnement rapide. Nous verrons l'avantage de l'utilisation combinée de ces différentes techniques spectroscopiques dans l'analyse de ces mélanges complexes. Nous montrerons également l'intérêt de la RMN du carbone-13 pour l'identification des molécules ayant des spectres de masse insuffisamment différenciés ou de certaines molécules thermosensibles.

Le troisième chapitre sera consacré à l'analyse détaillée de l'huile essentielle d'écorces de *Cedrelopsis grevei*, endémique de Madagascar. L'échantillon sera soumis à un fractionnement poussé en chromatographie sur colonne. Nous détaillerons chacune des étapes de ce fractionnement et nous décrirons également l'identification de nombreux sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés présents dans l'huile essentielle. Nous utiliserons ces résultats pour caractériser cinq autres échantillons.

Enfin, dans le dernier chapitre nous étudierons, en collaboration avec le Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques de Madagascar, la composition chimique de sept espèces endémiques appartenant toutes au genre

Helichrysum : *H. gymnocephalum* (DC) H. Humbert, *H. bracteiferum* (DC) H. Humbert, *H. faradifani* Sc. Ell., *H. selaginifolium* Vig. et Humb., *H. hypnoides* (DC) Vig. et Humb., *H. cordifolium* D.C. et *Helichrysum* sp. (dont nos collaborateurs n'ont pu déterminer avec précision l'espèce). Dans cette étude, l'analyse de trois huiles essentielles commerciales (*H. gymnocephalum*, *H. bracteiferum* et *H. faradifani*) sera réalisée avant et après fractionnement et servira de base pour les quatre autres. Nous examinerons également la variabilité chimique interspécifique.

CHAPITRE I

LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voir plus d'une centaine de composés, principalement des terpènes. Les terpènes sont construits à partir de plusieurs entités isopréniques, constituant une famille très diversifiée tant au niveau structural que fonctionnel. On rencontre principalement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) plus rarement des diterpènes (20 atomes de carbone). Les huiles essentielles peuvent contenir également des composés aliphatiques (non terpéniques) ou des phényles propanoïdes.

Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur d'activité, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les progrès constants des différentes techniques de séparation et d'identification, demeure toujours une opération délicate nécessitant la mise en œuvre simultanée ou successive de diverses techniques.

I. LES TECHNIQUES D'ANALYSE CONVENTIONNELLES.

De manière schématique, on distingue deux démarches analytiques en fonction de l'objectif recherché. La première est d'élucider la structure d'une molécule qui n'a jamais été décrite dans la littérature : il s'agit de l'analyse structurale. La seconde est l'identification et la quantification d'un composé déjà connu et dont les caractéristiques spectrales sont décrites.

1. L'ANALYSE STRUCTURALE.

L'analyse structurale est basée sur la purification préalable des constituants par différentes techniques chromatographiques, chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide sur colonne ouverte (CLC), chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou chromatographie en phase gazeuse préparative (CPGP). Elle requiert donc une quantité suffisante de produit pur (quelques milligrammes) afin

de réaliser une étude complète par toutes les méthodes spectroscopiques habituelles, Spectrométrie de Masse (SM), Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), Ultra-Violet (UV), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN du proton et du carbone-13, RMN bidimensionnelle) (1, 2). A partir de la combinaison de toutes ces techniques complémentaires, il est possible d'établir la structure chimique de la molécule inconnue.

Parmi toutes ces techniques spectroscopiques, la RMN par transformée de Fourier (RMN-TF) est une technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques. En effet, permettant d'étudier la résonance de l'hydrogène et des carbones (en l'occurrence l'isotope 13) elle donne accès à diverses informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules (3). Plus récemment, l'apparition de la RMN bidimensionnelle, avec la réalisation de spectres à deux dimensions, homo et hétéronucléaires (4-7) c'est-à-dire les spectres de corrélations proton-proton (COSY et NOESY) et proton-carbone (XHCORR, HMQC et HMBC), permet de mettre en évidence des interactions (directes ou indirectes) entre les noyaux et fournissent donc des renseignements très précis sur la structure moléculaire. Enfin, les spectres de corrélation carbone-carbone (INADEQUATE) permettent de construire pas à pas le squelette carboné de la molécule (8) mais leur enregistrement nécessite une quantité de produit importante et l'utilisation de cette technique est donc limitée.

2. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DANS UN MELANGE COMPLEXE.

La deuxième démarche, consiste à identifier des substances déjà décrites dans la littérature, pour caractériser un mélange. Actuellement, on distingue trois tendances pour l'analyse des mélanges complexes naturels (Figure 2) :

☑ La voie **A** est basée sur l'identification des constituants par le couplage « en ligne » d'une ou plusieurs techniques chromatographiques et d'une ou plusieurs techniques spectroscopiques, qui permettent l'individualisation et l'identification des

constituants. Elle est la plus couramment utilisée, tout au moins pour les analyses de routine.

☑ La voie **B** fait intervenir la séparation de ces mêmes constituants, y compris les produits minoritaires, par diverses techniques chromatographiques, telles que la CCM, la CLC, la CLHP, la CPGP ou encore par distillation fractionnée ou par cristallisation. Leur identification est alors réalisée par comparaison des données spectrales des composés isolés (SM, IR mais aussi RMN du proton et du carbone-13) avec celles de produits de référence. Cette voie se rapproche de celle mise en œuvre pour l'identification structurale des molécules nouvelles, d'autant plus qu'il est souvent nécessaire de faire de la RMN 2D pour élucider la structure, même si on se rend compte ensuite que la molécule est connue.

☑ La voie **C**, intermédiaire par rapport aux précédentes, met en œuvre la RMN du carbone-13 sans séparation préalable des constituants. Cette troisième voie, initiée par les travaux de Formáček et Kubeczka, a été développée, optimisée et informatisée par l'équipe « Chimie et Biomasse » qui en a fait une véritable méthode d'identification des constituants d'un mélange naturel.

A. ANALYSE PAR LES COUPLAGES CONVENTIONNELS (VOIE A).

a. La chromatographie en phase gazeuse (CPG).

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (9). La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit (9).

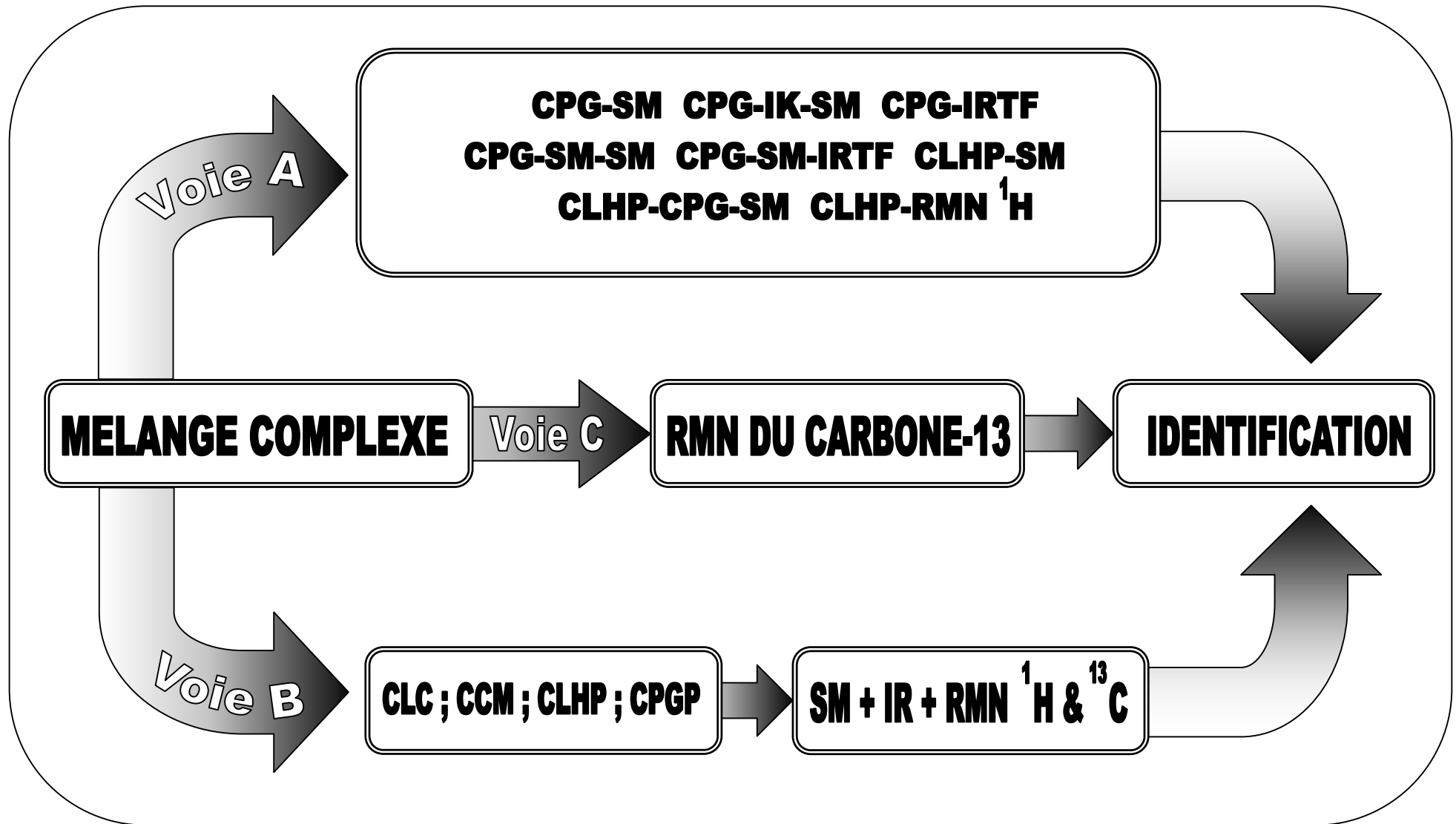


Figure 2 : les méthodes d'analyse d'un mélange complexe.

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (10) ou en programmation de température[♦] (indice de rétention) (11). Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire et ceux de la littérature (en particulier sur colonne polaire). C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarité différente est nécessaire.

Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : en général la spectrométrie de masse (CPG/SM) ou plus rarement l'IRTF. La combinaison de ces deux techniques complémentaires, est applicable à l'analyse d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides.

b. Le couplage CPG/SM.

Ainsi le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (12, 13). Dans la source d'ionisation (Figure 3) les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus utilisés pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le « piège à ion » ou « ion trap ».

[♦] Nous utiliserons dans ce mémoire l'abréviation IK pour les indices de rétention, obtenus en programmation de température, pour éviter toute confusion avec l'infrarouge (IR).

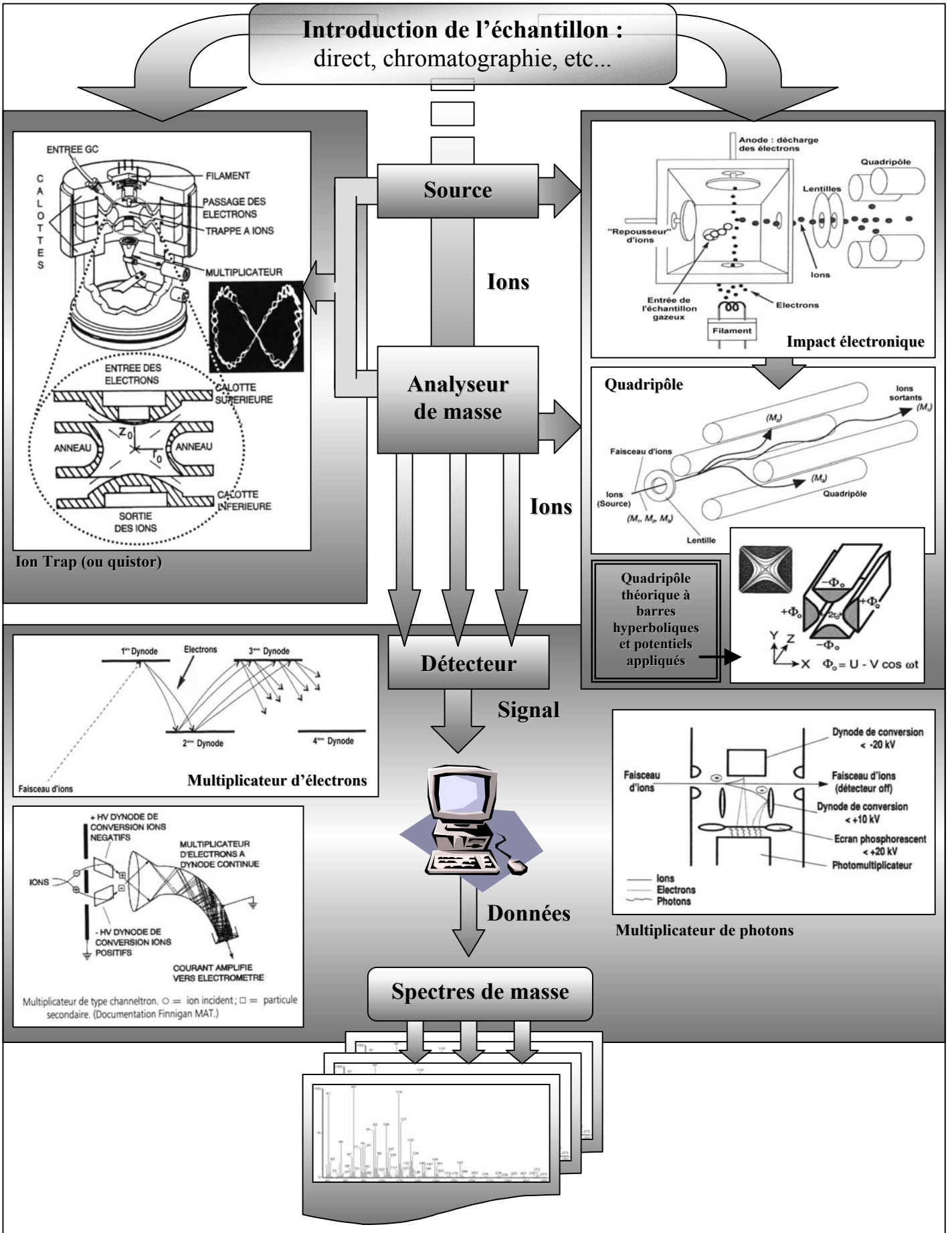


Figure 3 : schéma du principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

Le quadripôle ainsi que l'« ion trap » utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge (m/z) (14, 15). Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques (ayant idéalement une section hyperbolique). Un ion positif pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne se soit déchargé sur cette barre, il changera de direction (Figure 3). Dans les appareils à quadripôle, on règle les potentiels de manière telle que les ions d'une masse déterminée seulement traversent les barres. Les ions sont donc soumis à l'influence d'un champ électrique total constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant résultant de l'application sur les barres de tensions électriques positives et négatives. Les ions accélérés suivant l'axe z pénètrent entre les barres du quadripôle et conservent leur vitesse, mais ils sont soumis suivant x et y aux accélérations résultantes des forces dues aux champs électriques. Tant que simultanément x et y restent inférieurs à la moitié de la distance r_0 séparant deux barres, l'ion pourra traverser le quadripôle sans toucher les barres. Sinon, il s'y déchargera et ne sera pas détecté.

En ce qui concerne l'« ion trap » (ou quistor), il est constitué d'une électrode circulaire, couverte de deux calottes sphériques. Conceptuellement, on peut voir cet appareillage comme un quadripôle circulaire (14). La superposition des tensions continues et alternatives permet d'obtenir une sorte de « quadripôle à trois dimensions » dans lequel les ions sont gardés captifs (« piégés ») sur une trajectoire formant une sorte de huit à trois dimensions (Figure 3). Les ions de différentes masses sont présents simultanément dans la trappe, et on cherchera à les expulser en fonction de leur masse pour obtenir le spectre. Cette technique consiste donc à produire des ions directement dans la trappe par impact électronique. Il n'y a pas de source séparée. Les ions sont formés par un flux d'électrons de courte durée et piégés au moyen de radiofréquences (16).

La pression du gaz inerte dans l'analyseur (10^{-3} torr) est plus élevée que celle d'un quadripôle (10^{-5} torr). En effet, l'addition d'hélium à cette pression permet d'accroître la sensibilité de la méthode : les collisions entre les molécules d'hélium et

les ions augmentent l'efficacité du piège à ion (16). Cependant, les spectres de masse ainsi obtenus sont modifiés à cause des dissociations induites par collisions et par l'autoionisation chimique, toutes deux résultant de la pression relativement importante dans l'appareil (« vide » moins important) (14). Depuis 1996, la plupart des appareils commercialisés utilisent une source externe. Ils permettent l'obtention de spectres de qualité comparable à ceux des quadripôles. Cette amélioration pourra éventuellement éviter de nombreuses erreurs d'attribution et d'identification de composés par l'utilisation de l'un ou l'autre de ces analyseurs de masse, comme ont pu le constater, par exemple, Adams et Weyerstahl pour les isomères de l'hydrate de sabinène (17). Depuis 1995, les performances de ces appareils ont été fortement accrues, de manière à permettre une gamme de masse plus large et des expériences de type SM/SM.

Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, est ensuite détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Toutefois, les détecteurs les plus courants sont les multiplicateurs d'électrons ou de photons, permettant l'augmentation de l'intensité du signal détecté (Figure 3).

Pour le multiplicateur d'électrons, toute particule heurtant la surface interne du détecteur provoque l'émission d'électrons qui sont alors accélérés par un champ électrique vers l'intérieur d'un tube de verre (dans le cas d'un multiplicateur de type Channeltron à dynode continue) pour venir à nouveau frapper la paroi et provoquer l'émission d'un plus grand nombre d'électrons secondaires. Certains multiplicateurs commerciaux peuvent présenter 10 à 14 dynodes en série et possèdent également une très bonne sensibilité à la détection des ions (14).

Le multiplicateur de photons permet la détection des ions positifs ou négatifs. Pour chaque mode (positif ou négatif), les ions sont accélérés vers la dynode portée à un potentiel opposé. Les électrons secondaires émis sont alors accélérés vers un écran phosphorescent où ils sont convertis en photons. Ces photons sont ensuite détectés par le photomultiplicateur (14).

Finalement, l'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs des masses et des intensités des pics et en courant ionique total. Il permet l'examen des données enregistrées et leur manipulation : spectres de masse, chromatogrammes reconstitués, soustraction d'un spectre par rapport à un autre, calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres, etc...

Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles (Figure 4), commerciales (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (18), Wiley Registry of Mass Spectral Data (19), contenant plusieurs milliers de spectres, König-Joulain, intitulée « Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils » contenant plus de 1200 composés) ou construite au laboratoire. Ainsi une bibliothèque dénommée « Arômes » a été construite par nos soins. Elle contient près de 500 spectres de composés essentiellement terpéniques. Les spectres de masse expérimentaux peuvent aussi, si besoin, être comparés à des spectres contenus dans des bibliothèques non informatisées (20-23). En général, les résultats sont meilleurs avec des références enregistrées au laboratoire avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques.

Si, dans la grande majorité des cas le couplage CPG/SM fonctionne correctement, certains auteurs ont souligné les difficultés rencontrées lors de l'identification de molécules possédant des spectres de masse insuffisamment différenciés, voire superposables, comme pour le 1-endo-bourbonanol (sesquiterpène tricyclique) et le 1,6-germacradièn-5-ol (monocyclique) (24). C'est donc le cas de certains sesquiterpènes et diterpènes, puisque ces molécules sont construites à partir des mêmes entités isopréniques.

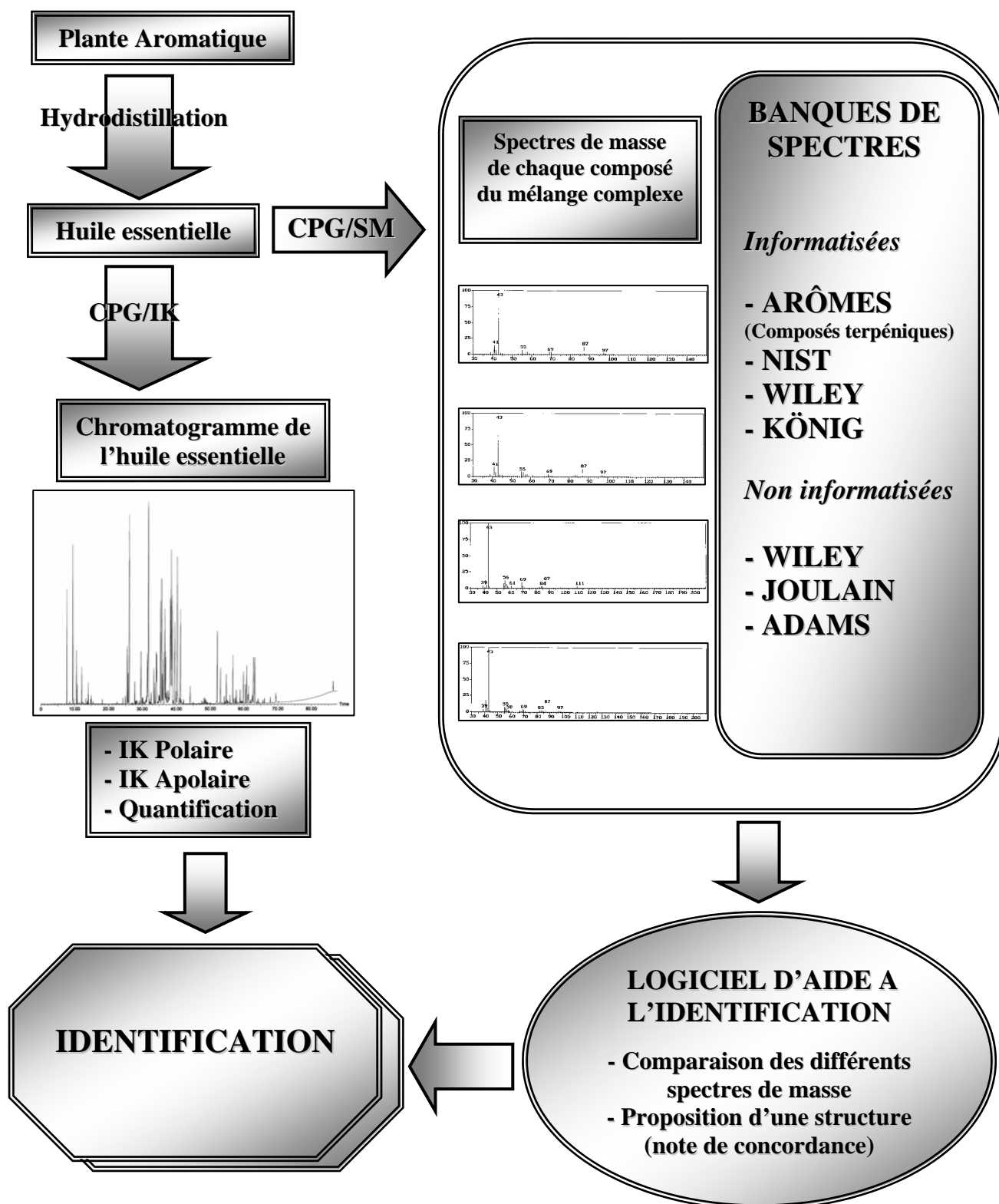


Figure 4 : identification des composés d'une huile essentielle par CPG/IK et CPG/SM.

On rencontre ce problème non seulement avec les composés ayant une structure très proche (stéréoisomères), comme le (E,Z)- α -farnésène et le (Z,Z)- α -farnésène ou encore le (Z)- β -farnésène et le (E)- β -farnésène, mais également avec des molécules ayant des squelettes différents mais des spectres de masse identiques, comme pour le (E,Z)- α -farnésène (sesquiterpène linéaire) et le cis- α -bergamotène (sesquiterpène bicyclique) (25). C'est pourquoi, l'identification d'une molécule nécessite d'avoir son spectre de masse et ses indices de rétention sur deux colonnes identiques à ceux des produits de référence. Ainsi, divers auteurs (26-28) ont développé des logiciels de traitement des données facilitant l'identification de composés présents dans une huile essentielle à partir de leur spectre de masse et des valeurs de leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire.

c. Le couplage CPG/SM-ICP et CPG/SM-ICN.

Le couplage CPG/SM en mode ionisation chimique (IC), positive (ICP) ou négative (ICN) constitue une technique d'« ionisation douce » permettant d'accéder par exemple à la masse moléculaire d'un composé, alors que ce même pic moléculaire n'est pas observable en IE (29). L'ionisation chimique est disponible pour l'analyseur quadripolaire mais aussi pour le piège à ion ou « ion trap ».

L'ionisation chimique consiste à produire des ions par collision de la molécule à ioniser avec des ions primaires présents dans la source. On cherche donc à provoquer des collisions ion-molécule dans une partie délimitée de la source. Pratiquement toutes les substances neutres sont susceptibles de donner des ions positifs (ICP), alors que les ions négatifs (ICN) nécessitent la présence de molécule comportant un ou plusieurs atomes électronégatifs permettant la capture d'électrons (14).

Ainsi, la distinction entre un alcool et l'acétate correspondant est en général possible par l'observation en SM-ICP du pic moléculaire, alors qu'en SM-IE les deux molécules peuvent perdre, soit une molécule d'eau soit une molécule d'acide acétique, et présenter des spectres de masse identiques (25, 30). De la même façon, la

différenciation de divers isomères de dérivés pinaniques (α -pinène, β -pinène et cis- δ -pinène, pinocamphone et isopinocamphone, nopinone et isonopinone, etc...) est possible en ICP en utilisant de l'ammoniac comme gaz ionisant (31). Parallèlement, il a été possible de déterminer, toujours en ICP, la position des doubles liaisons dans des molécules diéniques conjuguées (séries de quatre stéréoisomères [Z,Z ; Z,E ; E,Z ; E,E] ayant pour squelette : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_y\text{R}$ avec $\text{R} = \text{CHO}$; CH_2OH ; $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$; CH_2OCHO ou CH_3) en fonction des ions formés et de leur abondance relative en utilisant de l'isobutane comme gaz ionisant (32). L'ICN a été utilisée pour accéder à la masse moléculaire de certaines substances soufrées et apporter également des éléments utiles à une détermination structurale (33). La spectrométrie de masse en mode ionisation chimique permet de différencier certains isomères (30), mais le choix du gaz réactif (méthane, isobutane ou ammoniac pour l'ICP et mélange de protoxyde d'azote et de méthane ($\text{N}_2\text{O}/\text{CH}_4$) ou ammoniac pour l'ICN) est surtout dicté par le type de molécule à analyser. Ainsi, la discrimination par CPG/SM-ICP d'esters monoterpéniques et sesquiterpéniques, est très supérieure avec l'ammoniac comme gaz réactif par rapport à l'isobutane (30). Néanmoins, cette technique d'ionisation douce doit surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM-IE pour l'identification des constituants des huiles essentielles (34).

d. Le couplage CPG/SM/SM.

Les nombreuses difficultés rencontrées lors de l'analyse de mélanges complexes, que ce soit dans le domaine médical (drogues, poisons), dans la recherche de polluants dans l'environnement ou dans l'étude de coupes pétrolières, etc... ont conduit, récemment, à la mise en œuvre de la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM/SM) (35) ou à triple analyseur (36). Cette technique, habituellement couplée à la CPG, permet la sélection d'un ion puis sa fragmentation dans un deuxième spectromètre, celle-ci pouvant être réalisée en présence d'un gaz réactif. Les fragments de l'ion secondaire constituent un deuxième spectre de masse qui diffère en fonction de l'origine de l'ion primaire. Ainsi,

Decouzon et coll. (37) ont montré que le couplage SM/SM-ICN permet de différencier quatre stéréoisomères du dihydrocarvéol à partir des fragments caractéristiques induits par la stéréochimie de la molécule (position axiale ou équatoriale des groupements hydroxyle et méthyle) alors que ce n'est pas le cas pour la SM-ICN.

e. Le couplage CPG/IRTF.

Le couplage de la CPG avec l'IRTF permet l'analyse des substances volatiles. En effet, l'IRTF renseigne sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules, différencie les stéréoisomères géométriques éventuels et permet l'identification de certaines molécules par l'examen du domaine des « empreintes digitales ». Ainsi, Joulain et coll. (24) ont démontré que deux alcools sesquiterpéniques : le 1-endo-bourbonanol (tricyclique) et le 1,6-germacradièn-5-ol (monocyclique), qui possèdent des spectres de masse identiques, peuvent être différenciés à l'aide de leur spectre infrarouge et de leurs indices de rétention. De même, du fait de la transposition thermique de Cope, à l'intérieur de la source du spectromètre, conduisant au γ -élémente à partir du germacrène B et au bicycloélémente à partir du bicyclogermacrène, ces deux couples de composés ont les mêmes spectres de masse en SM-IE. En revanche, l'identification de ces sesquiterpènes est possible à partir de leurs spectres IRTF en phase vapeur (38). Cependant dans le domaine des huiles essentielles, cette technique doit plutôt être utilisée en complémentarité de la SM et des IK, plutôt que seule (39).

f. Le couplage CPG/IRTF/SM.

Ponctuellement, la CPG couplée à deux détecteurs spectroscopiques (IRTF et SM) est utilisée pour la caractérisation des huiles essentielles. Par exemple, l'analyse par CPG/IRTF/SM d'une huile essentielle d'*Eucalyptus australiana* (40), contenant le 1,8-cinéole comme produit fortement majoritaire, a permis l'identification d'un nombre important de produits en faible quantité. De plus, une meilleure séparation et détection peuvent être obtenues par l'utilisation de la CPG multidimensionnelle (CPGMD) à trois colonnes, une pré-colonne de polarité intermédiaire et deux colonnes

analytiques polaire et apolaire, combinées avec deux détecteurs spectroscopiques (CPGMD/IRTF/SM) (41).

g. Les couplages CLHP/SM et CLHP/CPG/SM.

Malgré les incompatibilités opérationnelles apparentes de ces deux techniques (vide poussé, hautes températures et spectres de masse obtenus en phase gazeuse pour la SM, hautes pressions, températures relativement basses et phase liquide pour la CLHP), le couplage CLHP/SM permet d'accéder à la caractérisation de la fraction non volatile des produits naturels, qui peut comprendre les limonoïdes, les flavonoïdes, les coumarines, etc... Ainsi, Cremin et coll. (42) ont utilisé ce couplage pour l'identification d'esters sesquiterpéniques dans des extraits méthanoliques de plusieurs champignons pathogènes du genre *Armillaria*. Par ailleurs, un couplage CLHP/UV/SM a été mis en œuvre pour l'analyse d'extraits végétaux (43).

Dans le couplage CLHP/CPG/SM, l'utilisation de la CLHP permet un premier fractionnement. En effet, les constituants sont séparés par classe de composés avant l'introduction dans la colonne capillaire de la CPG, où une nouvelle séparation est réalisée. Ce pré-fractionnement permet une fiabilité plus grande dans l'identification par SM en limitant les coélutions (44, 45).

h. Le couplage CLHP/RMN ^1H .

Il convient de signaler enfin, l'existence d'un couplage direct entre la CLHP et la RMN ^1H permettant d'obtenir des informations structurales. Deux méthodes peuvent être utilisées : la première méthode dite par « flux non continu » consiste à arrêter l'élution quand un constituant est présent dans la sonde du spectromètre. La seconde méthode est dite par « flux continu » et l'acquisition des données est faite à l'aide d'une sonde où le liquide est en écoulement. Ce type de couplage présente des inconvénients comme la présence de solvants protonés dans les échantillons à analyser. Cette difficulté est contournée par la mise en œuvre de techniques

d'irradiation sélectives ou par l'utilisation de solvants deutériés. Actuellement, la puissance des aimants (jusqu'à 21,1 Tesla pour les plus puissants) permet d'enregistrer un spectre avec une quantité de substance pure de l'ordre du nanogramme (46). Cette association est surtout utilisée dans l'industrie pharmaceutique : l'étude de mélanges simples, comme l'identification des impuretés dans les drogues (47) ou les métabolites de médicaments et des vitamines (46, 48). Elle est également utilisée dans l'industrie agroalimentaire, dans l'analyse de polymères ou des carburants (46). De plus, le couplage CLHP/RMN ^1H a également été utilisé pour l'identification de terpènes. En effet, Spring et coll. (49) ont élucidé la structure de trois lactones sesquiterpéniques présentes dans un extrait de feuilles de *Zaluzania grayana*.

i. Les couplages, usage et abus.

Cependant, l'utilisation de tels couplages, bien que donnant d'excellents résultats quand ils sont utilisés à bon escient, doit faire l'objet de la plus grande prudence si l'on veut éviter les erreurs, liées essentiellement à une informatisation poussée de ces différentes techniques ou à un excès de confiance. Joulain (50) a parfaitement décrit les avantages et les inconvénients des techniques les plus utilisées et dénoncé les abus résultant d'une utilisation superficielle de certaines d'entre-elles. Il dresse un large éventail des erreurs fréquemment commises et préconise de prendre les mesures et les précautions élémentaires permettant de ne donner que des résultats fiables.

B. SEPARATION DES CONSTITUANTS PREALABLEMENT A LEUR IDENTIFICATION (VOIE B).

Dans la voie **B** (Figure 2), l'identification des différents constituants présents dans une huile essentielle nécessite un fractionnement de cette même huile essentielle par distillation fractionnée et/ou par une ou plusieurs techniques chromatographiques (CCM, CLC, CLHP ou CPGP), suivi de leur identification par comparaison des données spectrales avec celles de composés de référence : spectres de masse, spectres IR, spectres de RMN du proton et du carbone-13, RMN bidimensionnelle, lorsque la

quantité de produit isolé est suffisante. Cette voie est indispensable lorsqu'il s'agit d'élucider la structure d'un composé qui n'a jamais été décrit. Elle est d'une fiabilité et d'une efficacité indiscutables quand il s'agit de l'identification, dans une huile essentielle, des constituants dont la structure est connue, mais elle demande énormément de temps que ce soit pour le fractionnement, la purification des produits et pour leur identification.

A titre d'exemple nous pouvons citer les excellents travaux de Weyerstahl et coll. (51-55), qui réalisent des fractionnements très poussés, par distillation fractionnée et chromatographies répétées (CLC, CCM) de l'huile essentielle. Ceci permet d'isoler des composés connus ou inconnus dont l'identification est basée sur la combinaison des résultats obtenus en SM et RMN ^1H et ^{13}C . Ainsi, l'association des données obtenues par les différentes techniques spectroscopiques a permis l'identification de 90, de 160 et de 186 composés respectivement dans les huiles essentielles d'*Achillea eriophora* (51), d'*Artemisia sieberi* (52) et de *Cistus ladaniferus* (53). De même, l'étude par RMN ^1H a permis de différencier de très nombreux diastéréoisomères dans la fraction sesquiterpénique de l'huile essentielle d'*Artemisia laciniata* (54). Enfin, vingt nouveaux composés naturels ont pu être identifiés dans l'huile essentielle de *Lantana camara*, notamment des aldéhydes sesquiterpéniques tricycliques possédant le squelette hélifolane (55).

C. ANALYSE PAR RMN DU CARBONE-13 SANS SEPARATION PREALABLE (VOIE C).

L'utilisation de la RMN pour l'identification de molécules connues présentes dans une huile essentielle a été non seulement suggérée mais fortement conseillée (56). Afin d'éviter ou tout au moins de réduire les fastidieuses étapes de purification, il était donc intéressant de pouvoir utiliser la RMN sans passer par une séparation préalable des constituants, pour l'analyse d'un mélange complexe. Dans cette optique l'utilisation de la RMN du carbone-13 qui permet d'avoir des spectres simplifiés s'imposait. A la suite des travaux précurseurs de Formáček et Kubeczka (57), une méthode d'identification des constituants des mélanges naturels, basée sur l'analyse du

spectre de RMN du mélange a été mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse (58). En fait, jusqu'au début des années 90, la RMN permettait de contrôler la présence d'un composé préalablement identifié ou suspecté par une autre technique (CPG/SM par exemple). L'informatisation de la recherche des structures à partir de bibliothèques de spectres a permis d'en faire une véritable méthode d'analyse appliquée à différentes familles de composés naturels : terpènes dans les huiles essentielles (59-61), acides diterpéniques dans les résines (62), triterpènes dans les extraits de liège (63), phénols et sucres anhydres dans les liquides de pyrolyse de la biomasse (64, 65), sucres dans les miels (66), etc...

a. Intérêt de la RMN du carbone-13.

Malgré sa faible abondance isotopique naturelle, le carbone-13 est préféré aux autres noyaux pour les raisons suivantes (60) :

- le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents atomes sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non-équivalents. Ainsi, le spectre de RMN du carbone-13 présente autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule. Par ailleurs, la fréquence de résonance des carbones étant très sensible à l'environnement stérique et électronique, la moindre modification structurale se traduit par une variation, plus ou moins importante mais mesurable, des déplacements chimiques de pratiquement tous les carbones de la molécule.

- Les spectres de RMN du carbone-13 peuvent être simplifiés par irradiation totale des hydrogènes, ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une raie de résonance par carbone.

- Le temps de relaxation T_2 (temps de relaxation spin-spin) est plus important dans le cas du carbone que dans celui du proton ; la largeur du signal de résonance à mi-hauteur étant inversement proportionnelle à T_2 , il en résulte un gain dans la finesse des pics et donc en résolution.

- Le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage beaucoup plus vaste que celle des protons (250 ppm par rapport à 12 ppm) ce qui procure une plus grande dispersion spectrale (résolution effective) (4).

- Les spectres sont réalisés à température ambiante, ce qui évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles.
- La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré pour être éventuellement soumis à d'autres analyses.
- Enfin, l'étude de produits « lourds » ne pose pas de problèmes particuliers alors que leur faible volatilité rend souvent leur analyse difficile par CPG (nécessité d'une réaction préliminaire de dérivatisation qui permet d'obtenir des produits moins polaires et généralement plus volatils).

b. Principe.

L'identification d'un composé par RMN du carbone-13 est basée comme dans toutes les autres méthodes comparatives, sur l'attribution directe, dans le spectre du mélange, des différentes raies de résonance d'un composé donné en les comparant avec celles des spectres de produits purs contenus dans une bibliothèque de spectres. Par rapport aux précédentes techniques de couplage, dans le cas de la RMN, chaque composé ne fait pas l'objet d'une individualisation.

Les conditions expérimentales d'enregistrement des spectres doivent être optimisées et standardisées de façon à permettre une bonne reproductibilité des résultats, pour limiter les variations des déplacements chimiques des carbones d'un composé donné dans le mélange, par rapport à ceux du produit pur.

Il arrive parfois, que la nature des constituants, tout autant que leurs proportions relatives au sein du mélange, induisent des variations importantes du déplacement chimique de quelques carbones rendant ainsi l'identification plus délicate. Il est cependant possible d'appréhender le sens et l'amplitude de ces variations (67). Il est aussi important de connaître à partir de quelle concentration (liée à la quantité de produit disponible et à la sensibilité de l'appareillage), il est possible d'observer dans le spectre les signaux appartenant à un produit minoritaire ou ultra-minoritaire.

c. Observation et individualisation des signaux dans le spectre d'un mélange complexe.

En fait, différents aspects sont à considérer, à savoir l'observation et l'individualisation des différentes raies de résonance dans le spectre du mélange, l'attribution de chacune de ces raies de résonance à un produit donné permettant son identification et enfin, éventuellement quand cela est nécessaire, la quantification des différents constituants du mélange. L'observation des signaux, dans les spectres de produits purs, ne pose pas de difficulté et dépend essentiellement de deux paramètres : la quantité de produit disponible et/ou sa solubilité dans un solvant donné et la sensibilité de l'appareil utilisé, exprimée par le rapport signal sur bruit (S/B). Les carbones quaternaires, qui relaxent plus lentement que les autres, ont un signal moins intense dans des conditions expérimentales standard, définies de manière à obtenir des spectres corrects avec un temps d'utilisation de l'appareil acceptable, ils seront donc beaucoup plus difficiles à observer.

En règle générale, le manque de produit ou de sensibilité (S/B) peut être partiellement compensé par une augmentation du nombre d'acquisitions, il en découle donc un temps d'expérimentation plus long (plusieurs heures). Il est à noter, que le temps d'utilisation de l'appareil devient très vite excessif par rapport au gain escompté, S/B étant proportionnel à la racine carrée du nombre d'acquisitions. La réalisation de spectres totalement découplés (irradiation des protons), permet, grâce à la récupération de l'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement), d'augmenter l'intensité des signaux de tous les carbones protonés jusqu'à un facteur 3 par rapport aux carbones quaternaires (1, 4). De même, on peut augmenter le rapport S/B en utilisant les séquences DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfert) ou INEPT (Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfert) (4, 68). Récemment, le développement des cryosondes a permis d'augmenter très nettement la sensibilité et de diminuer considérablement la durée des expérimentations (69). Par ailleurs, le développement d'aimants supraconducteurs à haut champ (jusqu'à 21,1 Tesla, 900 MHz en RMN du proton) améliore à la fois la sensibilité et permet de réduire assez nettement le temps d'utilisation de l'appareil, à partir d'une plus faible

quantité de produit. Enfin, dans un avenir assez proche, on peut imaginer certains appareillages équipés d'aimants à très hauts champs (25 Tesla) qui pourront opérer à une fréquence supérieure à 1 GHz pour le proton, soit 250 MHz pour le carbone-13. Cependant, le prix et les frais de fonctionnement d'un tel appareillage limitent leur accessibilité dans la plupart des laboratoires de recherche (70, 71).

Il est également possible d'améliorer considérablement la résolution des appareils de routine (72, 73) par de simples modifications de l'appareillage (suppression des gradients de température dans la sonde, augmentation du débit de refroidissement d'air, diminution de la puissance de découplage des protons [par l'utilisation de découpleurs à faible puissance qui fonctionnent sur le mode « Composite Phase Decoupling » (CPD)], utilisation d'un ordinateur performant et d'une sonde spécifique). On peut également augmenter la résolution en utilisant une largeur spectrale réduite.

Dans le cas des spectres des mélanges, compte tenu du nombre plus important de raies de résonance, l'individualisation de tous les signaux dépend de plusieurs paramètres qui sont :

- le nombre de composés présents dans le mélange mais également le nombre de carbones constitutifs de chacun d'entre eux, augmentant ainsi la probabilité de superpositions des signaux ;
- la différence entre les concentrations relatives des différents constituants, particulièrement préjudiciable à l'observation des carbones de produits minoritaires (les carbones quaternaires en particulier) ;
- les similitudes observées au niveau d'une partie du squelette carboné de deux molécules qui provoquent une augmentation du nombre de superpositions des carbones possédant des environnements magnétiques similaires.

d. Identification des constituants d'un mélange complexe.

Pour chaque famille de composés, un protocole expérimental a été élaboré et optimisé au laboratoire (choix du solvant, dilution, etc...) : pour les terpènes (60, 63), pour les phénols polysubstitués (64), pour les sucres (66) et pour les acides terpéniques (62). L'enregistrement des spectres des mélanges et des produits de référence est réalisé dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques afin d'obtenir à la fois une bonne résolution des signaux et de satisfaire aux conditions de reproductibilité des mesures des déplacements chimiques (δ).

Plusieurs bibliothèques de spectres ont été constituées. La plus importante est celle des composés terpéniques (banque « Terpènes » constituée de plus de 500 produits de référence) à partir de laquelle la méthode d'analyse a été mise au point. Cette banque est régulièrement enrichie avec des terpènes isolés à partir d'huiles essentielles ou préparés par hémisynthèse. Les autres bibliothèques (phénols, sucres, lipides, triterpènes) contiennent un nombre plus limité de composés. Par ailleurs, des bibliothèques de spectres concernant principalement des composés terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes) ont été constituées à partir des données de la littérature récente (directement utilisables car les spectres sont enregistrés en solution diluée).

L'originalité de cette méthode de travail réside dans l'informatisation de la recherche. En effet, un logiciel d'aide à l'identification a été conçu et élaboré au laboratoire (60). Il permet de comparer le déplacement chimique de chaque carbone dans n'importe quel spectre expérimental avec ceux des spectres des composés purs répertoriés dans chacune des bibliothèques disponibles (Figure 5). Ainsi, l'informatisation de la recherche permet en quelques minutes l'édition de toutes les informations nécessaires à la caractérisation des constituants d'un mélange complexe (attribution des raies de résonance, variation des déplacements chimiques, superpositions).

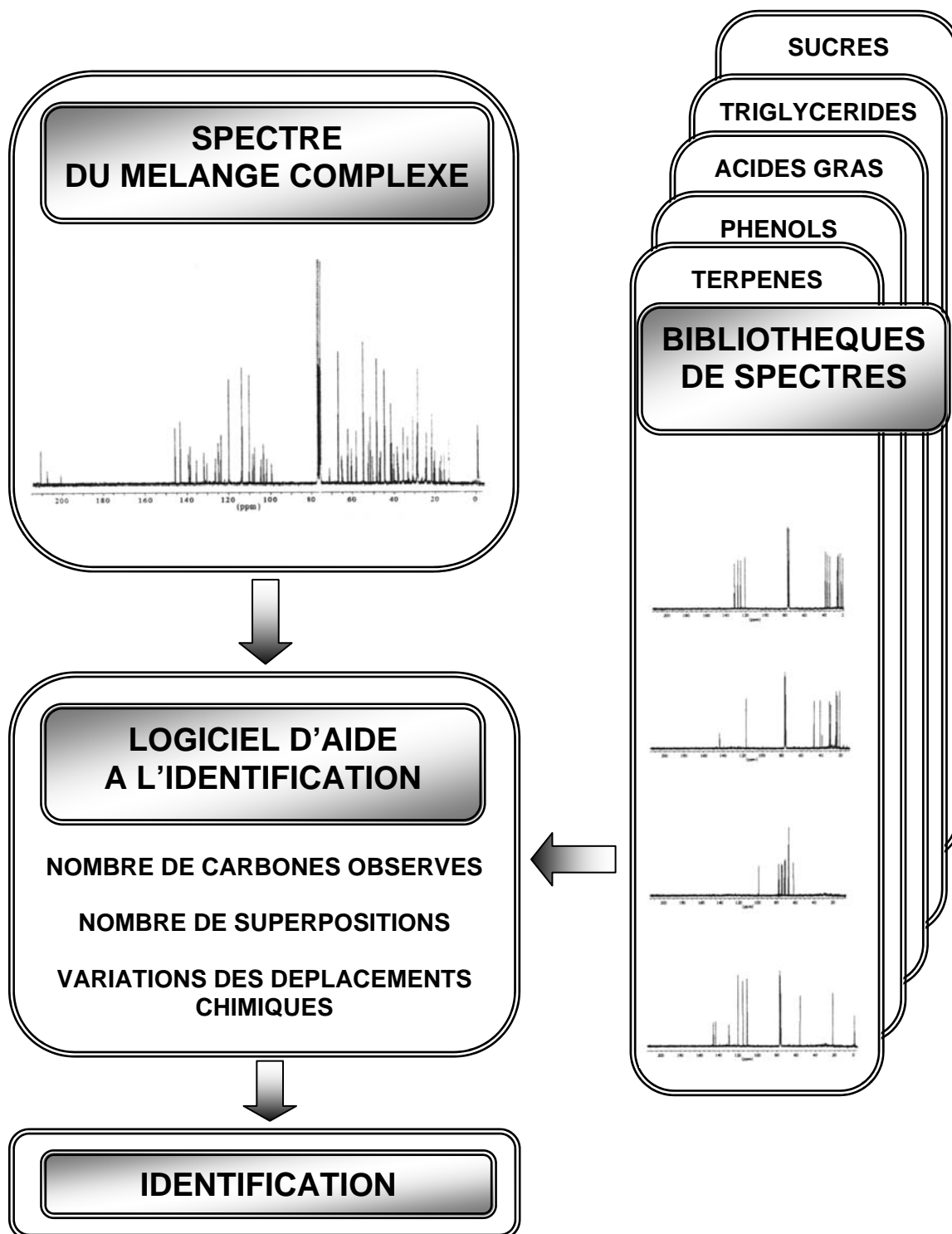


Figure 5 : identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du carbone-13.

L'identification avec certitude des composés présents dans le mélange est rendue possible par la prise en compte des paramètres suivants :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- le nombre de superpositions des signaux qui peuvent se produire quand les différents effets stériques et électroniques font que deux carbones appartenant à deux molécules différentes ont fortuitement le même déplacement chimique, ou quand les composés présents ont une partie de leur squelette très proche ;
- les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence ($\Delta\delta$) ;
- l'intensité des raies de résonance observées qui permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à un composé donné.

Les composés ainsi identifiés à partir du spectre de RMN, sont ensuite repérés, en général sans ambiguïté, sur le chromatogramme du mélange (quand il s'agit de composés volatils) par comparaison de leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire avec ceux des produits de référence, ce qui permet de les quantifier. Quand il y a des difficultés pour la quantification par CPG (molécules non volatiles, molécules thermosensibles) celle-ci peut être réalisée par RMN (62, 63, 74).

Cette méthode d'analyse, schématisée par la figure 5, allie rapidité et fiabilité. Elle est complémentaire des techniques conventionnelles développées dans les voies **A** et **B**. Dans le domaine des huiles essentielles et avec un appareil de routine (4,7 Tesla), il est possible à l'heure actuelle, d'identifier directement jusqu'à deux douzaines de constituants, à condition qu'ils soient présents dans nos bibliothèques de spectres et que leur teneur soit supérieure ou égale à 0,5%. Ces informations résultent de l'expérience acquise par l'équipe « Chimie et Biomasse », suite à l'enregistrement et au traitement de plusieurs milliers de spectres. D'une manière générale :

- tous les carbones sont observés à l'exception des carbones quaternaires des composés minoritaires ;

- les variations des déplacements chimiques sont inférieures ou égales à 0,05 ppm pour la très grande majorité des carbones ;
- le nombre de superpositions est limité et n'empêche pas l'identification d'un composé par l'observation d'au moins 50% des carbones qui lui appartiennent en propre.

Au laboratoire, cette méthode d'analyse par RMN du carbone-13 associée ou non au couplage CPG/SM et à l'utilisation des indices de rétention a permis de caractériser un grand nombre d'huiles essentielles de Corse telles que *Myrtus communis* (75), *Rosmarinus officinalis* (76), *Cistus ladaniferus* (77), *Stachys glutinosa* (78), *Calamintha nepeta* (79), *Ferula arrigonii* (80) ou encore *Pistacia lentiscus* (81) et *Pinus nigra* ssp. *laricio* (82). De nombreuses autres espèces ont été étudiées en collaboration : *Thymus carnosus* (83), *Thymus caespititius* (84) et *Thymus camphoratus* (85) du Portugal, *Juniperus cedrus* de Madère (86), divers *Ocimum* (87), divers Zingibéracées (88) ainsi que *Croton stellulifer* de Sao Tomé et Príncipe (89), *Lippia multiflora* de Côte d'Ivoire (90), *Commifora africana* du Bénin (91), divers espèces d'*Hedyosmum* du Costa Rica (92), divers *Piper* de Panama (93), *Piper fulvescens* du Paraguay (94) ou encore *Acanthopanax trifoliatum* (95), *Hibiscus abelmoschus* (96) et *Enhydra fluctuans* (97) du Viêt-Nam.

Dans la mesure où cette méthode permet d'identifier les principaux constituants à partir du spectre unique d'une huile essentielle, elle est donc bien adaptée à l'étude de la variabilité chimique car celle-ci nécessite l'analyse d'un nombre important d'échantillons. Ainsi, la variabilité chimique de plusieurs plantes a été étudiée : *Thymus herba-barona* (98), *Pistacia lentiscus* (81), *Juniperus phoenicea* (99), *Pinus nigra* ssp. *laricio* (82) de Corse mais aussi *Thymus carnosus* (83), *T. caespititius* (84), *T. camphoratus* (85) du Portugal, *Piper lanceaefolium* (100) et également pour un grand nombre de *Citrus* (101-103). La composition chimique en fonction de l'état végétatif a également été étudiée par la RMN du carbone-13, en ce qui concerne *Myrtus communis* ou *Calamintha nepeta* (75, 79).

L'utilisation de cette technique est également intéressante pour l'identification rapide et sans difficultés de composés délicats à analyser par les techniques conventionnelles, tels que les molécules ayant des structures très proches, des stéréoisomères par exemple, les composés qui coéluent en CPG ou encore les molécules thermosensibles.

➤ Ainsi, en ce qui concerne les stéréoisomères, la RMN du carbone-13 a permis la différenciation des stéréoisomères du farnésol, de l'acétate de farnésyle et du farnésal (104), qui nécessite par ailleurs une combinaison de la SM et de l'IRTF (105). De même, l'identification de quatre stéréoisomères possédant un squelette cédrannique (α -cédrene/ α -funébrène et β -cédrene/ β -funébrène) est difficile en SM dans la mesure où leurs spectres de masse sont quasiment superposables deux à deux et leurs indices de rétention sont assez proches. Par contre, les spectres de RMN du carbone-13 de ces quatre composés sont suffisamment différents pour pouvoir les identifier sans difficultés (60, 106, 107). Parallèlement, l' α -bisabolol et l'épi- α -bisabolol, deux alcools sesquiterpéniques qui ne diffèrent que par la configuration relative de l'un des deux carbones asymétriques, possèdent des spectres de masse identiques et des indices de rétention très proches. De nouveau, seuls les spectres de RMN du carbone-13 des deux molécules, très différents, permettent leur identification (61), même quand un seul des isomères est présent dans l'huile essentielle (108).

➤ La coélution de certains couples de terpènes en fonction de la phase utilisée est bien connue (par exemple 1,8-cinéole/ β -phellandrène). D'autres coélutions peuvent se produire malencontreusement. Ainsi, l'étude par CPG/SM de l'huile essentielle de *Piper betle* du Viêt-Nam conduisait à l'identification du δ -cadinol avec une teneur d'environ 20% alors que l'analyse par RMN de cet échantillon a révélé en réalité une coélution, avec la colonne utilisée entre le τ -cadinol et le τ -muurolol (environ 10% chacun) (109). Enfin, la différenciation énantiomérique de composés terpéniques, est également possible par RMN du carbone-13 par l'utilisation de réactifs de déplacements chiraux (110-112).

➤ La RMN du carbone-13 a également été utilisée comme un outil dans l'identification et la quantification de molécules thermosensibles. Ainsi,

l'identification et la quantification de deux sesquiterpènes furaniques ont été rendues possibles grâce à la RMN dans l'huile essentielle de *Smyrniium olusatrum* (74). En effet, le furanodiène se transforme thermiquement, selon une réaction sigmatropique [3,3] (transposition de Cope), pour donner le furanoélémente. Cette transposition se produisant en partie dans l'injecteur et en partie dans la colonne de chromatographie, rendant impossible la différenciation en CPG/IK et en CPG/SM. La RMN a permis également l'analyse d'autres molécules thermolabiles tels que les gingérols présents dans les extraits au CO₂ supercritique de gingembre (113).

Enfin, l'analyse de composés « lourds » souvent très polaires (acides) n'est possible en CPG que par une réaction préliminaire de dérivatisation (modification chimique par méthylation, acétylation ou triméthylsilylation), alors que l'utilisation de la RMN du carbone-13 ne demande aucun traitement préalable de l'échantillon. En fait, seul le protocole expérimental doit être adapté à chaque famille de composés. C'est ainsi que la RMN du carbone-13 a été mise en œuvre pour l'identification et la quantification de composés non volatils comme les sucres contenus dans les miels (66, 113), les dérivés phénoliques et les dérivés glucidiques présents dans les liquides de pyrolyse de la biomasse (64, 65), les triglycérides d'huiles d'olive, d'extraits de farine de châtaigne et du lait (113) ainsi que les triterpènes contenus dans les extraits de liège (63) et les acides diterpéniques contenus dans les résines de pin (62). La RMN du carbone-13 s'est donc révélée être une méthode tout à fait adaptée à la caractérisation des mélanges naturels.

II. PROBLEMATIQUE DE LA RECHERCHE.

Ce travail, financé par la Collectivité Territoriale de Corse, s'inscrit dans le cadre général des travaux réalisés sur la valorisation des ressources naturelles par différents laboratoires de recherche de l'Université de Corse. Les huiles essentielles constituent des produits à forte valeur ajoutée qui peuvent être par la suite valorisés dans différents secteurs d'activités : pharmacie, parfumerie, cosmétique ou agroalimentaire. Cette valorisation passe par une étape préliminaire de détermination

de leur composition chimique pour les caractériser, pour mettre en évidence une éventuelle spécificité ou pour en évaluer la qualité.

Nous nous sommes proposés de mettre en œuvre la méthode d'analyse développée dans nos laboratoires. Ainsi, l'identification d'un constituant d'une huile essentielle nécessite en général plusieurs étapes (Figure 6). L'huile essentielle est d'abord analysée par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13. Elle peut éventuellement être soumise à un fractionnement par chromatographie sur colonne, les fractions obtenues seront alors analysées par les trois techniques précédentes. Différentes situations peuvent alors se présenter :

(a) le composé est décrit dans l'une de nos bibliothèques de spectres. L'identification est réalisée sans ambiguïté à partir de la CPG/SM et/ou de la RMN du carbone-13 par comparaison des données spectrales avec celles de composés de référence contenus dans nos bibliothèques constituées au laboratoire (respectivement « Arômes » et « Terpènes »). La CPG permettra l'obtention des indices de rétention polaire et apolaire de tous les constituants de l'échantillon et la quantification de chacun d'entre eux.

(b) Un composé est absent des bibliothèques construites au laboratoire mais il est présent dans une de nos banques « commerciales » ou « littératures ». Sa structure sera contrôlée par SM et RMN du carbone-13.

(c) Un composé n'est pas décrit en RMN du carbone-13 ou uniquement en SM. Une étude plus poussée est nécessaire, que ce soit une étude structurale après purification ou une hémisynthèse quand c'est opportun (114).

(d) Un composé est nouveau. Dans ce cas il est impératif de retourner au schéma classique : purification suivie d'identification structurale (115).

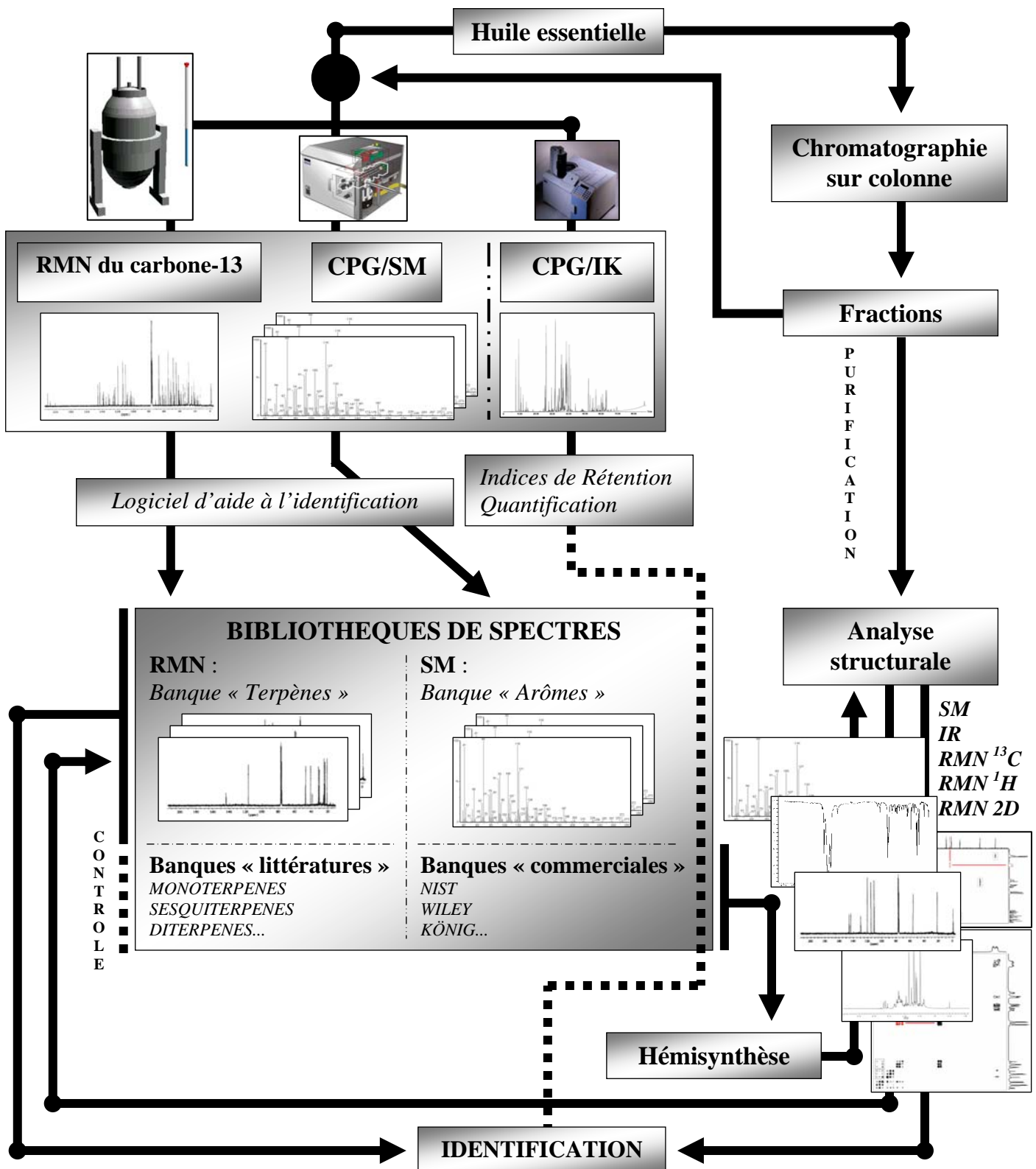


Figure 6 : les différentes voies d'identification des constituants d'une huile essentielle utilisées dans nos laboratoires.

Dans cette étude, il s'agissait pour nous de contribuer à une meilleure connaissance de plusieurs plantes aromatiques endémiques ou introduites à Madagascar (116), en étudiant la composition chimique de leurs huiles essentielles en réalisant un fractionnement plus ou moins poussé et en adaptant la méthode d'analyse en fonction des besoins.

La flore malgache est l'une des plus riches du monde et possède de nombreuses espèces aromatiques. Ces plantes sont exploitées à l'état sauvage ou cultivées et fournissent des huiles essentielles qui sont commercialisées par les producteurs locaux. Nous avons ainsi pu étudier un certain nombre d'huiles essentielles collectives provenant de plantes malgaches qui nous ont été fournies par ces mêmes producteurs.

Dans le chapitre suivant, nous allons caractériser les huiles essentielles de six espèces qui poussent à Madagascar (à l'état spontané ou cultivées) : *Cinnamomum camphora*, *Tagetes bipinata*, *Lantana camara*, *Eucalyptus citriodora*, *Cupressus lusitanicus* et *Chenopodium ambrosioides*. Ces huiles essentielles sont commercialisées et nous ont été fournies par des producteurs locaux. Les analyses de l'huile essentielle brute de tous les échantillons ont été réalisées par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13, après une étape de fractionnement rapide pour quelques-uns d'entre eux. Nous décrirons la composition de ces huiles essentielles en mettant en évidence les similitudes et les différences avec les données de la littérature et en décrivant les constituants qui présentent une originalité.

Nous réaliserons ensuite l'analyse d'un échantillon d'huile essentielle d'écorce de *Cedrelopsis grevei*, plante endémique de Madagascar, après avoir réalisé un fractionnement poussé de son huile essentielle. Cette étude nous servira de base pour l'analyse directe de cinq autres échantillons sans fractionnement.

Enfin, nous examinerons dans le dernier chapitre, la variabilité interspécifique des huiles essentielles du genre *Helichrysum* pour les espèces suivantes : *H.*

gymnocephalum, *H. bracteiferum*, *H. faradifani*, *H. selaginifolium*, *H. hypnoides*, *H. cordifolium* et *Helichrysum* sp.

CHAPITRE II

CARACTERISATION DE DIVERSES HUILES ESSENTIELLES DE MADAGASCAR

Dans ce chapitre nous allons décrire nos résultats relatifs à la caractérisation de divers échantillons d'huiles essentielles malgaches, huiles essentielles produites localement et commercialisées. Nous nous sommes intéressés aux espèces suivantes : *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl., *Tagetes bipinata* L., *Lantana camara* L., *Eucalyptus citriodora* Hooker, *Cupressus lusitanicus* Miller et *Chenopodium ambrosioides* L. Certaines de ces huiles essentielles d'origine malgache ont déjà fait l'objet de travaux antérieurs décrits dans la littérature. Notre étude sera donc comparative. Mais elle nous permettra également d'explicitier la méthodologie développée dans nos laboratoires. En effet, l'utilisation de couplage conventionnel (CPG/SM) et de la RMN du carbone-13, qui à partir d'un spectre unique, permet l'identification des composés terpéniques à une teneur proche de 0,5%, permet d'obtenir des résultats tout à fait fiables en nécessitant moins de temps que la voie purification-identification (voie dite **B** dans le premier chapitre).

I. L'HUILE ESSENTIELLE DE *CINNAMOMUM CAMPHORA*.

A. CINNAMOMUM CAMPHORA.

Cinnamomum camphora (L.) J. Presl. ou camphrier du Japon appartient au genre *Cinnamomum*, famille des Lauracées. Le genre comprend près de 250 espèces réparties de l'Asie à l'Australie (117). *C. camphora*, originaire d'Asie, est un arbre qui peut atteindre une dizaine de mètres de haut et qui possède une écorce pouvant se détacher en rouleaux (Figure 7). Il a été introduit à Madagascar et aux Mascareignes au milieu du XIX^{ème} siècle. On le retrouve sur les hauts plateaux du centre (Antananarivo, Antsirabe, Ankazobe), à l'Est (Anjiro, Moramanga) et dans le Sud (Ambositra, Ambohimaso). Il est appelé « Ravintsara » par les Malgaches, ce qui a été une source de confusion avec l'espèce *Ravintsara aromatica* (118). De plus, l'huile essentielle malgache de *C. camphora* fait l'objet d'une importante demande commerciale, entraînant à Madagascar une culture du camphrier à grande échelle (118).



Figure 7 : représentation schématique d'un rameau florifère de *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl.

En médecine traditionnelle, l'huile essentielle qui est extraite de cet arbre, obtenue à partir des feuilles et du bois par distillation à la vapeur, est utilisée par les Malgaches comme stimulant circulatoire ou comme anti-inflammatoire. Elle est aussi utilisée dans les états d'anxiété et de troubles nerveux et contre l'insomnie. En usage interne, elle permet de lutter contre les maladies infectieuses des voies digestives, contre la dysenterie, le typhus ou le choléra (119). Elle possède également des propriétés antibactériennes (120). En Inde, c'est un ingrédient qui entre dans la fabrication d'un remède local constitué de plusieurs autres plantes (121). *Cinnamomum camphora* présente également des propriétés insecticides (122, 123) et les feuilles ont des propriétés fébrifuges (117).

B. LES HUILES ESSENTIELLES DU GENRE *CINNAMOMUM*.

Les travaux sur l'huile essentielle du genre *Cinnamomum* sont abondants. En effet, de nombreuses espèces ont été caractérisées principalement dans la zone asiatique (124-140), en Australie (141) et à Madagascar (120, 142, 143). L'huile essentielle du genre *Cinnamomum* présente une grande variabilité chimique,

notamment par la présence importante de monoterpènes (α -pinène, 1,8-cinéole ou linalol), de sesquiterpènes ((E)-caryophyllène, guaiène ou β -eudesmol), de phényles propanoïdes (eugénol, méthyleugénol, cinnamaldéhyde ou safrole) ou d'autres composés (benzoate de 2-méthylène-but-3-èn-1-yle ou benzoate de benzyle). En ce qui concerne les *Cinnamomum* de Madagascar, les études sur la composition et/ou l'activité biologique des huiles essentielles ont porté sur les espèces suivantes : *C. camphora*, *C. zeylanicum*, *C. fragrans* et *C. angustifolium* (120, 142, 143).

Parmi les espèces de *Cinnamomum*, deux présentent un intérêt économique et sont donc plus ou moins exploitées de manière industrielle. La première, *Cinnamomum zeylanicum* (ou Cannelier de Ceylan), fournit une huile essentielle qui a fait l'objet de plusieurs études passées en revue par Lawrence (144-147). L'huile essentielle, qui peut être obtenue à partir des feuilles, des fruits ou de l'écorce, présente plusieurs types chimiques différents : trans-cinnamaldéhyde (124, 142, 143), linalol (148), δ -cadinène (149), eugénol (120, 150), acétate de trans-cinnamyle (151) et benzoate de benzyle (152). La seconde, *Cinnamomum camphora* est recherché par l'industrie. Les feuilles, les branches, l'écorce et le bois donnent par distillation une huile essentielle souvent riche en camphre (139, 153-159). D'autres compositions chimiques ont été décrites dans la littérature. Elles se caractérisent par la prédominance des composés suivants : 1,8-cinéole (120, 142, 143, 153, 154, 160-162), bornéol (153), linalol (139, 153, 155, 160, 163), nérolidol (huile essentielle de type « sesquiterpène ») (153, 160) et safrole (160).

Enfin, trois études ont été menées sur l'huile essentielle de *Cinnamomum camphora* de Madagascar :

- De Medici et coll. (120) ont mis en évidence la présence du 1,8-cinéole (56,7-64,7%), de l' α -terpinéol (6,6-8,6%) et de l' α -pinène (4,7-5,0%) comme composés majoritaires.
- Möllenbeck et coll. (142) ont déterminé une composition chimique voisine : 1,8-cinéole (62,4%), sabinène (11,9%), α -terpinéol (9,2%) et α -pinène (2,8%).

- Enfin, une étude récente (143) a confirmé la présence de 1,8-cinéole (56,7-63,7%), sabinène (11,4-14,0%), α -terpinéol (6,9-8,3%) et α -pinène (3,7-4,6%).

C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CINNAMOMUM CAMPHORA* DE MADAGASCAR.

Nous avons analysé un échantillon de l'huile essentielle commerciale de feuilles de *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. qui nous a été fournie par un producteur malgache. Cette huile essentielle, constituée de composés présentant peu d'originalité ou de difficultés d'identification, semble appropriée pour appliquer notre méthode d'analyse.

Ainsi, l'identification des constituants de l'huile essentielle de *C. camphora* s'est déroulée en deux étapes :

- ☑ la première étape a été la mise en œuvre de deux techniques analytiques complémentaires, la CPG/SM (Voie **A**) et la RMN du carbone-13 sans individualisation préalable des constituants (Voie **C**). Cette dernière, bien que moins sensible que d'autres techniques spectroscopiques, permet l'obtention d'informations concernant directement le squelette carboné des principaux constituants.
- ☑ La seconde étape (Voie **B**) a consisté à chromatographier sur colonne ouverte de silice (de type « flash ») l'huile essentielle (1,06 g) : cinq fractions ont été obtenues, deux au pentane contenant les composés hydrocarbonés (175 et 11 mg), et trois autres en utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante, contenant les composés oxygénés (Tableau I). Elles ont toutes été analysées par CPG/IK, CPG/SM et quatre d'entre-elles, sélectionnées en fonction de leur profil chromatographique l'ont été par RMN du carbone-13.

L'identification des constituants a été réalisée par l'utilisation des indices de rétention sur colonne polaire et apolaire, par l'analyse de chaque spectre de masse des composés constitutifs (utilisation de notre banque « Arômes » constituée au laboratoire). L'identification par RMN du carbone-13 s'est déroulée en tenant compte

des paramètres suivants : par l'observation de tous les signaux de chaque constituant du mélange, par le contrôle des variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) et du nombre de superpositions (restant relativement faible pour les deux derniers).

| Composés | IK | | HE | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | |
|---|----------|------|-------------------------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------|
| | Apolaire | | 1067 | 175 | 11 | 523 | 31 | 107 | |
| | Polaire | | Pentane/Ether | | 100/0 | 100/0 | 90/10 | 90/10 | 50/50 |
| | | | Solvant (ml) | | 100 | 150 | 150 | 250 | 350 |
| α -thujène | 923 | 1022 | 0,8 | 2,9 | - | - | - | - | |
| α -pinène | 931 | 1022 | 4,5 | 12,6 | - | - | - | - | |
| <i>α-fenchène</i> | 942 | 1055 | tr | 0,1 | - | - | - | - | |
| camphène | 944 | 1066 | 0,3 | 1,0 | - | - | - | - | |
| sabinène | 967 | 1122 | 13,5 | 46,3 | 0,8 | - | - | - | |
| β -pinène | 971 | 1109 | 3,3 | 13,5 | - | - | - | - | |
| myrcène | 981 | 1159 | 1,2 | 3,9 | 1,2 | - | - | - | |
| <i>α-phellandrène</i> | 998 | 1160 | tr | 0,4 | - | - | - | - | |
| α -terpinène | 1010 | 1179 | 0,7 | 3,1 | 0,6 | - | - | - | |
| p-cymène | 1014 | 1269 | 0,2 | 0,2 | 1,9 | - | - | - | |
| limonène* | 1022 | 1204 | 0,7 | 2,6 | 1,2 | - | - | - | |
| β -phellandrène* | 1022 | 1220 | 0,8[‡] | 4,4 | - | - | - | - | |
| 1,8-cinéole* | 1022 | 1220 | 60,5[#] | - | - | 99,3 | 40,0 | 0,1 | |
| (Z)- β -ocimène | 1025 | 1226 | tr | 0,2 | 0,4 | - | - | - | |
| (E)- β -ocimène | 1037 | 1247 | 0,3 | 0,4 | 3,4 | - | - | - | |
| γ -terpinène | 1049 | 1242 | 1,2 | 5,6 | 1,8 | - | - | - | |
| trans-hydrate de sabinène | 1053 | 1451 | 0,4 | - | - | - | 0,3 | 3,4 | |
| terpinolène | 1079 | 1279 | 0,3 | 0,9 | 2,7 | - | - | - | |
| cis-hydrate de sabinène | 1084 | 1534 | 0,2 | - | - | - | - | 5,0 | |
| <i>camphre</i> | 1121 | 1501 | tr | - | - | - | 0,5 | - | |
| terpinèn-4-ol | 1163 | 1600 | 2,0 | - | - | - | 51,8 | 5,3 | |
| α -terpinéol | 1175 | 1697 | 7,0 | - | - | - | - | 72,5 | |
| <i>nérol</i> | 1211 | 1778 | tr | - | - | - | - | 0,6 | |
| <i>néral</i> | 1215 | 1658 | tr | - | - | - | 0,4 | - | |
| <i>α-cubébène</i> | 1346 | 1450 | tr | 0,1 | - | - | - | - | |
| <i>méthyleugénol</i> | 1370 | 1987 | tr | - | - | - | 1,8 | 0,1 | |
| <i>β-élémente</i> | 1386 | 1577 | tr | - | 3,4 | - | - | - | |
| (E)-caryophyllène | 1416 | 1583 | 0,2 | 0,7 | 12,5 | - | - | - | |
| α -humulène | 1450 | 1654 | 0,3 | - | 25,2 | - | - | - | |
| <i>D-germacrène</i> | 1478 | 1694 | 0,1 | - | 10,5 | - | - | - | |
| <i>β-sélinène</i> | 1480 | 1700 | 0,1 | 0,5 | 4,6 | - | - | - | |

| | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>α-sélinène</i> | 1491 | 1707 | 0,1 | 0,4 | 3,1 | - | - | - |
| <i>bicyclogermacrène</i> | 1494 | 1719 | 0,1 | - | 12,5 | - | - | - |
| <i>calaménène</i> [†] | 1508 | 1811 | tr | - | 0,2 | - | - | - |
| <i>δ-cadinène</i> | 1513 | 1740 | tr | 0,1 | 1,1 | - | - | - |
| <i>oxyde de caryophyllène</i> | 1567 | 1962 | tr | - | - | - | 0,6 | - |
| Total | | | 98,8 | 99,9 | 87,1 | 99,3 | 95,4 | 87,0 |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ¹³C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement de l'huile essentielle sont en italique.* Les pourcentages des composés identifiés par RMN du carbone-13 après fractionnement sont en gras italique. F1 à F5 : cinq fractions obtenues par chromatographie sur colonne (silice ICN 200-500 μm, 60 Å). tr : Composés à l'état de trace (<0,1%). † : Pourcentage recalculé à partir de la fraction 1. # : Pourcentage obtenu après soustraction du β-phellandène. ‡ : Isomère non déterminé.

Tableau I : constituants identifiés dans l'huile essentielle de *Cinnamomum camphora*.

L'analyse de l'huile essentielle et des différentes fractions (Fractions 1 à 5) par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13, nous a permis d'identifier 36 composés représentant 98,8% de la composition chimique (Tableau I). Les constituants majoritaires du mélange sont le 1,8-cinéole (60,5%), le sabinène (13,5%), l'α-terpinéol (7,0%), l'α-pinène (4,5%), le β-pinène (3,3%) et le terpinèn-4-ol (2,0%).

Le fractionnement par chromatographie sur colonne nous a permis d'identifier 16 nouveaux composés par rapport aux 20 déjà identifiés dans l'huile essentielle brute. L'identification par RMN du carbone-13 de certains composés présents à plus de 2% dans les fractions 2 et 4 n'a pas été possible, dans la mesure où la quantité de produit était très faible (11 et 31 mg respectivement) sans un temps d'utilisation de l'appareil prohibitif. Cependant, l'analyse par RMN du carbone-13 de la fraction 2, nous a permis de confirmer un certain nombre de sesquiterpènes hydrocarbonés comme le (E)-caryophyllène, l'α-humulène, le D-germacrène et le bicyclogermacrène.

Nous remarquons également que la fraction monoterpénique représente plus de 97% environ de l'huile essentielle. Parmi ces monoterpènes, nous trouvons 16 composés hydrocarbonés et 8 composés oxygénés. La fraction sesquiterpénique représente moins de 1% du mélange. Enfin, la composition chimique de notre échantillon est très proche de celles décrites pour trois huiles essentielles de feuilles de *Cinnamomum camphora* de Madagascar (120, 142, 143). Nous sommes donc en présence d'une composition chimique de type cinéole avec une teneur en camphre vraiment très faible (trace) voir inexistante (120, 142, 143).

II. L'HUILE ESSENTIELLE DE *TAGETES BIPINATA*.

A. *TAGETES BIPINATA*.

Tagetes bipinata L. appartient à la famille des composées (ou Astéracées). C'est une plante annuelle ou vivace dont le genre *Tagetes* possède plus de 80 espèces réparties dans le monde entier, mais principalement originaire d'Amérique centrale et d'Amérique de Sud. Le genre s'est naturalisé dans le Sud de l'Europe, en Australie, en Nouvelle Guinée et en Afrique. A Madagascar *T. bipinata* est appelée « Mavoadaladia » ou « Tsipolibazaha » (164).

T. bipinata est une plante herbacée (dressée) dont les tiges sont simples ou plus ou moins fortement ramifiées (165). Ses feuilles sont opposées ou alternes, le plus souvent composées et pennées avec des folioles dentées et serrées. Elle possède des capitules solitaires ou groupés en corymbes denses, avec un involucre cylindrique ou campanulé. Elle est formée de bractées disposées en un seul verticille et soudées entre-elles presque jusqu'au sommet en un tube denté. Les fleurs (en périphérie) sont peu nombreuses, de sexe femelle possédant une corolle ligulée. Les fleurs centrales sont bisexuées, peu nombreuses à nombreuses avec une corolle tubulée à cinq lobes. Les anthères ont une base courtement sagittée ou obtuse, avec un sommet terminé par un appendice aigu possédant des stigmates pubescents. Les akènes (fruits) sont étroitement cylindriques (comprimés ou anguleux). Le pappus est constitué de une à

trois soies allongées et de sept à neuf écailles membraneuses ciliées beaucoup plus courtes. On la rencontre dans les savanes, les pelouses, les bords de piste ou les endroits plus ou moins rudéralisés.

L'huile essentielle et les extraits aux solvants, obtenus à partir des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines, du genre *Tagetes*, possèdent de nombreuses propriétés médicinales (166-169) : anti-blennorragique, sudorifique, diurétique, aphrodisiaque, vermifuge ou anxiogène, mais aussi des propriétés anti-microbiennes (170-174) ou insecticides (175-182). Par ailleurs, une synthèse bibliographique a été réalisée par Vasudevan et coll. (183) en 1997, rassemblant toutes les études qui ont été menées sur les composés bioactifs du genre *Tagetes* : sur les flavonoïdes, sur l'activité nématocide ou larvicide des thiophènes ou polythiophènes (surtout concentrés dans les racines), sur l'activité insecticide des pyréthrinines (pyréthroïdes) dans les extraits floraux ou sur la composition en terpénoïdes des huiles essentielles obtenues à partir des feuilles ou des fleurs. Rodríguez et coll. (184) ont aussi passé en revue les différents constituants rencontrés dans le genre *Tagetes*.

L'huile essentielle de *Tagetes* est également utilisée en parfumerie (185), en cosmétique et les différentes classes de pigments caroténoïdes et flavonoïdes sont utilisées en agroalimentaire (183). A Madagascar, c'est l'espèce *minuta* qui fait l'objet d'une culture dans les régions d'Ambanja et de Betafo, aboutissant à la production et à l'exportation de son huile essentielle (118).

B. LES HUILES ESSENTIELLES DU GENRE *TAGETES*.

Dans la littérature la majorité des études sur la composition chimique de l'huile essentielle du genre *Tagetes*, très abondante, porte sur l'espèce *minuta*. Lawrence a passé en revue la composition chimique des huiles essentielles du genre *Tagetes* : *T. minuta*, *T. signata*, *T. erecta*, *T. patula*, *T. glandulifera*, etc... (186-188).

De nombreuses publications ont été réalisées essentiellement en Inde et en Amérique du Sud par différents laboratoires de recherche. En effet, pour *T. minuta*, on constate que la composition chimique de l'huile essentielle est principalement caractérisée par sept constituants possédant tous le même squelette terpénique linéaire : le β -ocimène (Z et E), la dihydrotagétone, les tagétones (Z et E) et les ociménones (Z et E) (189-193). Cette composition chimique varie quantitativement en fonction de la partie de la plante distillée (feuilles, fleurs, etc...) ou de la zone géographique étudiée. Les autres espèces présentent un plus grand polymorphisme chimique, même si l'on retrouve souvent les squelettes menthane (limonène, pipéritone), caryophyllane ((E)-caryophyllène, oxyde de caryophyllène) ou linéaire (β -ocimène, linalol, acétate de linalyle) (194-198). Enfin, les huiles essentielles de *T. filifolia* et *T. lucida* sont riches en phényles propanoïdes, tels que l'estragole, l'anéthole ou le méthyleugénol (199-203).

A notre connaissance une seule étude relative à la composition chimique de l'huile essentielle de *Tagetes bipinata* L. a été décrite dans la littérature. Andriantsiferana et coll. (164) ont analysé plusieurs huiles essentielles malgaches de *T. bipinata* obtenue par l'hydrodistillation des parties aériennes de la plante. Différentes techniques chromatographiques et spectrales ont été utilisées : CCM, CLC, CPG/SM et CPG/IRTF. Les produits majoritaires identifiés sont le (Z)- β -ocimène (31,5-69,3%), la (E)-tagétène (ou ociménone) (5,5-22,1%), la myrcénone (3,8-20,8%), la (E)-tagétone (5,6-10,8%), la (Z)-tagétène (4,0-10,2%), le limonène (2,5-5,2%) et la (Z)-tagétone (0,7-2,7%). Les variations du rendement et de la composition chimique ont aussi été étudiées. En effet, pour différents sites de récolte, on constate de légères variations dans les deux cas. De même, un stockage prolongé entraîne une légère baisse du rendement et une variation de la composition chimique. Enfin, le mode d'extraction joue également un rôle important : le rendement par entraînement à la vapeur sous pression est nettement meilleur comparé à celui obtenu avec un alambic à feu nu, avec une composition chimique restant comparable.

C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *TAGETES BIPINATA* DE MADAGASCAR.

Un producteur malgache nous a fourni six échantillons d'huiles essentielles de *Tagetes bipinata* L. (A-F) obtenues par l'hydrodistillation à la vapeur d'eau des parties aériennes de la plante. Le matériel végétal a été récolté sur les hauts plateaux, dans les régions d'Antananarivo, d'Antsirabe et de Fianarantsoa.

L'analyse des six échantillons par CPG/IK et CPG/SM a permis d'identifier 18 composés (Tableau II). Le (Z)- β -ocimène (24,7-48,8%) est toujours le composé majoritaire. Nous pouvons noter une forte prédominance de la fraction monoterpénique (limonène, (Z)- β -ocimène, dihydrotagétone, etc...) par rapport à la fraction sesquiterpénique ((E)-caryophyllène, α -humulène, D-germacrène, etc...). Les composés oxygénés constituent également une importante partie de la composition chimique et en particulier avec la dihydrotagétone (11,9-24,4%), la (E)-tagétone (7,4-15,6%), la (E)-ociménone (3,3-14,2%), la (Z)-ociménone (2,2-11,3%) et la (Z)-tagétone (1,2-3,3%). L'huile essentielle A se distingue des autres par un pourcentage plus faible en (Z)- β -ocimène (24,7%) et par la teneur plus importante en (E)-ociménone (14,2%) et en (Z)-ociménone (11,3%).

Néanmoins, malgré une conservation à faible température (2-3°C), les tagétones (Z et E) et les ociménones (Z et E) contenues dans l'huile essentielle, ont tendance à se polymériser, augmentant aussi la viscosité de l'échantillon. Ce phénomène a déjà été signalé (195, 204, 205). Cette polymérisation est probablement due au grand nombre d'insaturations de ces cétones acycliques.

Bien que la dihydrotagétone, la (Z)-tagétone et les ociménones (Z et E), isolées de l'huile essentielle de *T. minuta* aient toutes été décrites en RMN du carbone-13 (206) leur identification par cette technique dans l'huile essentielle brute s'est révélée délicate. En effet, la répétition du même motif structural rend difficile l'attribution des valeurs des déplacements chimiques de chaque molécule en mélange. Nous avons

donc réalisé un fractionnement rapide de l'huile essentielle A et nous avons utilisé la fraction oxygénée pour confirmer la présence de la dihydrotagétone que nous avons dans notre bibliothèque de spectres, ainsi que les ociménones (tagéténones) et la (Z)-tagétone par rapport aux données de la littérature. Cette expérience nous a ainsi permis d'enrichir notre bibliothèque de spectres de RMN du carbone-13.

La composition des échantillons que nous avons étudiés est proche de celle qui est décrite dans la littérature (164). Nous constatons globalement les mêmes variations quantitatives pour chacun des constituants. Par ailleurs, nos échantillons présentent une teneur appréciable en dihydrotagétone qui n'a pas été identifiée dans cette huile essentielle (164).

III. L'HUILE ESSENTIELLE DE *LANTANA CAMARA*.

A. LANTANA CAMARA.

Le genre *Lantana* appartient à la famille des Verbénacées et comprend 150 espèces originaires d'Amérique du Sud (117). *Lantana camara* L. fut introduite vers 1650 en Europe. Elle est devenue pantropicale et s'est naturalisée dans de nombreux pays (elle est représentée sur tous les continents).

| Composés | IK | | A | B | C | D | E | F | Identification |
|---------------------------------|----------|---------|------|------|------|------|------|------|-------------------------------------|
| | Apolaire | Polaire | | | | | | | |
| sabinène | 966 | 1124 | 0,6 | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,7 | 0,5 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| α-phellandrène | 999 | 1168 | 0,3 | 0,2 | - | - | 0,3 | - | CPG/IK, CPG/SM |
| limonène* | 1023 | 1205 | 5,3 | 4,3 | 5,8 | 5,7 | 5,9 | 4,0 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| 1,8-cinéole* | 1023 | 1215 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | CPG/IK, CPG/SM |
| (Z)-β-ocimène | 1027 | 1236 | 24,7 | 32,8 | 43,6 | 44,6 | 47,0 | 48,8 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| (E)-β-ocimène* | 1038 | 1251 | 0,5 | 0,6 | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 0,8 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| dihydrotagétone* | 1038 | 1315 | 11,9 | 24,4 | 14,8 | 14,9 | 15,2 | 13,6 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| linalol | 1085 | 1549 | 0,2 | - | - | - | - | - | CPG/IK, CPG/SM |
| allo-ocimène [†] | 1119 | 1375 | 3,0 | 4,1 | 5,4 | 5,5 | 6,4 | 5,7 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| (Z)-tagétone | 1125 | 1500 | 3,3 | 1,2 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,6 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| (E)-tagétone | 1132 | 1519 | 12,4 | 15,6 | 7,4 | 7,6 | 8,7 | 7,5 | CPG/IK, CPG/SM |
| (Z)-ociménone [(Z)-tagétènone] | 1211 | 1701 | 11,3 | 4,4 | 2,9 | 3,0 | 2,2 | 4,9 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| (E)-ociménone* [(E)-tagétènone] | 1219 | 1720 | 14,2 | 5,2 | 3,5 | 3,7 | 3,3 | 6,4 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| δ-élémente | 1335 | 1479 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | CPG/IK, CPG/SM |
| (E)-caryophyllène | 1420 | 1595 | 0,6 | 0,9 | 1,0 | 1,0 | 0,9 | 0,8 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| α-humulène | 1452 | 1668 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | CPG/IK, CPG/SM |
| D-germacrène | 1478 | 1706 | - | 0,3 | - | - | - | 0,3 | CPG/IK, CPG/SM |
| bicyclogermacrène | 1493 | 1729 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 1,0 | CPG/IK, CPG/SM, RMN ¹³ C |
| Total | | | 89,9 | 96,4 | 89,2 | 90,9 | 94,7 | 96,9 | |

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). [†] : Isomère non déterminé.

Tableau II : constituants identifiés dans l'huile essentielle de *Tagetes bipinata*.

C'est un arbuste plus ou moins épineux de 1,5 à 3 mètres de haut (117). Les noms malgaches qui la désignent sont, selon les régions : Fotatra, Rajejeka, Radredreka, Radriaka ou Ramity. Elle porte aussi le nom de Corbeille d'or, de Thé de Gambie ou de Galabar. Les tiges et les rameaux secondaires sont quadrangulaires, hérissés de nombreuses épines et crochets, orientés vers le bas et disposés sur l'arête des tiges (Figure 8). Les feuilles simples sont opposées en croix et possèdent un limbe rugueux (ovale), terminé en pointe et denté régulièrement. Les nervures sont saillantes sur la face inférieure. La plante possède également des poils épidermiques sécréteurs. L'inflorescence axillaire est en capitule hémisphérique constituée de 30 à 50 petites fleurs jaune orangé, tournant au rose en vieillissant. Les fleurs sont typiques de la famille :

- à calice court et vert (3 mm) ;
- à corolle en tube terminé par quatre lobes inégaux de 6 à 8 mm ;
- à quatre étamines insérées sur le tube à deux niveaux différents ;
- à ovaire supère et possédant deux carpelles par ovule.

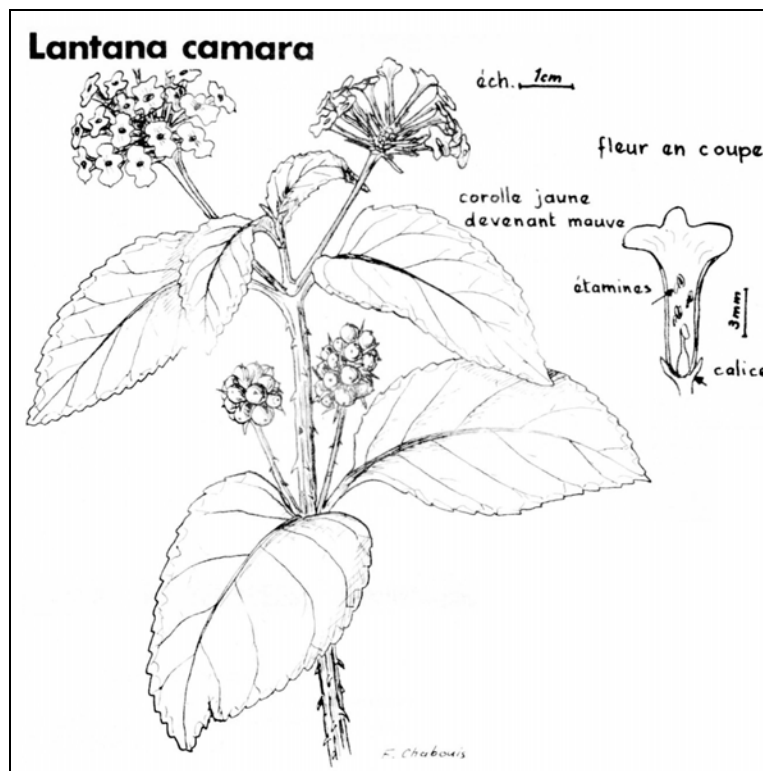


Figure 8 : caractéristiques botaniques de *Lantana camara* L.

Les fruits sont noirâtres et drupacés (fruit charnu à noyau). La floraison et la fructification se déroulent presque toute l'année. C'est une plante rudérale et ornementale très répandue en milieu humide, dans la végétation secondaire et les lisières de forêts, surtout sur les plateaux et la côte Est de Madagascar, les Mascareignes et les Comores.

Cette plante se révèle assez toxique car elle bloque certaines fonctions hépatiques et est à proscrire de toute thérapeutique (207). Certains extraits (éther de pétrole, éthanol, etc...) obtenus à partir des feuilles de *Lantana camara*, ont des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques (208).

B. LES EXTRAITS ET L'HUILE ESSENTIELLE DE *L. CAMARA*.

De nombreux composés possédant pour la plupart une activité biologique ont été isolés à partir d'extraits aux solvants de *Lantana camara*, caractérisés spectroscopiquement, et récemment passés en revue par Ghisalberti (209). Parmi ces constituants, il y a de nombreux triterpénoïdes pentacycliques, pour la plupart bioactifs (activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, hépatotoxique, etc...). Par ailleurs, Finch et coll. (210) ont extrait une lactone qui possède des propriétés inhibitrices sur une enzyme humaine, tandis que Mahato et coll. (211) ont déterminé le potentiel antitumoral de certains flavonoïdes et phényle propanoïdes glycosides isolés à partir de *Lantana camara* (Figure 9).

Divers travaux relatifs à la composition et à l'activité antifongique et antibactérienne de l'huile essentielle de *Lantana camara* ont été décrits. Ces travaux mettent en évidence une grande variabilité chimique de l'huile essentielle. Ainsi, diverses compositions ont été décrites pour des huiles essentielles de *Lantana camara* originaire du Brésil :

- une huile essentielle riche en monoterpènes (limonène 16,5%, α -phellandrène 16,4%) et contenant toutefois des quantités appréciables de sesquiterpènes (D-germacrène 13,2%, (E)-caryophyllène 10,8%) (212) ;

- une autre huile essentielle est dominée par le D-germacrène (28,4%), le B-germacrène (9,1%) et le (E)-caryophyllène (5,6%) (212) ;
- une troisième composition est caractérisée par la prédominance de molécules ayant le squelette du bisabolane sans qu'il y ait de différence notable entre les huiles essentielles de feuilles et celles de fleurs : γ et α -curcumène (27,6 et 31,9%), α -zingibérène (19,2 et 15,5%) et α -humulène (10,7 et 9,5%) (212).
- Enfin, une quatrième composition présente des aldéhydes sesquiterpéniques comme composés majoritaires (55) : le γ -curcumèn-15-al (14,9%) et l'ar-curcumèn-15-al (5,6%) à côté des γ et ar-curcumène (8,0 et 9,7% respectivement).

L' α -curcumène est le composé majoritaire (24,7%) de l'huile essentielle du Cameroun (213), le (E)-caryophyllène et son époxyde étant présents avec des teneurs appréciables (13,3 et 7,1%). La composition chimique d'une huile essentielle iranienne de *L. camara* a également été étudiée en fonction du mode d'extraction (214). Le sabinène (16,5 et 7,3%) et le (E)-caryophyllène (14,0 et 22,5%) sont les constituants majoritaires respectifs des huiles essentielles hydrodistillées et distillées à la vapeur.

Le (E)-caryophyllène est le constituant majoritaire de deux échantillons en provenance d'Inde (27,1 et 34,8%), échantillons qui diffèrent par la nature des constituants secondaires (α -caryophyllène (13,5%) et ε -muurolène (9,6%) d'une part, acétate de géranyle (22,1%) et acétate d' α -terpinyle (5,8%) d'autre part) (215, 216). Deux autres huiles essentielles indiennes ont été étudiées, l'une obtenue à partir des feuilles et l'autre à partir des fleurs (217). On retrouve les mêmes composés majoritaires dans les deux échantillons : le D-germacrène (20,5 et 10,6%), le γ -élémente (10,3 et 6,8%), le (E)-caryophyllène (9,4 et 7,0%) et le β -élémente (7,3 et 14,5%).

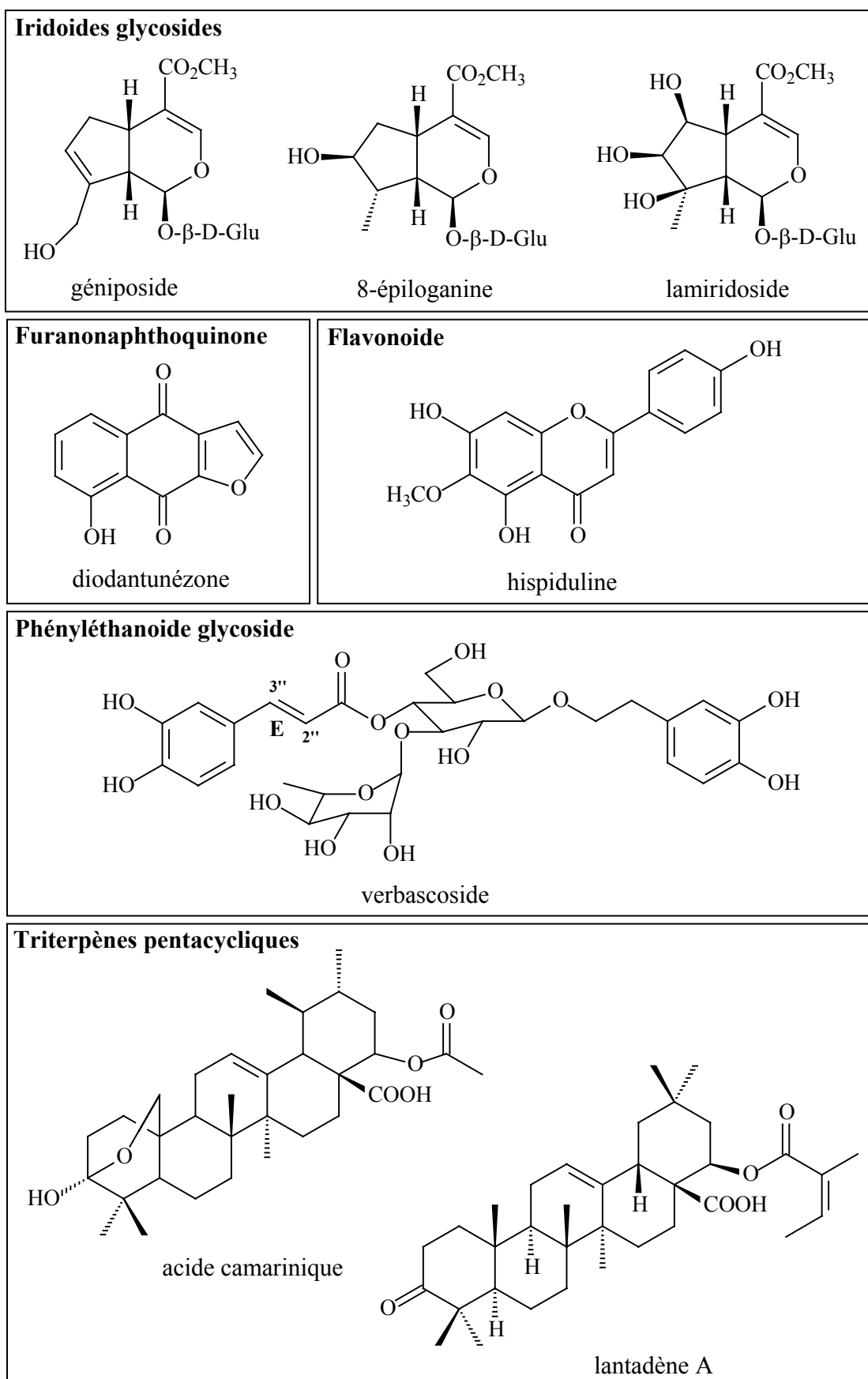


Figure 9 : quelques composés identifiés dans les extraits aux solvants de *L. camara*.

Parallèlement, le (E)-caryophyllène (18,8%) est le composé majoritaire d'un échantillon d'huile essentielle de Madagascar qui se distingue toutefois par la présence du δ -3-carène comme second composé en importance (142). Enfin, un deuxième échantillon de Madagascar présente une composition tout à fait différente avec la davanone présente à une teneur de 15,9% (213).

C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *LANTANA CAMARA* DE MADAGASCAR.

Deux huiles essentielles (A et B), obtenues à partir des parties aériennes de la plante, nous ont été fournies par un producteur malgache. L'échantillon A a été analysé directement par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13, 31 composés représentant 91,8% de l'huile essentielle ont été identifiés dont 20 par les trois techniques. Par contre, pour l'échantillon B, nous avons appliqué la même méthodologie que pour *Cinnamomum camphora*. Ainsi, l'huile essentielle a été fractionnée (chromatographie sur colonne « flash ») et les différentes fractions analysées par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13. Ce fractionnement nous a permis d'identifier 47 composés (dont 29 par les trois techniques) représentant 93,9% de la composition globale (Tableau III).

La différence de composition des deux échantillons apparaît nettement à l'examen des chromatogrammes et de leurs spectres de RMN du carbone-13 (Figure 10). L'analyse du spectre de RMN du carbone-13 de l'huile essentielle B, nous a permis de repérer 15 raies de résonance appartenant à un constituant que nous n'avons pas dans nos bibliothèques de spectres du laboratoire. Par contre, nous disposons des données de la littérature (Figure 11). Il s'agit de la cis-davanone également identifiée par SM et déjà décrite dans l'huile essentielle de *Lantana camara* de Madagascar par Ngassoum et coll. (213).

| | | | HE A | HE B | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 | F9 |
|--|---------------|---------|-------------|-------------------------|-------------|------------|-------|------|------------|-------|-------|------------|----|
| | Masse (mg) | | 1012 | 312 | 80 | 74 | 38 | 34 | 152 | 127 | 88 | 11 | |
| | Pentane/Ether | | | 100/0 | 100/0 | 100/0 | 100/0 | 95/5 | 90/10 | 90/10 | 50/50 | 0/100 | |
| | Solvant (ml) | | | 100 | 50 | 50 | 250 | 300 | 100 | 250 | 300 | 150 | |
| Composés | IK | | | | | | | | | | | | |
| | Apolaire | Polaire | | | | | | | | | | | |
| α -thujène | 922 | 1021 | 0,4 | 0,5 | 1,1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -pinène | 931 | 1021 | 4,4 | 6,2 | 8,2 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| camphène | 943 | 1064 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>octèn-3-ol</i> | 961 | 1437 | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | 1,1 | - |
| sabinène | 967 | 1121 | 10,7 | 12,5 | 29,0 | 2,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | - |
| β -pinène | 972 | 1109 | 3,6 | 4,6 | 10,8 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>octan-3-ol</i> | 979 | 1382 | - | tr | - | - | - | - | - | - | - | 0,5 | - |
| myrcène | 981 | 1157 | 0,9 | 0,8 | 1,6 | 0,7 | - | - | - | - | - | - | - |
| α -phellandrène | 998 | 1162 | 0,9 | 0,7 | 1,7 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -terpinène | 1010 | 1178 | 0,6 | 0,4 | 0,9 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - |
| p-cymène | 1013 | 1268 | 0,6 | 0,6 | - | 3,3 | 0,2 | - | - | - | - | - | - |
| limonène | 1022 | 1201 | 1,3* | 1,2* | 2,9* | 1,0 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-phellandrène</i> | 1022 | 1210 | - | 0,2* [‡] | 0,8* | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1,8-cinéole | 1022 | 1210 | 0,7* | 5,1*[#] | - | - | - | - | 6,4 | 0,1 | - | - | - |
| <i>(Z)-β-ocimène</i> | 1026 | 1229 | 0,8 | tr | 0,1 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>(E)-β-ocimène</i> | 1037 | 1246 | 1,7 | 0,9 | 1,3 | 3,0 | - | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------|------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|-----|-----|------------|-----|
| γ -terpinène | 1049 | 1241 | 1,2 | 1,1 | 3,1 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - |
| trans-hydrate de sabinène | 1054 | 1461 | - | 0,3 | - | - | - | - | - | - | 0,3 | 4,2 | - |
| terpinolène | 1079 | 1278 | 0,4 | 0,2 | 0,5 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>cis</i> -hydrate de sabinène | 1083 | 1535 | - | tr | - | - | - | - | - | - | - | - | 6,0 |
| linalol | 1085 | 1543 | 0,6 | 0,7 | - | - | - | - | - | - | 1,1 | 9,7 | - |
| camphre | 1122 | 1508 | - | 0,1 | - | - | - | - | - | 0,5 | 0,2 | - | - |
| <i>trans</i> -verbénol | 1129 | 1658 | - | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | 2,1 | 1,5 |
| terpinèn-4-ol | 1161 | 1585 | 1,3 | 0,8 | - | - | - | - | - | 0,3 | 6,0 | 1,9 | 1,9 |
| α -terpinéol | 1173 | 1677 | - | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | 4,4 | - |
| <i>α-cubébène</i> | 1347 | 1450 | - | tr | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -copaène | 1376 | 1482 | 0,1 | 1,2 | 3,3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β -bourbonène | 1384 | 1514 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β -élémente | 1388 | 1583 | 4,4 | 0,9 | - | - | 0,6 | 3,7 | - | - | - | - | - |
| (E)-caryophyllène | 1421 | 1587 | 30,5 | 10,9* | 22,5 | 27,5 | 0,9 | - | - | - | - | - | - |
| β -copaène | 1429 | 1586 | 5,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -humulène | 1452 | 1658 | 2,6 | 3,6 | - | 5,4 | 26,8 | 19,7 | - | - | - | - | - |
| alloaromadendrène | 1459 | 1631 | 0,4 | 0,4 | 1,0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| γ -muurolène | 1472 | 1674 | 0,8 | 0,5 | 1,0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-germacrène | 1478 | 1699 | 11,0* | 5,3* | 2,6 | 41,6 | 8,6 | 0,6 | - | - | - | - | - |
| β -sélinène | 1484 | 1707 | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>cubébol</i> | 1487 | 1870 | - | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | 4,8 | - |
| α -muurolène | 1494 | 1714 | 1,6* | 0,2* | 0,7 | - | - | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--|------|------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|-----|
| bicyclogermacrène | 1494 | 1723 | 2,4* | 6,2* | - | 8,7 | 52,7 | 53,6 | - | - | - | - | - |
| <i>(E,E)-α-farnésène</i> | 1500 | 1731 | - | tr | - | - | 0,2 | 0,4 | - | - | - | - | - |
| <i>4-épi-cubébol</i> | 1509 | 1924 | - | 1,1 | - | - | - | - | - | - | - | 13,0 | - |
| δ -cadinène | 1515 | 1742 | 0,6 | 0,8 | 1,6 | 1,5 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>cadina-1,4-diène</i> | 1523 | 1763 | - | tr | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (E)-nérolidol | 1542 | 2046 | - | 1,4 | - | - | - | - | - | - | - | 13,4 | - |
| <i>spathulénol</i> | 1560 | 2121 | - | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | 8,5 | - |
| cis-davanone | 1568 | 2037 | - | 22,6 | - | - | - | - | 55,5 | 91,6 | 82,6 | - | - |
| oxyde de caryophyllène | 1572 | 1976 | 0,9 | 0,4 | - | - | - | - | - | 3,2 | 0,3 | - | - |
| <i>épi-cubénol</i> | 1613 | 2052 | - | tr | - | - | - | - | - | 0,1 | 0,2 | - | - |
| <i>(E)-phytol</i> | 2098 | 2596 | - | tr | - | - | - | - | - | - | - | 0,6 | - |
| Total | | | 91,8 | 93,9 | 95,6 | 96,3 | 90,2 | 78,0 | 61,9 | 95,8 | 90,7 | 64,2 | 9,4 |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ^{13}C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement de l'huile essentielle B sont en italique.* Les pourcentages des composés identifiés par RMN du carbone-13 après fractionnement sont en gras italique. F1 à F9 : neuf fractions obtenues par chromatographie sur colonne (silice ICN 200-500 μm , 60 A). tr : Composés à l'état de trace (<0,1%). ‡ : Pourcentage recalculé à partir de la fraction 1. # : Pourcentage obtenu après soustraction du β -phellandrène.

Tableau III : constituants identifiés dans l'huile essentielle de *Lantana camara*.

Une étude plus détaillée de l'échantillon B a été réalisée après fractionnement (Tableau III). Ainsi, la présence de plusieurs oléfines sesquiterpéniques a été confirmée dans les fractions 1 à 4. En particulier, le cadina-1,4-diène (trace) a été identifié dans la fraction 1 par comparaison de son spectre de masse expérimental et de son indice de rétention apolaire avec ceux décrits dans la littérature (20). Ce sesquiterpène bicyclique avait déjà été caractérisé dans l'huile essentielle de *L. camara* de Madagascar (213). L'étude par RMN du carbone-13 de la fraction 6, qui contient plus de 90% de davanone, nous a permis d'attribuer avec précision les valeurs des déplacements chimiques de cette molécule (**1**), valeurs qui sont décrites dans la littérature (218) (Figure 11). Une séquence spin-écho a également été réalisée pour déterminer la multiplicité des différents atomes de carbone de ce composé.

De même, le cubébol **2** et le 4-épi-cubébol **3** ont été identifiés dans la fraction 8, dans laquelle ils sont présents avec des teneurs respectives de 5 et 13%, par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 par comparaison avec les données de la littérature (Figure 12) (219). Ces deux molécules qui possèdent des spectres de masse quasiment superposables mais des indices de rétention différenciés avaient déjà été caractérisées dans l'huile essentielle de *Lantana camara* de Madagascar (213). Cependant, nous proposons, pour ces deux isomères, un ordre d'élution et des valeurs des indices de rétention différents de ceux décrits dans la littérature (213, 219). En effet, les intensités des signaux des carbones de chacun des deux constituants dans la fraction 8, observés en RMN du carbone-13, nous démontrent sans aucune ambiguïté que le 4-épi-cubébol est l'isomère le plus abondant (13,0% contre 4,8%).

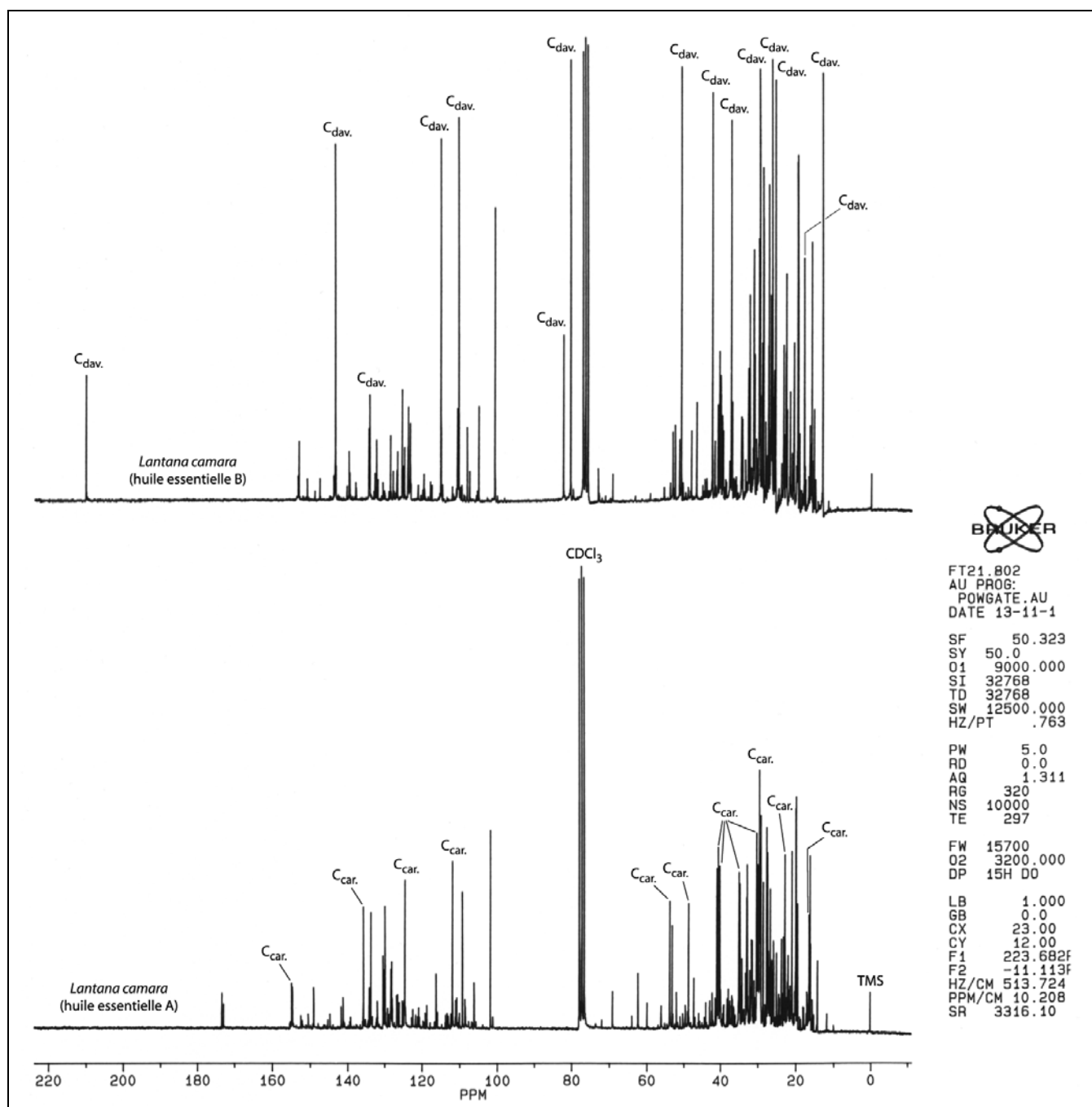
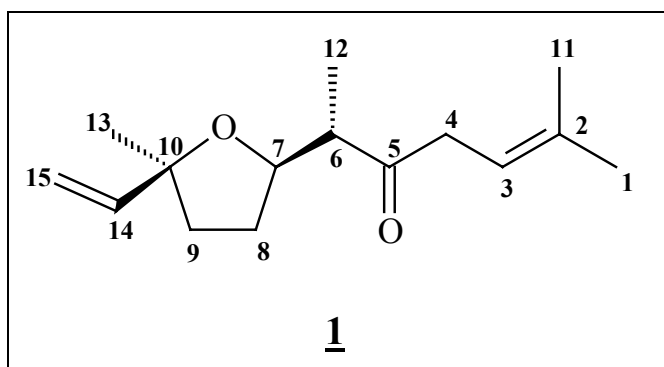
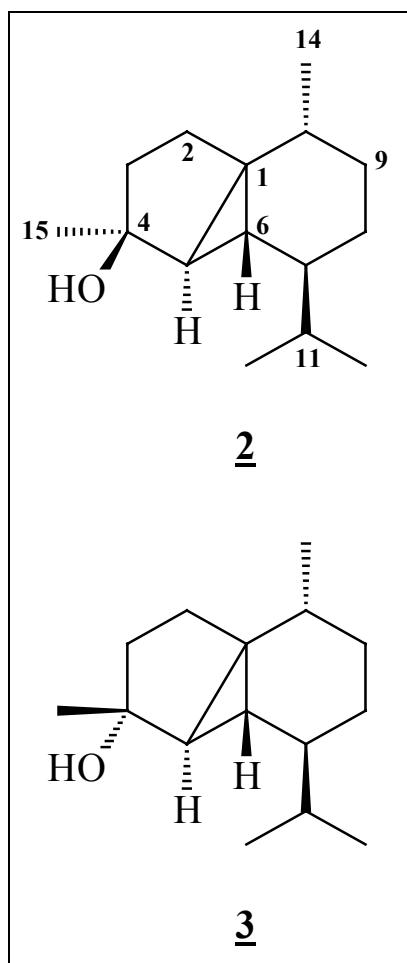


Figure 10 : spectres de RMN du carbone-13 des huiles essentielles A et B de *Lantana camara* L. ((E)-caryophyllène : C_{car.} ; davanone : C_{dav.}).



| C | δ (218) | δ <u>1</u> | |
|----|----------------|--------------------------|---|
| 1 | 25,6 | 25,73 | q |
| 2 | 134,9 | 135,26 | s |
| 3 | 116,0 | 116,12 | d |
| 4 | 42,4 | 42,69 | t |
| 5 | 208,6 | 211,95 | s |
| 6 | - | 51,27 | d |
| 7 | 80,8 | 81,06 | d |
| 8 | 29,7 | 29,92 | t |
| 9 | 37,3 | 37,54 | t |
| 10 | 82,8 | 82,96 | s |
| 11 | 17,8 | 18,08 | q |
| 12 | 13,0 | 13,21 | q |
| 13 | 26,4 | 26,63 | q |
| 14 | 144,0 | 144,68 | d |
| 15 | 111,1 | 111,34 | t |

Figure 11 : structure et déplacements chimiques (ppm) de la cis-davanone **1** mesurés dans la fraction 6 (δ **1**) et décrits dans la littérature (218).



| C | δ (219) | $\delta \underline{2}$ | δ (219) | $\delta \underline{3}$ |
|----|----------------|------------------------|----------------|------------------------|
| 1 | 33,2 | 33,23 | 34,7 | 34,68 |
| 2 | 29,4 | 29,41 | 29,6 | 29,61 |
| 3 | 36,0 | 36,11 | 36,4 | 36,33 |
| 4 | 79,9 | 79,94 | 80,6 | 80,54 |
| 5 | 38,9 | 38,91 | 39,7 | 39,74 |
| 6 | 22,5 | 22,66 | 25,0 | 25,09 |
| 7 | 44,0 | 44,01 | 44,4 | 44,19 |
| 8 | 26,2 | 26,25 | 26,9 | 26,94 |
| 9 | 31,5 | 31,44 | 31,7 | 31,74 |
| 10 | 30,7 | 30,77 | 30,1 | 30,02 |
| 11 | 33,4 | 33,45 ^Ω | 33,5 | 33,45 ^Ω |
| 12 | 19,9* | 19,90* ^Ω | 19,9* | 19,90* ^Ω |
| 13 | 19,4* | 19,38* | 19,6* | 19,67* |
| 14 | 18,6 | 18,54 | 19,0 | 18,80 |
| 15 | 27,9 | 27,85 | 24,9 | 24,80 |

Les valeurs * peuvent être interverties. ^Ω : Carbones superposés.

Figure 12 : structures et déplacements chimiques (ppm) du cubébol 2 et du 4-épi-cubébol 3 mesurés dans la fraction 8 ($\delta \underline{2}$ et $\delta \underline{3}$) et décrits dans la littérature (219).

A partir de cette constatation, nous pouvons confirmer les indices suivants : pour le cubébol, 1487 et 1870, pour le 4-épi-cubébol, 1509 et 1924. Il est par ailleurs aisé de vérifier que les attributions des valeurs des déplacements chimiques du cubébol et de l'épi-cubébol permettent bien d'attribuer la stéréochimie des deux isomères. En effet, le carbone C-6 du cubébol subit un effet γ -stérique de l'hydroxyle plus important que celui d'un méthyle d'où un effet blindant de 2,43 ppm par rapport au même carbone du 4-épi-cubébol. A l'inverse, le groupement méthyle (C-15) du 4-épi-cubébol subit un effet γ -stérique de la part du carbone C-6 ce qui se traduit par un effet blindant de 3,05 ppm par rapport au cubébol (Figure 13).

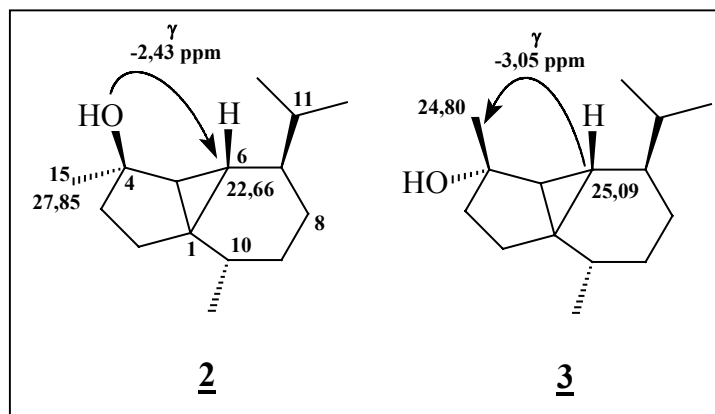


Figure 13 : les différents effets γ -stériques entre le cubébol 2 et le 4-épi-cubébol 3.

A titre de bilan, nous pouvons caractériser nos deux échantillons comme suit. Le (E)-caryophyllène (30,5%) est le constituant majoritaire de l'échantillon A, suivi du D-germacrène (11,0%), du sabinène (10,7%), du β -copaène (5,3%), du β -élémane (4,4%) et de l' α -pinène (4,4%). L'échantillon B, possède une composition riche en cis-davanone (22,6%) qui n'a pas été identifiée dans l'huile essentielle A. Mise à part cette cétone sesquiterpénique, nous retrouvons globalement les mêmes constituants majoritaires mais avec des teneurs légèrement différentes : le sabinène (12,5%), le (E)-caryophyllène (10,9%), l' α -pinène (6,2%), le D-germacrène (5,3%) et le 1,8-cinéole (5,1%). Par contre, le β -élémane (4,4%), le β -copaène (5,3%) sont présents avec des teneurs appréciables dans l'échantillon A, tandis que le 1,8-cinéole et le bicyclogermacrène (6,2%) sont plus importants dans l'échantillon B. L'analyse de ces deux échantillons nous permet de confirmer l'originalité de certains échantillons d'huile essentielle de *Lantana camara* de Madagascar.

Ainsi, notre échantillon B est dominé par la davanone, cétone sesquiterpénique, qui n'est pas présente dans les huiles essentielles originaires du Cameroun, du Brésil et d'Inde (55, 212-217). La composition de l'échantillon B est assez proche de celle décrite dans la littérature (213) avec la présence en quantités appréciables de davanone, de (E)-caryophyllène et de sabinène. Cependant, quelques différences sont observées au niveau des composés minoritaires sesquiterpéniques (alloaromadendrène, (E,E)- α -farnésène).

Par contre, l'échantillon A, est riche en (E)-caryophyllène et en ce sens, il s'apparente plutôt à celui qui est décrit par Möllenbeck et coll. (142). Cependant, les auteurs n'ayant identifié que 55% de la composition globale de l'huile essentielle, il ne nous est pas possible de savoir si leur échantillon contient ou pas de la davanone. Nous pouvons donc affirmer la présence à Madagascar, d'huile essentielle de *Lantana camara* riche en hydrocarbures sesquiterpéniques et ne contenant pas de davanone. La composition de l'échantillon A se rapproche plutôt de celle des échantillons d'origine indienne, bien que des différences soient observées au niveau des autres composés majoritaires. Ainsi, le D-germacrène et le sabinène, qui sont des composés minoritaires dans les huiles essentielles indiennes, représentent chacun plus de 10% de la composition de notre échantillon. Ces analyses confirment donc une variabilité importante de l'huile essentielle de *Lantana camara*.

IV. L'HUILE ESSENTIELLE D'*EUCALYPTUS CITRIODORA*.

A. EUCALYPTUS CITRIODORA.

Le genre *Eucalyptus* appartient à la famille des Myrtacées. Il est originaire d'Australie et de Tasmanie et est très riche en espèces (environ 900 à 1000) (117). C'est donc une plante très diversifiée puisqu'elle comprend, à elle seule, autant d'espèces qu'une des plus riches familles de Madagascar, les Orchidées (1000 espèces environ). On peut facilement imaginer les difficultés de détermination de ces espèces.

L'*Eucalyptus*, répandu dans le monde entier, est également devenu un des éléments les plus caractéristiques du paysage malgache, surtout sur les hauts plateaux. Il a été introduit à Madagascar dans les années 1890-1895 et les premiers reboisements conséquents datent du début du vingtième siècle dans la région de Tananarive. Plus tard, d'autres plantations importantes ont été réalisées autour de Périnet et de Moramanga (116). De nos jours, plus de 100 espèces environ existent encore, mais pour la plupart uniquement dans les stations forestières.

Parmi les espèces cultivées à Madagascar, on trouve *Eucalyptus citriodora* Hooker, du nom vernaculaire Kininina (Figure 14). Cet arbre possède un tronc plutôt élancé, ramifié, de couleur blanc-grisâtre et duquel se détachent des lambeaux d'écorce (117). Les feuilles sont alternes, pendantes, à limbe en forme de faux, de couleur gris verte et possédant une forte odeur caractéristique. Les nervures sont pennées très régulièrement. Les fleurs sont en grappes ou en ombelles, possédant chacune, un calice accrescent en tube légèrement évasé, de nombreuses étamines blanches, très décoratives (houppes) et un ovaire infère à style court. Les fruits se présentent sous forme de capsule. La floraison s'étale de mai à septembre. On le retrouve sur l'ensemble des Mascareignes.

E. citriodora contient des essences aromatiques qui possèdent des propriétés pharmaceutiques. En effet, ces essences sont décrites vermifuges, antifongiques et ont une activité anti-inflammatoire et des propriétés antibactériennes (220, 221). Pour combattre les affections respiratoires, on utilise les feuilles d'*Eucalyptus*. Elles sont séchées puis une solution de nitrate de potassium (2%) est pulvérisée à leur surface. Après séchage, les feuilles sont découpées en lanières et utilisées alors sous forme de cigarettes (117).

B. LES HUILES ESSENTIELLES DU GENRE *EUCALYPTUS*.

Comme nous l'avons déjà signalé, le genre *Eucalyptus* regroupe plusieurs centaines d'espèces. C'est donc fort logiquement que de très nombreuses études ont été menées sur la composition chimique de l'huile essentielle dans différentes régions du monde.

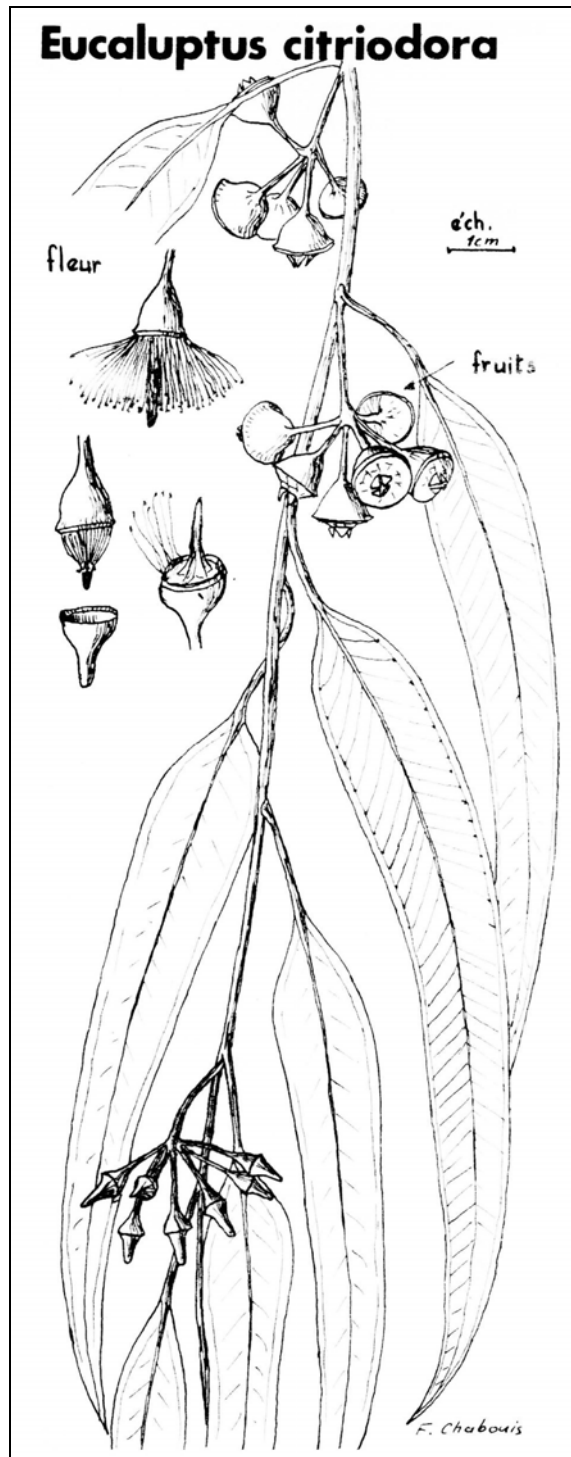


Figure 14 : caractéristiques botaniques d'*Eucalyptus citriodora* Hooker.

Le 1,8-cinéole reste un des principaux constituant majoritaire des huiles essentielles d'*Eucalyptus*. Lawrence a passé en revue la composition des huiles essentielles d'*Eucalyptus* riche en 1,8-cinéole (222) et en particulier *E. globulus*. Cependant, on rencontre d'autres espèces riches en 1,8-cinéole comme *E.*

gomphocephala (223), *E. camaldulensis* (224-227), *E. tereticornis* (224), *E. punctata* (228), *E. deanei* (229) ou *E. pumila* (230).

D'autres composés majoritaires caractérisent les huiles essentielles d'*Eucalyptus*, notamment en ce qui concerne les très nombreuses espèces australiennes. Ces molécules sont présentes dans plusieurs centaines d'espèces ou de sous espèces à travers le monde (231-234) (Figure 15) : le benzaldéhyde, le (E)-méthylcinnamate, l' α -pinène, la pipéritone, le guaiol, le globulol, l'isobicyclodermacral, le méthyleudesmate, la jacksonone, la tasmanone, etc...

Par contre, dans l'huile essentielle d'*E. citriodora*, le composé majoritaire est le citronellal que l'on ne trouve d'ailleurs dans l'huile essentielle d'aucune autre espèce d'*Eucalyptus*. *E. citriodora* conserve globalement la même composition chimique dominée par le citronellal qu'elle que soit sa localisation géographique :

- Kenya, 29,7-88,1% ; citronellol, 2,3-51,8% ; isopulégol, 1,5-19,5% ; 1,8-cinéole, 1,3-18,7% (feuilles) (235).
- Angola, 65-80% (feuilles) (236).
- Mali, 77,6-78,5% ; isopulégol, 6,3-6,4% ; méthyleugénol, 2,2-2,3% (224).
- Ethiopie, 73,3% ; citronellol, 11,9% ; isopulégol, 8,9% (feuilles) (229).
- Ghana, feuilles : 60,4% ; fleurs : 11,9% (237).

- Cuba, 75-85% (238, 239).
- Brésil, 76,1% (240).
- Colombie, 60-70% (feuilles) (241).
- Argentine, 54,4% (feuilles) (242).

- Chine, 66,7% (240).
- Inde, 65,5-90,1% ; citronellol, 4,6-12,2% ; isopulégol, 0,7-3,6% (feuilles) (243).
- Inde, 72,8% ; citronellol, 14,5% ; acétate de citronellyle, 3,1% (feuilles) (244).
- Inde, 65,2% ; citronellol, 20-23% (245).

- Bangladesh, 65-80% ; citronellol, 15-20% (246).
- Bangladesh, 77,0% ; néoisopulégol, 7,3% ; citronellol, 5,9% (feuilles) (247).
- Pakistan, 79,0% ; citronellol, 12,0% ; isopulégol, 2,7% (feuilles) (248).
- Australie, 80-85% (249).
- Australie, 65-85% (feuilles) (231).
- Australie, 66,0% ; citronellol, 12,1% ; (E)-caryophyllène, 4,0% ; γ -cadinène, 3,9% (feuilles) (250).

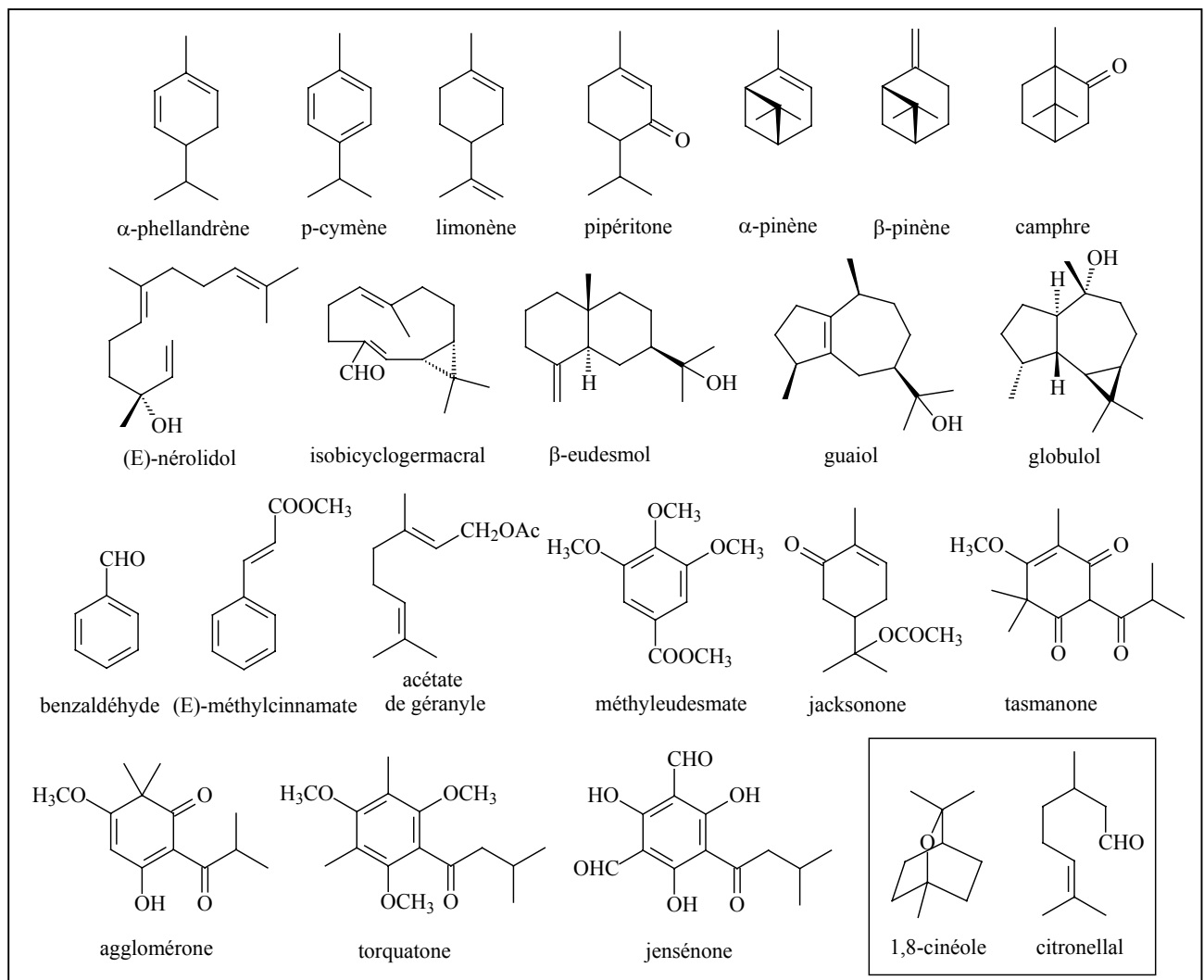


Figure 15 : quelques principaux constituants identifiés dans les huiles essentielles du genre *Eucalyptus*.

Cependant, Garnero (251) signale que Penfold et ses collaborateurs ont décrit des huiles essentielles d'origine australienne d'*Eucalyptus citriodora* riches en citronellal (65 à 85%) et d'autres riches en citronellol et en ses esters. D'ailleurs, dans la littérature, on retrouve la prédominance du citronellol dans certains échantillons d'Australie (65-85%) (231) et du Kenya (2,3-51,8%) (235).

Enfin, en ce qui concerne *E. citriodora* de Madagascar, De Medici et coll. (120) ont analysé deux échantillons et ils ont mis en évidence le citronellal comme composé majoritaire (62,5 et 71,2%). Suivent ensuite l'acétate de citronellyle (12,7 et 6,6%) et l'acétate de linalyle (5,6 et 3,4%).

C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE D'*EUCALYPTUS CITRIODORA* HOOKER DE MADAGASCAR.

Nous avons étudié la composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle commerciale d'*Eucalyptus citriodora* de Madagascar qui nous a été fourni par un producteur. Nous avons de nouveau mis en œuvre la méthodologie décrite dans le premier chapitre : utilisation d'une technique de séparation, la chromatographie sur colonne et de plusieurs techniques analytiques : la CPG/IK, la CPG/SM et la RMN du carbone-13.

L'échantillon d'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* de Madagascar que nous avons analysé est caractérisé par la présence importante de molécules à structure linéaire, tel que le citronellal (46,9%), le citronellol (6,7%) et l'acétate de citronellyle (4,3%) (Tableau IV). A côté de ces composés, on trouve cinq autres molécules possédant le squelette cyclique du menthane : l'isopulégol (16,9%), le néoisopulégol (9,0%), l'isopulégol (1,0%), le 8-hydroxynéomenthol (0,8%) et le 8-hydroxymenthol (0,4%) (Figure 16). On peut remarquer également que la fraction oxygénée représente environ 90% de la composition chimique globale.

| | HE | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 | | |
|----------------------------|----------|---------|-------------|-------------|-------------|------------|-------|-------|-------|---|---|
| Masse (mg) | 1050 | 19 | 548 | 106 | 136 | 55 | 82 | 28 | 22 | | |
| Pentane/Ether | | 100/0 | 90/10 | 90/10 | 90/10 | 90/10 | 50/50 | 50/50 | 0/100 | | |
| Solvant (ml) | | 300 | 100 | 100 | 150 | 250 | 100 | 250 | 100 | | |
| Composés | IK | | | | | | | | | | |
| | Apolaire | Polaire | | | | | | | | | |
| <i>α-thujène</i> | 922 | 1021 | tr | 0,7 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-pinène</i> | 930 | 1021 | 0,6 | 7,3 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>camphène</i> | 943 | 1065 | tr | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>sabinène</i> | 965 | 1119 | tr | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-pinène</i> | 971 | 1109 | 1,2 | 15,9 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>myrcène</i> | 980 | 1154 | tr | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-phellandrène</i> | 998 | 1159 | tr | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-terpinène</i> | 1009 | 1175 | tr | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>p-cymène</i> | 1013 | 1269 | 0,4 | 8,8 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>limonène*</i> | 1021 | 1198 | 0,1 | 4,9 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>1,8-cinéole*</i> | 1021 | 1209 | 0,4 | - | 0,6 | 0,2 | - | - | - | - | - |
| <i>(Z)-β-ocimène</i> | 1024 | 1226 | tr | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>(E)-β-ocimène</i> | 1035 | 1242 | tr | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>γ-terpinène</i> | 1048 | 1240 | tr | 3,8 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>p-mentha-3,8-diène</i> | 1059 | 1260 | tr | 3,0 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>terpinolène</i> | 1079 | 1278 | tr | 4,0 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>linalol</i> | 1084 | 1541 | tr | - | - | - | 0,3 | 0,1 | - | - | - |
| <i>cis-oxyde de rose</i> | 1096 | 1348 | 0,3 | - | 0,5 | 0,5 | - | - | - | - | - |
| <i>trans-oxyde de rose</i> | 1113 | 1363 | tr | - | 0,1 | 0,2 | - | - | - | - | - |
| <i>isomenthone*</i> | 1133 | 1465 | 0,4 | - | 0,7 | 0,1 | - | - | - | - | - |
| <i>citronellal*</i> | 1133 | 1481 | 46,9 | - | 73,9 | 8,2 | 0,9 | 0,6 | 0,4 | - | - |

| | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|------|------|-------------|-------------|------------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| isopulégol* | 1133 | 1570 | 16,9 | - | - | 11,7 | 89,3 | 48,1 | - | - | - |
| <i>p-menth-3-èn-8-ol*</i> | 1133 | 1597 | 0,1 | - | - | - | - | 1,6 | 0,2 | - | - |
| néoisopulégol | 1145 | 1559 | 9,0 | - | - | 61,8 | 2,7 | - | - | - | - |
| isoisopulégol | 1154 | 1621 | 1,0 | - | - | 0,3 | 2,7 | 8,3 | 0,2 | - | - |
| <i>terpinèn-4-ol</i> | 1163 | 1590 | 0,1 | - | - | 0,1 | 0,5 | 0,1 | - | - | - |
| citronellol | 1211 | 1762 | 6,7 | - | - | - | 0,2 | 6,9 | 67,3 | 3,1 | - |
| formate de citronellyle | 1256 | 1608 | 0,2 | - | 0,4 | - | - | - | - | - | - |
| <i>δ-hydroxynéomenthol</i> | 1310 | 2083 | 0,8 | - | - | - | - | - | - | 47,9 | 0,6 |
| <i>δ-hydroxymenthol</i> | 1328 | 2161 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | 8,0 | 59,2 |
| acétate de citronellyle | 1335 | 1656 | 4,3 | - | 8,3 | 0,9 | - | - | - | - | - |
| <i>α-ylangène</i> | 1374 | 1478 | tr | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>isocaryophyllène</i> | 1408 | 1562 | tr | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - |
| (E)-caryophyllène | 1422 | 1592 | 1,2 | 35,6 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>alloaromadendrène</i> | 1458 | 1634 | tr | 0,8 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>γ-muuroolène</i> | 1472 | 1670 | tr | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>δ-cadinène</i> | 1514 | 1743 | tr | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - |
| oxyde de caryophyllène | 1572 | 1976 | 0,3 | - | 0,1 | 1,9 | - | - | - | - | - |
| Total | | | 91,3 | 87,1 | 84,6 | 85,9 | 96,6 | 65,7 | 68,1 | 59,0 | 59,8 |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ¹³C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement de l'huile essentielle sont en italique.* Les pourcentages des composés identifiés par RMN du carbone-13 après fractionnement sont en gras italique. F1 à F8 : huit fractions obtenues par chromatographie sur colonne (silice ICN 200-500 µm, 60 A). tr : Composés à l'état de trace (<0,1%).

Tableau IV : constituants identifiés dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora*.

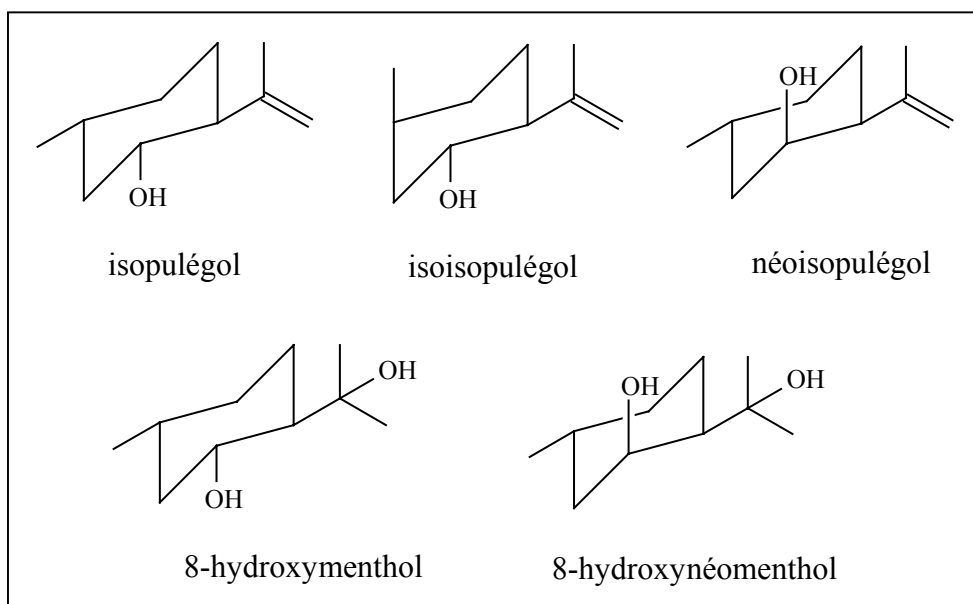


Figure 16 : molécules identifiées dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* et possédant le squelette du menthane.

Le fractionnement de l'huile essentielle nous a permis d'identifier 23 nouveaux composés, tels que le p-mentha-3,8-diène, le trans-oxyde de rose ou le p-menth-3-èn-8-ol. L'analyse de l'huile essentielle brute et des différentes fractions (F1 à F3 et F5 à F8) par RMN du carbone-13, nous a permis d'identifier 18 composés sur 38 jusqu'à une teneur de 0,6%. Pour chacun d'entre eux, tous les carbones ont été repérés et attribués à partir du spectre unique du mélange. Chacun des produits a donc été identifié par l'observation de tous les carbones qui lui appartiennent en propre et ce malgré l'existence importante de similitudes structurales. De même, les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) des carbones par rapport aux valeurs des produits de références et le nombre de superpositions reste assez faible.

L'étude des fractions oxygénées 7 et 8 par SM et RMN du carbone-13, nous a permis d'identifier le 8-hydroxynéomenthol **4** et le 8-hydroxymenthol **5** (Figure 17). Ces deux composés présentent des spectres de masse quasiment identiques et la bibliothèque commerciale « Wiley » nous a proposé à chaque fois l'hydrate de 3,8-terpinéol. Les données spectrales de ces deux isomères sont décrites dans la littérature (252). Les spectres de RMN du carbone-13 des deux stéréoisomères sont présentés dans la figure 18. Une séquence spin-écho a également été réalisée pour déterminer la

multiplicité des différents atomes de carbone de ces deux molécules. De plus, le 8-hydroxynéomenthol a déjà été isolé dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* (253).

| C | δ (252) | δ <u>4</u> | δ (252) | δ <u>5</u> | |
|----|----------------|-------------------|----------------|-------------------|---|
| 1 | 25,6 | 25,60 | 31,4 | 31,35 | d |
| 2 | 42,6 | 42,49 | 44,6 | 44,57 | t |
| 3 | 68,1 | 68,08 | 72,8 | 72,95 | d |
| 4 | 48,5 | 48,27 | 53,2 | 53,40 | d |
| 5 | 20,2 | 20,25 | 27,0 | 27,09 | t |
| 6 | 35,0 | 34,85 | 34,5 | 34,53 | t |
| 7 | 22,2 | 22,21 | 22,0 | 21,97 | q |
| 8 | 73,3 | 73,31 | 74,9 | 75,18 | s |
| 9 | 28,9 | 28,82* | 29,8* | 30,09* | q |
| 10 | 28,9 | 28,89* | 23,7* | 23,68* | q |

Les valeurs * peuvent être interverties.

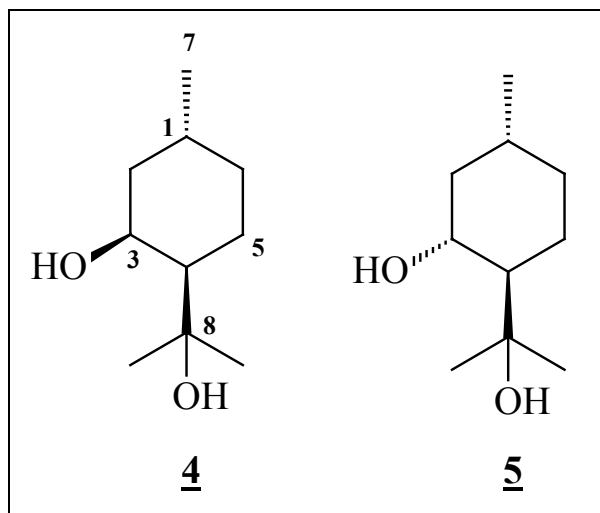


Figure 17 : structures et déplacements chimiques (ppm) du 8-hydroxynéomenthol 4 et du 8-hydroxymenthol 5 mesurés dans les fractions 7 et 8 (δ 4 et δ 5) et décrites dans la littérature (252).

Si l'on compare maintenant, la composition chimique de notre échantillon à celles décrites par De Medici et coll. (120) pour deux huiles essentielles d'*Eucalyptus citriodora* originaires de Madagascar, on constate que le citronellal reste toujours le constituant principal de l'huile essentielle mais dans une plus faible proportion (46,9% contre 62,5 et 71,2%). Cependant, il existe une différence importante en ce qui concerne certains composés. En effet, le citronellol (6,7%) et l'ensemble des dérivés du menthol (28,1%), qui ont été identifiés dans notre échantillon, ne sont pas décrits dans les échantillons précédents (120). On serait donc en présence de deux compositions chimiques relativement différentes.

Par contre, on retrouve la plupart de ces composés dans des huiles essentielles d'*E. citriodora* de diverses origines :

- l'isopulégol (16,9%) a déjà été décrit dans des huiles essentielles du Kenya (1,5-19,5%) (235), d'Ethiopie (8,9%) (229), du Mali (6,3-6,4%) (224), d'Inde (0,7-3,6%) (243) et du Pakistan (2,7%) (248).
- Le néoisopulégol (9,0%) est présent dans des huiles essentielles du Bangladesh (7,3%) (247).
- Le citronellol (6,7%) se trouve dans des huiles essentielles d'Australie [65-85%, (231) ; 12,1%, (250)], du Kenya (2,3-51,8%) (235), d'Ethiopie (11,9%) (229), d'Inde (5-23%) (243-245), du Bangladesh (6-20%) (246, 247) et du Pakistan (12,0%) (248).
- L'acétate de citronellyle (4,3%) est présent dans une huile essentielle indienne (3,1%) (244).

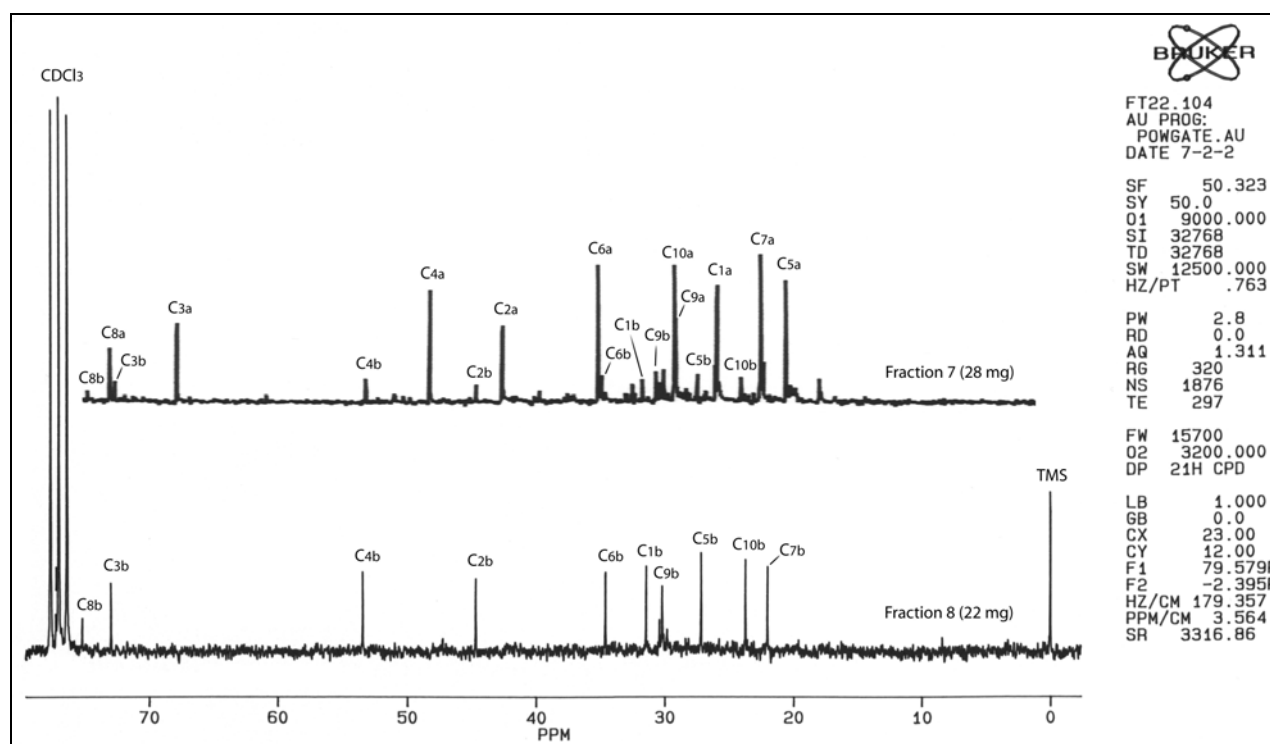


Figure 18 : spectres de RMN du carbone-13 du 8-hydroxynéomenthol (Fraction 7, 28 mg ; C_{1-10a}) et du 8-hydroxymenthol (Fraction 8, 22 mg ; C_{1-10b}).

V. L'HUILE ESSENTIELLE DE *CUPRESSUS LUSITANICUS*.

A. *CUPRESSUS LUSITANICUS*.

Cupressus lusitanicus Miller (Cyprès) appartient à la famille des Cupressacées. Il a été introduit à Madagascar avec une dizaine d'autres espèces du même genre. C'est un arbuste ou un arbre à rameaux fins et retombants, présentant un tronc sombre et une écorce craquelée partant en lambeaux (117). Les feuilles sont appliquées sur l'axe, imbriquées et terminées en pointe, toujours vertes et persistantes. C'est une plante unisexuée (monoïque). Les cônes mâles possèdent des écailles vertes et portent des sacs polliniques jaunes. Ce sont des étamines peltées (2 à 4 sacs inférieurs). Les cônes femelles sont en boule avec une pointe piquante. Ils comprennent six écailles fertiles emboîtées, portant chacune deux ovules, sauf les deux supérieures stériles. Les graines présentent une enveloppe dure. La floraison s'étale de juillet à octobre. Cette espèce s'est bien adaptée à toutes les Mascareignes, notamment dans les régions centrales (Mandraka, Moramanga). Son huile essentielle est exportée sporadiquement vers l'Europe et les Etats-Unis (118).

B. LES EXTRAITS ET L'HUILE ESSENTIELLE DU GENRE *CUPRESSUS*.

De nombreuses études ont été réalisées sur le genre *Cupressus*. La majorité d'entre-elles concerne les extraits aux solvants des feuilles (254-258), des tiges (259, 260), du bois (261-263) et de l'écorce (264) ou porte également sur la résine (265) de ces différents arbres. Ces études ont permis d'identifier un très grand nombre de composés (terpénoides, phénols, biflavones, acides, etc...) dont les propriétés phytotoxiques (259, 266-269) et antifongiques (259, 264, 266) ont été plusieurs fois testées.

Divers travaux ont aussi porté sur la caractérisation de l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles, des rameaux, des fruits (cônes) ou du bois de nombreuses espèces du genre *Cupressus* (162, 270-284) :

- la fraction monoterpénique, notamment hydrocarbonée (α -pinène, sabinène et δ -3-carène), reste globalement majoritaire pour la plupart des espèces étudiées et pour toutes les huiles essentielles issues des feuilles (270-276), des rameaux (277) ou des fruits (cônes) (278, 279). Signalons toutefois que c'est un monoterpène oxygéné, l'umbellulone, qui est le composé majoritaire de deux échantillons algériens de feuilles de *C. arizonica* et *C. glabra* (280).

- Par contre, c'est la fraction monoterpénique oxygénée qui caractérise l'huile essentielle obtenue à partir du bois (carvacrol) (277, 281).

- Toutefois, l'huile essentielle de *C. funebris* du Viêt-Nam (162), présente une composition riche en sesquiterpènes. Il s'agit de dérivés du cédrane, tels que l' α -cédrène, le cédrool et le β -cédrène.

- Enfin, dans l'huile essentielle de feuilles de *C. benthamii* en provenance du Mexique (282), on trouve une composition riche en composés diterpéniques, avec notamment l'abiétadiène (26%) et le trans-totarol (19,3%).

A notre connaissance, l'huile essentielle de *C. lusitanicus* et *C. lusitanica* ont fait l'objet de quatre études :

- Carmo et coll. (283) ont étudié une huile essentielle d'origine portugaise de *C. lusitanicus* obtenue à partir des feuilles et des branches. La composition chimique est dominée par les monoterpènes hydrocarbonés (65%) : α -pinène (18,0%), β -pinène et sabinène (13,2% pour les deux), δ -3-carène et myrcène (8,2% pour les deux), limonène (6,1%) et γ -terpinène (5,6%).

- Dans une huile essentielle de feuilles d'une espèce dénommée *C. lusitanica* Miller originaire d'Argentine (271), on retrouve les mêmes constituants que précédemment mais à des pourcentages différents : δ -3-carène (19,4%), β -pinène (16,5%) et α -pinène (11,2%).

- Une troisième composition présente également des composés monoterpéniques comme constituants majoritaires d'une huile essentielle de feuilles de *C. lusitanica* en provenance de l'arboretum de l'INRA d'Antibes (France) (284) : le terpinèn-4-ol (16,0%), le sabinène (15,1%), l' α -pinène (13,6%) et le limonène (10,5%).

- Enfin, une quatrième composition, correspondant à des échantillons obtenus à partir des feuilles de *C. lusitanica* et originaire du Portugal (282), est caractérisée par une fraction diterpénique plus ou moins importante : abiétadiène (11-24%) et trans-totarol (5,1-6,5%). Les autres composés majoritaires sont l' α -pinène (6,0-16,6%) et le sabinène (6,7-10,3%).

C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CUPRESSUS LUSITANICUS* DE MADAGASCAR.

Nous avons étudié deux huiles essentielles commerciales de *Cupressus lusitanicus* A et B, obtenues à partir des feuilles par un producteur malgache. L'analyse de l'huile essentielle A par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 sans fractionnement, nous a permis d'identifier 23 composés dont 19 par les trois techniques.

Parallèlement, 34 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle B, sans fractionnement dont 26 par les trois techniques. Il faut noter que les 26 composés identifiés par RMN, ont des teneurs comprises entre 0,6 et 18,1%. De plus, le fractionnement de l'huile essentielle B, nous a permis d'identifier 32 nouveaux composés, soit un total de 66 constituants représentant 92,9% de la composition chimique (Tableau V).

L'identification par RMN du carbone-13 s'est déroulée en tenant compte des paramètres habituels, à savoir le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus, le contrôle des variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) de chacun des carbones d'un composé et enfin le nombre de superpositions.

| | | | HE A | HE B | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 |
|--|---------------|---------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|------------|-------|-------|------------|-------|
| | Masse (mg) | | | 1019 | 6 | 391 | 54 | 137 | 62 | 103 | 58 | 27 |
| | Pentane/Ether | | | | 100/0 | 100/0 | 100/0 | 90/10 | 90/10 | 50/50 | 50/50 | 0/100 |
| | Solvant (ml) | | | | 50 | 50 | 250 | 150 | 200 | 100 | 300 | 250 |
| Composés | IK | | | | | | | | | | | |
| | Apolaire | Polaire | | | | | | | | | | |
| <i>isobutyrate d'isobutyle</i> | 900 | 1091 | - | tr | - | - | - | 0,2 | - | - | - | - |
| tricyclène | 921 | 1011 | 0,7 | 1,0 | 4,0 | 0,7 | - | - | - | - | - | - |
| α -thujène | 923 | 1024 | 1,2 | 1,3 | 0,2 | 2,0 | - | - | - | - | - | - |
| α -pinène | 932 | 1024 | 19,0 | 17,3 | 58,6 | 20,0 | 0,1 | - | - | - | - | - |
| α -fenchène | 942 | 1057 | 0,9 | 0,7 | 0,8 | 1,2 | - | - | - | - | - | - |
| camphène | 944 | 1067 | 1,0 | 1,2 | 0,6 | 2,1 | - | - | - | - | - | - |
| sabinène | 967 | 1122 | 19,5 | 9,4* | - | 12,8 | 3,3 | - | - | - | - | - |
| <i>octan-2-one</i> | 967 | 1278 | - | tr | - | - | - | - | 0,2 | - | - | - |
| β -pinène | 971 | 1110 | 0,8 | 0,6 | 0,3 | 1,1 | - | - | - | - | - | - |
| myrcène | 982 | 1157 | 3,4 | 3,5 | - | 3,3 | 4,5 | - | - | - | - | - |
| <i>octan-2-ol</i> | 983 | 1410 | - | tr | - | - | - | - | - | - | 0,5 | - |
| <i>α-phellandrène</i> | 998 | 1161 | - | 0,1 | - | 0,3 | - | - | - | - | - | - |
| δ -3-carène | 1008 | 1149 | 13,8 | 18,1 | 18,4 | 31,5 | 0,5 | - | - | - | - | - |
| α -terpinène | 1011 | 1180 | - | 1,0 | - | 0,7 | 0,8 | - | - | - | - | - |
| p-cymène | 1013 | 1269 | 4,8 | 2,0 | - | 0,6 | 12,7 | - | - | - | - | - |
| limonène | 1023 | 1203 | 6,8* | 6,0* | - | 7,5* | 9,2 | - | - | - | - | - |
| 1,8-cinéole | 1023 | 1212 | 2,5* | 1,2* | - | - | - | 7,8 | 0,2 | - | - | - |
| β -phellandrène | 1023 | 1212 | - | 1,3* | - | 3,2* | - | - | - | - | - | - |
| <i>(E)-β-ocimène</i> | 1036 | 1243 | - | tr | - | - | 0,2 | - | - | - | - | - |
| γ -terpinène | 1050 | 1243 | - | 1,7 | - | 1,5 | 1,1 | - | - | - | - | - |
| <i>trans-hydrate de sabinène</i> | 1053 | 1454 | - | 0,1 | - | - | - | - | - | 0,1 | 2,4 | - |
| <i>cis-oxyde de linalol (forme pyrane)</i> | 1057 | 1427 | - | tr | - | - | - | - | - | - | 0,3 | - |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|------|------|-------------|-------------|-----|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| nonan-2-one | 1072 | 1384 | 0,4* | 0,5* | - | - | - | - | 9,0 | - | - | - |
| <i>trans</i> -oxyde de linalol (forme furane) | 1072 | 1462 | - | tr | - | - | - | - | - | - | 0,5 | - |
| terpinolène | 1080 | 1279 | - | 1,9 | - | 1,2 | 4,1 | - | - | - | - | - |
| <i>cis</i> -hydrate de sabinène | 1084 | 1536 | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | 5,1 |
| nonan-2-ol | 1085 | 1516 | 0,6* | 0,6* | - | - | - | - | - | - | 6,1* | - |
| linalol | 1085 | 1544 | 0,9* | 0,7* | - | - | - | - | - | 6,3 | 4,3* | - |
| β -thujone | 1087 | 1434 | - | tr | - | - | - | 0,2 | - | - | - | - |
| camphre | 1123 | 1514 | 3,7 | 4,2 | - | - | - | - | 55,5 | 0,3 | - | - |
| <i>cis</i> -verbénol | 1129 | 1662 | - | <i>tr</i> | - | - | - | - | - | - | 0,8 | - |
| <i>isobornéol</i> | 1143 | 1652 | - | tr | - | - | - | - | - | 0,1 | - | - |
| umbellulone | 1149 | 1644 | 1,9 | 4,0 | - | - | - | - | 2,7 | 37,3 | 1,9 | - |
| cryptone | 1157 | 1658 | 0,3* | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| p-cymèn-8-ol | 1158 | 1826 | - | 0,4* | - | - | - | - | - | 0,1 | 6,8* | 0,8 |
| terpinèn-4-ol | 1164 | 1601 | 3,7* | 4,1* | - | - | - | - | 5,2 | 39,3 | 1,4* | - |
| <i>décan-2-one</i> | 1172 | 1490 | - | tr | - | - | - | - | 0,9 | - | - | - |
| α -terpinéol | 1174 | 1690 | - | 1,3 | - | - | - | - | - | - | 12,8 | - |
| <i>trans</i> -carvéol | 1198 | 1815 | - | tr | - | - | - | - | - | - | 0,7 | - |
| <i>citronellol</i> | 1211 | 1750 | 0,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | 3,4 | - |
| <i>thymol</i> | 1268 | 2162 | - | 0,1 | - | - | - | - | 1,2 | - | - | - |
| acétate de bornyle | 1273 | 1575 | 1,1 | 2,4* | - | - | - | 20,0 | 5,4 | - | - | - |
| acétate d' α -terpinyle | 1333 | 1697 | 0,6* | 1,1* | - | - | - | 11,8 | 0,6 | - | - | - |
| α -cubébène | 1347 | 1450 | - | tr | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - |
| α -copaène | 1376 | 1487 | - | tr | 4,9 | 0,1 | - | - | - | - | - | - |
| α -funébrène | 1385 | 1496 | - | tr | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - |
| β -élémente | 1387 | 1577 | - | <i>tr</i> | - | - | 1,6 | - | - | - | - | - |
| α -cédrène | 1412 | 1556 | - | 0,1 | 2,3 | 0,4 | - | - | - | - | - | - |
| α -humulène | 1450 | 1653 | - | 0,1 | - | - | 2,0 | - | - | - | - | - |
| γ -muurolène | 1469 | 1672 | - | 0,2 | - | 0,4 | 0,9 | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|------|------|------------------|------------------------|------|------------|------------------------|------|------|------------|------------|------|-----|
| α -curcumène | 1471 | 1762 | - | 0,4* | - | - | 6,7* | - | - | - | - | - | |
| α -muurolène | 1492 | 1707 | - | 0,5 | - | 0,8 | 3,0 | - | - | - | - | - | |
| <i>β-bisabolène</i> | 1504 | 1711 | - | 0,1 | - | - | 2,2 | - | - | - | - | - | |
| <i>β-curcumène</i> | 1508 | 1726 | - | <i>tr</i> | - | - | 1,2* | - | - | - | - | - | |
| γ -cadinène | 1508 | 1745 | - | 0,7* | - | 0,8 | 5,7* | - | - | - | - | - | |
| calaménène (cis + trans) | 1511 | 1813 | 0,3 [†] | 0,4[#] | - | - | 9,8[#] | - | - | - | - | - | |
| δ -cadinène | 1516 | 1742 | - | 1,6 | - | 2,1 | 11,8 | - | - | - | - | - | |
| <i>α-calacorène</i> | 1529 | 1891 | - | <i>tr</i> | - | - | 0,7 | - | - | - | - | - | |
| <i>α-cadinène</i> | 1531 | 1776 | - | <i>tr</i> | - | - | 1,6 | - | - | - | - | - | |
| <i>β-calacorène</i> | 1547 | 1934 | - | <i>tr</i> | - | - | 0,4 | - | - | - | - | - | |
| (E)-nérolidol | 1548 | 2034 | - | 0,4 | - | - | - | - | - | 3,9 | 0,9 | - | |
| <i>oxyde de caryophyllène</i> | 1569 | 1967 | - | 0,1 | - | - | - | - | 1,9 | - | - | - | |
| <i>épi-cubénol</i> | 1624 | 2051 | - | <i>tr</i> | - | - | - | - | 0,3 | 0,5* | - | - | |
| α -cadinol | 1640 | 2228 | - | 0,3 | - | - | - | - | - | - | 6,5 | - | |
| <i>cadalène</i> | 1653 | 2196 | - | <i>tr</i> | - | - | 0,2 | - | - | - | - | - | |
| <i>α-bisabolol</i> | 1667 | 2203 | - | 0,1 | - | - | - | - | - | 1,1 | - | - | |
| Total | | | | 88,3 | 92,9 | 90,4 | 94,4 | 84,3 | 40,0 | 83,1 | 89,0 | 49,3 | 5,9 |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ¹³C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement de l'huile essentielle B sont en italique.* Les pourcentages des composés identifiés par RMN du carbone-13 après fractionnement sont en gras italique. F1 à F8 : huit fractions obtenues par chromatographie sur colonne (silice ICN 200-500 μ m, 60 A). *tr* : Composés à l'état de trace (<0,1%). [†] : Isomère non déterminé. [#] : Rapport de 2,4/1 (intensités relatives moyennes) entre le cis et le trans-calaménène estimé par RMN du carbone-13.

Tableau V : constituants identifiés dans l'huile essentielle de *Cupressus lusitanicus*.

Parmi les composés majoritaires présents dans les deux échantillons, on trouve l' α -pinène (19,0 et 17,3%), le sabinène possédant le squelette bicyclo[3.1.0]hexanique (19,5 et 9,4%), le δ -3-carène (13,8 et 18,1%), le limonène (6,8 et 6,0%) et le p-cymène (4,8 et 2,0%). Nous remarquons également que le camphre (3,7 et 4,2%) et le terpinèn-4-ol (3,7 et 4,1%) sont les deux principaux constituants oxygénés des deux huiles essentielles. Nous notons également la présence de deux composés linéaires non terpéniques : la nonan-2-one et l'alcool correspondant (0,4 et 0,6%).

Nous remarquons que la teneur en monoterpènes oxygénés est légèrement plus importante dans l'huile essentielle B, avec notamment la présence d'une cétone insaturée possédant le squelette bicyclo[3.1.0]hexanique du sabinène, l'umbellulone à 4,0% contre 1,9% dans l'échantillon A. De même, après fractionnement, nous notons la présence dans l'huile essentielle B de composés minoritaires :

- des composés linéaires non terpéniques, tels l'octan-2-one, l'octan-2-ol et la décan-2-one ;
- l' α -cédrene (0,1%) et l' α -funébrène (trace). Ces deux molécules possèdent un squelette cédranique (tricyclo[5.3.1.0^{1,5}]undécannique) et leurs spectres de masse sont presque superposables. Ainsi, ils ont été différenciés grâce à leurs indices de rétention sur colonne polaire et apolaire. Ces deux cédranes sont généralement présents dans l'huile essentielle de bois de cèdre, mais ils ont été identifiés aussi dans l'huile essentielle de *Cupressus funebris* du Viêt-Nam (162) et de *C. dupreziana* d'Algérie (280, 285).
- De nombreux sesquiterpènes tant oléfiniques qu'oxygénés dont la plupart possèdent le squelette bicyclo[4.4.0]décannique.

Par ailleurs, l'analyse de la fraction 8 (27 mg) par les différentes techniques chromatographiques (CPG/IK) et spectroscopiques (CPG/SM et RMN ¹³C), ne nous a pas permis d'identifier plus de 6% environ de la composition chimique. En effet, celle-ci est constituée d'un grand nombre de composés en faible proportion (inférieurs à 9%) absents de nos bibliothèques de spectres, et qui de toute façon ne sont présents qu'à l'état de traces dans l'huile essentielle.

La composition chimique de nos deux échantillons semble assez proche de celles publiées dans la littérature (271, 283, 284), avec les mêmes oléfines monoterpéniques : α -pinène, sabinène et δ -3-carène comme composés majoritaires. Par contre, nous n'avons caractérisé aucun des diterpènes qui ont été décrits par Adams et coll. (282) pour les huiles essentielles de *C. lusitanica*.

VI. L'HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM AMBROSIOIDES*.

A. *CHENOPODIUM AMBROSIOIDES*.

Le genre *Chenopodium*, appartenant à la famille des Chénopodiacées, est originaire d'Amérique du Sud et comprend 150 espèces. Il est largement répandu sous tous les tropiques et les régions tempérées (23 espèces pour l'Europe).

Chenopodium ambrosioides L. est une plante annuelle à forte odeur aromatique mesurant de 0,3 à 1 mètre de hauteur (117, 286). Elle est nommée par les Malgaches : Taimborontsilozza, Tetrolokolobe ou Akatasevabe selon les régions. On l'appelle également Herbe pipi, Thé du Mexique ou encore Ambroisie. Elle se présente sous forme d'une tige ramifiée dès la base en donnant un ensemble de rameaux dressés plus ou moins arqués (Figure 19). Les tiges sont rougeâtres, cannelées, à section anguleuse et présentant des poils blancs fins et caducs. Les feuilles sont alternes, molles avec un glabre à limbe allongé et crénelé. Elles possèdent un pétiole court, des nervures pennées très apparentes en dessous et des glandes sessiles sur la face inférieure. Les inflorescences sont en panicules terminales, assez grandes. Les fleurs (jaunâtres) sont associées en petits glomérules sphériques. Elles sont minuscules et bisexuées, possédant une enveloppe à 4 ou 5 pièces, 4 ou 5 étamines et un ovaire supère à 4 ou 5 carpelles (117). Les fruits sont sous forme d'akènes. La floraison et la fructification se déroulent toute l'année. A Madagascar, on rencontre fréquemment cette plante sur le bas des routes, dans les fossés et les anciennes jachères.

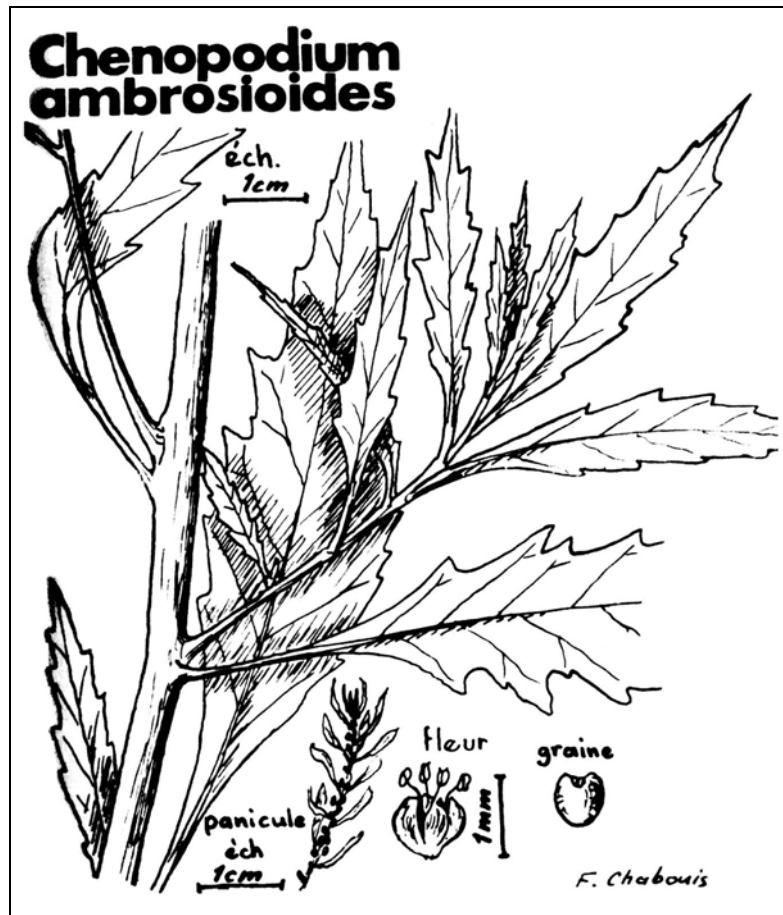


Figure 19 : caractéristiques botaniques de *Chenopodium ambrosioides* L.

La pharmacopée malgache cite abondamment *C. ambrosioides* comme tonocardiaque et antispasmodique (tiges et feuilles) et comme vermifuge puissant contre l'ascaris et le ténia (207). Cette plante est aussi utilisée contre les crampes d'estomac (feuilles et racines), la syphilis et la rougeole (117) ou encore les maladies intestinales (287). Son huile essentielle possède des propriétés fongicides (288), antibactériennes (289) et elle peut être utilisée comme herbicide (290). Les extraits de *C. ambrosioides* sont utilisés aussi bien dans le traitement des maladies pulmonaires (291) que contre le développement de certains mollusques (292). Enfin, l'ascaridole, un des constituants majoritaires de l'huile essentielle présente des effets analgésiques et sédatifs (293, 294).

B. LES HUILES ESSENTIELLES DE *C. AMBROSIOIDES*.

Les premiers travaux sur la composition chimique de l'huile essentielle de *C. ambrosioides* remontent à 1854. Nelson (295) précise qu'ils ont été réalisés par Garrigues qui reporta la présence d'une oléfine et d'un composé oxygéné. Diverses autres études menées de 1911 à 1925 (295-298) ont permis de mieux caractériser l'huile essentielle, par l'identification de plusieurs constituants dont le p-cymène, l' α -terpinène, le limonène et l'ascaridole.

L'ascaridole (2,3-dioxa-1-méthyl-4-isopropylbicyclo[2.2.2]oct-5-ène) est un endopéroxyde bicyclique ponté qui aurait l' α -terpinène comme précurseur dans le schéma de biosynthèse dans les fruits de *C. ambrosioides* (299). L'ascaridole a été décrit comme composé majoritaire (91,6-41,1%) dans l'huile essentielle de *C. ambrosioides* de diverses origines : Amérique du Nord (299, 300, 301) ; Brésil (300) ; Inde (302) ; Australie (303) ; Espagne (304).

Néanmoins, d'autres compositions chimiques passées en revue par Lawrence (305) ont été décrites pour les huiles essentielles de *C. ambrosioides* dont les constituants majoritaires sont :

- l'acétate de terpinèn-4-yle (81,6%), origine Chine (305) ;
- la pinocarvone (20-65%) et/ou le pinocarvéol (4-42%), origine non précisée (306) ;
- le limonène (32,5%), origine Espagne, huile essentielle de feuilles (305) ; 42,3%, origine Amérique du Nord, huile essentielle de fleurs (305) ;
- l' α -terpinène (65,4%), origine Inde, huile essentielle de feuilles, variété *anthelminticum* (307) ; 63,6%, origine Inde, huile essentielle des parties aériennes, (308) ; 56,0%, origine Nigeria, huile essentielle de feuilles, (309) ;
- l' α -phellandrène (19%) et p-cymène (18%), origine non déterminée (310) ;
- le p-cymène (60%), origine Argentine (311).

C. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CHENOPODIUM AMBROSIOIDES* DE MADAGASCAR.

L'huile essentielle commerciale de *Chenopodium ambrosioides*, nous a été fournie par un producteur malgache et a été obtenue par hydrodistillation à la vapeur d'eau des parties aériennes de la plante. Elle a été conservée pendant deux ans au réfrigérateur (2-3°C) puis elle a été analysée par les différentes techniques habituelles, à savoir CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13. Certains composés minoritaires ont été identifiés après fractionnement sur colonne de silice (Tableau VI).

Cette composition est caractérisée par la prédominance de l'ascaridole (41,8%), de l'isoascaridole (cis-1,2:3,4-diépoxy-p-menthane, 18,1%), du p-cymène (16,2%), de l' α -terpinène (9,7%) et du limonène (3,8%). L'ascaridole **6** et l'isoascaridole **7** présentent des spectres de masse et de RMN du carbone-13 très différents et ont été identifiés sans difficulté après un fractionnement par chromatographie sur colonne (Figure 20). L'ascaridole est déjà présent dans nos bibliothèques de spectres et a été décrit en RMN du carbone-13 (312). Par contre, pour ce qui est de l'isoascaridole, nous n'avons pas trouvé ses données de RMN du carbone-13 dans la littérature. Néanmoins, l'identification des déplacements chimiques de ses carbones a été faite à partir du spectre de la fraction 5 dans laquelle ce composé est ultra majoritaire avec une teneur proche de 60%. Les valeurs des déplacements chimiques et leur attribution que nous proposons sont décrites dans la figure 20.

L'analyse par CPG/SM et RMN du carbone-13 des fractions 5 et 6, nous a également permis d'identifier six nouvelles molécules absentes de nos bibliothèques de spectres (SM et RMN) et décrites dans la littérature : le trans et le cis-p-mentha-2,8-dièn-1-ol, respectivement **8** (0,8%) et **9** (0,3%), le trans et le cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol, respectivement **10** (0,4%) et **11** (0,3%), le 1,4-dihydroxy-p-menth-2-ène (**12**, 0,5%) et le 1,2,3,4-tetrahydroxy-p-menthane **13** (Figure 21, 22 et 23). En effet, les composés **8** à **11** ont déjà été identifiés dans l'huile essentielle de *C. ambrosioides* (304, 313), tandis que les deux menthanes polyhydroxylés (**12** et **13**) ont été isolés dans un extrait aux solvants (mélange hexane-éther-méthanol) des feuilles de *C.*

ambrosioides originaire d’Egypte (314), mais dont nous reportons la présence dans l’huile essentielle pour la première fois. La structure des composés **8** à **11**, nous a été proposée par la bibliothèque Wiley en CPG-SM. Dans la fraction 5, nous avons pu obtenir les spectres de masse et les indices de rétention des composés **8** à **11** (Tableau VI), ces derniers étant en accord avec ceux décrits dans la bibliothèque ESO 2000 [B.A.C.I.S. (Boelens Aroma Chemical Information Service) ; The complete database of essential oils ; The Netherlands, 1999]. Pour le 1,4-dihydroxy-p-menth-2-ène **12**, le positionnement sur le chromatogramme a été possible en tenant compte de l’intensité des signaux de cette molécule qui ont été observés dans la fraction 6 en RMN du carbone-13. En effet, son spectre de masse et celui du 1,2,3,4-tetrahydroxy-p-menthane **13** ne sont pas décrits dans les bibliothèques de spectres informatisées ou non, tout au moins celles dont nous disposons. Cependant, la même approche n’a pu être appliquée pour le composé **13**, à cause de la présence de deux pics possédant approximativement la même aire et des indices de rétention très proches sur le chromatogramme de la fraction 6.

| C | δ 6 | δ 7 | |
|----|-------------------|-------------------|---|
| 1 | 74,32 | 56,03 | s |
| 2 | 136,37 | 54,59* | d |
| 3 | 133,00 | 54,23* | d |
| 4 | 79,73 | 60,02 | s |
| 5 | 25,60 | 21,09 | t |
| 6 | 29,49 | 27,66 | t |
| 7 | 21,39 | 22,03 | q |
| 8 | 32,11 | 34,25 | d |
| 9 | 17,22* | 17,92** | q |
| 10 | 17,15* | 17,35** | q |

Les valeurs * et ** peuvent être interverties.

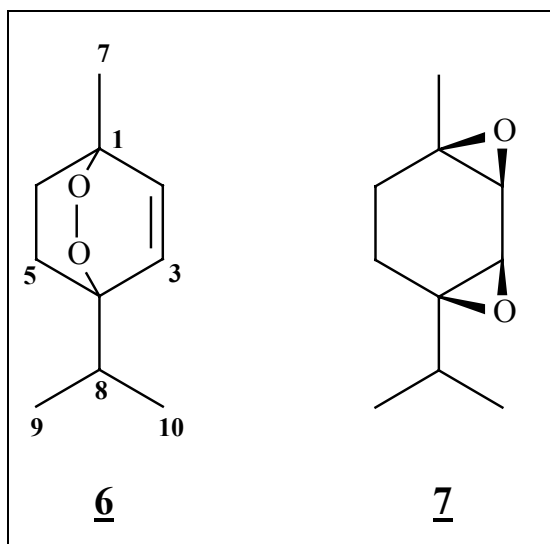


Figure 20 : structures et déplacements chimiques (ppm) de l’ascaridole **6** et de l’isoascaridole **7** mesurés dans les fractions 2 et 5 (δ **6** et δ **7**).

| Composés | | | | | | | | | | |
|--|----------|--------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | IK | | HE | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | |
| | | | Masse (mg) | 1026 | 181 | 424 | 186 | 19 | 105 | 58 |
| | | | Pentane/Ether | | 100/0 | 90/10 | 90/10 | 90/10 | 50/50 | 0/100 |
| | | Solvant (ml) | | 300 | 150 | 50 | 200 | 350 | 100 | |
| Composés | IK | | | | | | | | | |
| | Apolaire | Polaire | | | | | | | | |
| <i>δ</i> -3-carène | 1006 | 1149 | tr | 0,2 | - | - | - | - | - | |
| <i>α</i> -terpinène | 1011 | 1180 | 9,7 | 30,7* | - | - | - | - | - | |
| <i>p</i> -cymène | 1015 | 1270 | 16,2 | 55,5* | - | - | - | - | - | |
| limonène | 1023 | 1201 | 3,8 | 12,2 | - | - | - | - | - | |
| <i>γ</i> -terpinène | 1049 | 1241 | 0,2 | 0,8 | - | - | - | - | - | |
| <i>trans-p</i> -mentha-2,8-dièn-1-ol | 1105 | 1617 | 0,8 | - | - | - | - | 8,6 | - | |
| <i>cis-p</i> -mentha-2,8-dièn-1-ol | 1117 | 1657 | 0,3 | - | - | - | - | 2,9 | - | |
| <i>p</i> -cymèn-8-ol | 1160 | 1832 | 0,1 | - | - | - | 0,2 | 2,0 | - | |
| <i>trans-p</i> -mentha-1(7),8-dièn-2-ol | 1169 | 1784 | 0,4 | - | - | - | 1,1 | 3,7 | - | |
| <i>cis-p</i> -mentha-1(7),8-dièn-2-ol | 1206 | 1871 | 0,3 | - | - | - | - | 3,7 | - | |
| ascaridole | 1221 | 1715 | 41,8 | - | 70,7 | 72,4 | 42,0 | - | - | |
| <i>1,4</i> -dihydroxy- <i>p</i> -menth-2-ène* | 1245 | 2073 | 0,5 | - | - | - | - | 0,4 | 20,9 | |
| isoascaridole | 1284 | 1851 | 18,1 | - | 18,9 | 19,3 | 21,2 | 57,6 | 0,6 | |
| <i>1,2,3,4</i> -tetrahydroxy- <i>p</i> -menthane | # | # | # | - | - | - | - | - | # | |
| <i>(E)</i> -caryophyllène | 1416 | 1590 | tr | 0,2 | - | - | - | - | - | |
| Total | | | 92,2 | 99,6 | 89,6 | 91,7 | 64,5 | 78,9 | 21,5 | |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ¹³C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement de l'huile essentielle sont en italique.* Les pourcentages des composés identifiés par RMN du carbone-13 après fractionnement sont en gras italique. F1 à F6 : six fractions obtenues par chromatographie sur colonne (silice ICN 200-500 μm, 60 Å). tr : Composés à l'état de trace (<0,1%). # : les indices de rétention n'ont pu être déterminés (voir texte).

Tableau VI : constituants identifiés dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides*.

| C | δ (313) | δ <u>8</u> | δ (313) | δ <u>9</u> |
|----|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
| 1 | 67,5 | 67,40 | 68,6 | 68,55 |
| 2 | 133,9 | 133,98 | 134,4 | 134,40 |
| 3 | 132,2 | 131,90 | 130,8 | 130,70 |
| 4 | 43,4 | 43,40 | 42,5 | 42,55 |
| 5 | 24,9 | 24,83 | 25,0 | 25,09 |
| 6 | 36,7 | 36,66 | 36,1 | 36,10 |
| 7 | 29,4 | 29,47 | 28,9 | 28,95 |
| 8 | 148,1 | 148,12 | 147,2 | 147,30 |
| 9 | 20,9 | 20,88 | 21,2 | 21,24 |
| 10 | 110,6 | 110,59 | 110,9 | 110,87 |

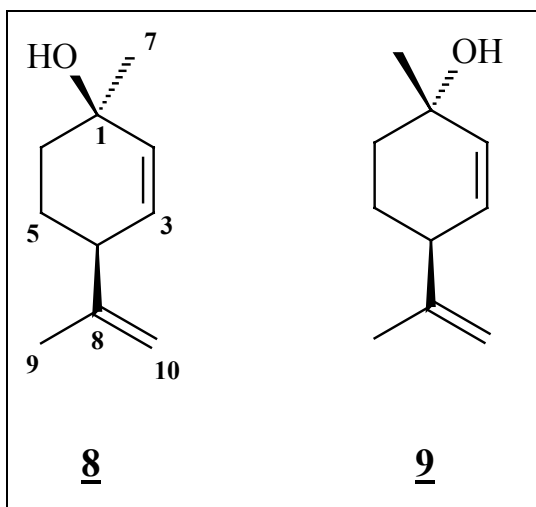


Figure 21 : structures et déplacements chimiques (ppm) du trans-p-mentha-2,8-diène-1-ol **8** et du cis-p-mentha-2,8-diène-1-ol **9** mesurés dans la fraction 5 (δ **8** et δ **9**) et décrits dans la littérature (313).

| C | δ (313) | δ <u>10</u> | δ (313) | δ <u>11</u> |
|----|----------------|---------------------------|----------------|---------------------------|
| 1 | 149,8 | 149,93 | 151,2 | 151,15 |
| 2 | 72,4 | 72,71 | 72,2 | 72,17 |
| 3 | 39,0 | 39,13 | 42,1 | 42,03 |
| 4 | 38,1 | 38,09 | 44,1 | 44,10 |
| 5 | 32,6 | 32,63 | 32,7 | 32,68 |
| 6 | 29,9 | 29,96 | 33,8 | 33,78 |
| 7 | 109,9 | 109,67 | 103,9 | 103,99 |
| 8 | 149,4 | 149,45 | 148,6 | 148,65 |
| 9 | 21,0 | 21,00 | 20,8 | 20,78 |
| 10 | 108,9 | 108,94 | 109,1 | 109,04 |

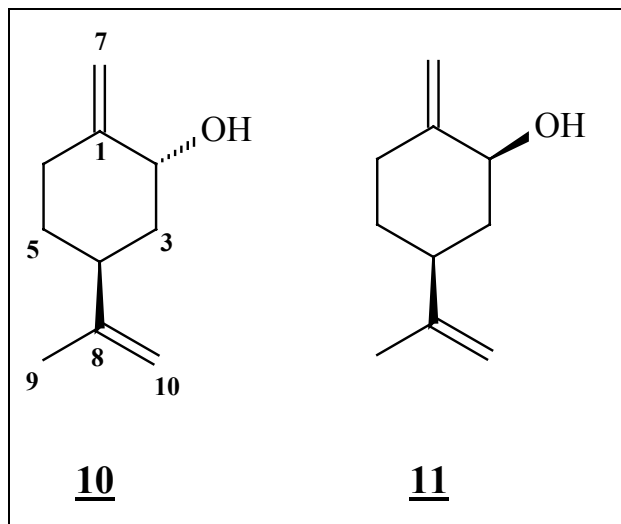


Figure 22 : structures et déplacements chimiques (ppm) du trans-p-mentha-1(7),8-diène-2-ol **10** et du cis-p-mentha-1(7),8-diène-2-ol **11** mesurés dans la fraction 5 (δ **10** et δ **11**) et décrits dans la littérature (313).

Cependant, nous proposons une autre attribution des différentes valeurs des déplacements chimiques du 1,2,3,4-tetrahydroxy-p-menthane par rapport à la littérature (314), en tenant compte des effets α , β et γ des différents groupements méthyles de la molécule (Figure 23).

| C | δ (314) | δ 12 | δ (314) | δ 13 | |
|----|----------------|---------------------------------------|----------------|--------------------------------------|---|
| 1 | 67,2 | 67,32 | 91,2 | 84,60 | s |
| 2 | 135,4 | 135,39 | 70,3 | 73,28 | d |
| 3 | 133,4 | 133,43 | 73,4 | 70,21 | d |
| 4 | 71,5 | 71,65 | 84,5 | 91,24 | s |
| 5 | 27,0 | 27,06 | 29,1 | 25,03 | t |
| 6 | 33,4 | 33,47 | 25,0 | 29,17 | t |
| 7 | 29,5 | 29,58 | 20,0 | 20,12 | q |
| 8 | 37,3 | 37,29 | 32,7 | 32,76 | d |
| 9 | 16,3* | 16,40* | 17,6* | 17,57 ^{Ω} | q |
| 10 | 17,5* | 17,57* ^{Ω} | 17,5* | 17,57 ^{Ω} | q |

Les valeurs * peuvent être interverties. ^{Ω} : Carbones superposés dans notre spectre. Nous proposons une attribution différente pour les valeurs en italiques par rapport à celles décrites dans la littérature (314).

Figure 23 : structures et déplacements chimiques (ppm) du 1,4-dihydroxy-p-menth-2-ène **12** et du 1,2,3,4-tetrahydroxy-p-menthane **13** mesurés dans la fraction 6 (δ **12** et δ **13**) et décrits dans la littérature (314).

En ce qui concerne les composés majoritaires de notre échantillon, l'analyse par RMN et par CPG nous amène à faire les remarques suivantes. Johnson et coll. (299) avaient déjà observé l'isomérisation thermique de l'ascaridole en isoascaridole durant le temps d'analyse en CPG. L'ascaridole subit une décomposition, ce qui conduit à un signal extrêmement élargi en particulier sur colonne polaire, rendant difficile sa quantification. Dans notre cas, ce phénomène est confirmé par l'examen de l'intensité des signaux de ces deux molécules dans le spectre de RMN du carbone-13. En effet, on constate que l'intensité moyenne des signaux des différents carbones appartenant à

l'isoascaridole (18,1%) est légèrement inférieure à celle des signaux de l' α -terpinène, alors que celui-ci est seulement présent à 9,7%. Cela signifie donc que la teneur en isoascaridole est surestimée par la CPG, à cause précisément de la transformation thermique d'une partie de l'ascaridole présent en son isomère. Bien plus dans la fraction 2, éluée avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle (90/10), l'ascaridole et son isomère représentent, d'après la quantification par CPG (colonne apolaire), respectivement 70% et près de 20% des constituants. Or, l'isoascaridole n'a pu être identifié en RMN du carbone-13 car aucun des signaux de la molécule n'a été détecté. Les spectres de RMN étant réalisés à température ambiante, il n'y a donc pas dégradation ou transformation thermique éventuelle des molécules thermosensibles. Il semble donc, dans ce cas précis, que l'isoascaridole provienne uniquement de l'isomérisation thermique de l'ascaridole pendant l'analyse de la fraction en CPG.

Néanmoins, nous ne pouvons pas considérer que l'isoascaridole est simplement un artefact du à la transposition thermique de l'ascaridole en CPG (299). En effet, l'analyse par RMN du carbone-13 de la fraction 5, nous a permis d'identifier sans ambiguïté l'isoascaridole, alors que nous n'avons pas détecté l'ascaridole dans cette fraction. Cet exemple illustre bien à notre sens, l'intérêt de la RMN du carbone-13 et sa complémentarité avec les autres techniques. La RMN, qui permet de réaliser des spectres à température ambiante, donne, dans ce cas précis une vision de la composition chimique de l'huile essentielle de *C. ambrosioides*, qui est plus proche de la réalité que la CPG et la CPG/SM, bien que les spectres de masse des deux isomères soient différenciés. Il serait donc intéressant de quantifier l'ascaridole et son isomère par RMN, comme cela a été fait pour le furanodiène et le furanoélémente dans l'huile essentielle de *Smyrniium olusatrum* (74).

La présence dans l'huile essentielle de *C. ambrosioides* de l'ascaridole, de l'isoascaridole et des menthanes polyhydroxylés, amène quelques remarques :

◆ La semi-quantification de l'ascaridole et de l'isoascaridole est possible à partir des intensités moyennes sur le spectre RMN du carbone-13 des signaux de ces deux

molécules et des données de la CPG. En effet, nous savons que le pourcentage cumulé de l'ascaridole et de l'isoascaridole est de 59,9%. L'ascaridole et son isomère étant d'après la RMN dans un rapport 11,2/1,3, nous pouvons en déduire la teneur en ascaridole et en isoascaridole dans notre échantillon : 53,7 et 6,2% respectivement. Une quantification plus précise pourrait être réalisée si nécessaire en prenant les précautions de base pour l'analyse quantitative par RMN du carbone-13 (58, 74).

◆ Nous pouvons aussi nous interroger sur l'origine de l'isoascaridole dans l'huile essentielle de *C. ambrosioides*. En effet, la présence de ce diépoxyde dans l'huile essentielle ne fait aucun doute puisqu'elle a été vérifiée par RMN du carbone-13. Cependant, l'isoascaridole pourrait provenir (comme les autres constituants) de la plante mais également être issu de la transposition thermique de l'ascaridole pendant l'hydrodistillation. Ce point pourrait être contrôlé en préparant à partir du matériel végétal, un extrait au solvant et une huile essentielle et en analysant les deux mélanges par RMN du carbone-13.

◆ En ce qui concerne le 1,4-dihydroxy-p-menth-2-ène et le 1,2,3,4-tétrahydroxy-p-menthane, déjà décrits dans les extraits aux solvants de *C. ambrosioides*, ces composés ne peuvent provenir de l'ouverture des fonctions époxydes de l'isoascaridole, en milieu acide, car on aurait alors les hydroxyles en position 1 et 4 qui devraient être cis l'un par rapport à l'autre.

L'échantillon d'huile essentielle de *C. ambrosioides* de Madagascar que nous avons étudié, appartient manifestement au type chimique à ascaridole qui semble être le plus couramment observé (Amérique du Nord, Brésil, Inde, Australie, Espagne). L'analyse combinée par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 donne une bonne vision globale de la composition de cette huile essentielle contenant une molécule thermosensible avec une teneur importante.

CHAPITRE III

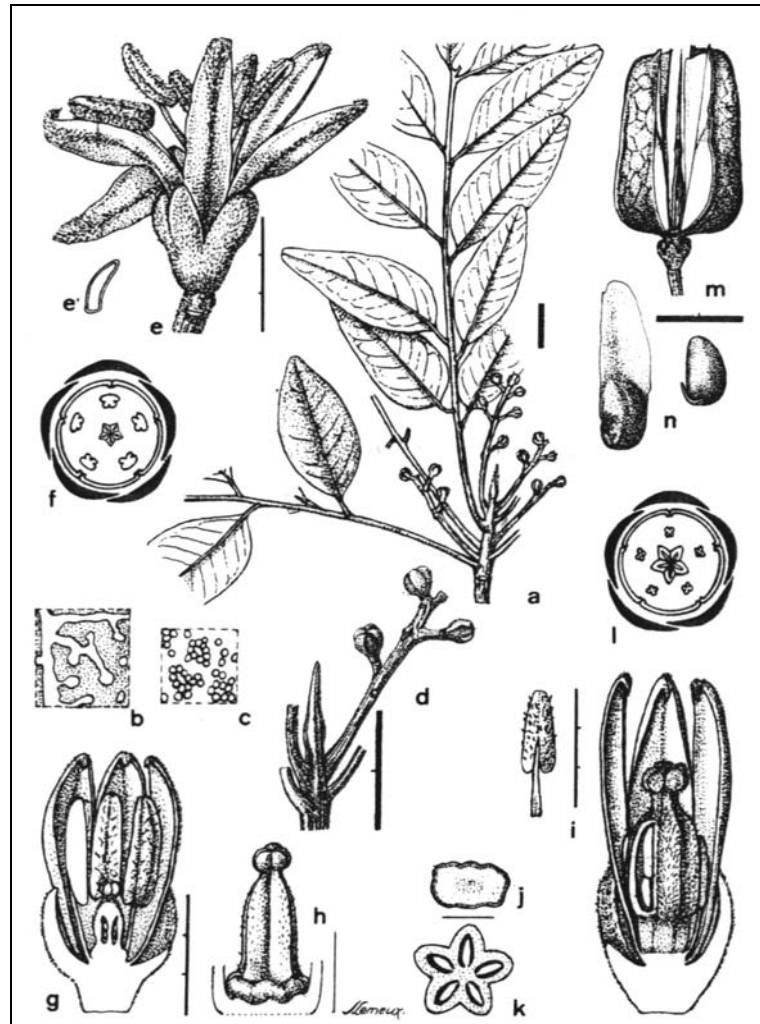
**CARACTERISATION DE
L'HUILE ESSENTIELLE DE
CEDRELOPSIS GREVEI H. BAILLON
DE MADAGASCAR**

I. *CEDRELOPSIS GREVEI* H. BAILLON.

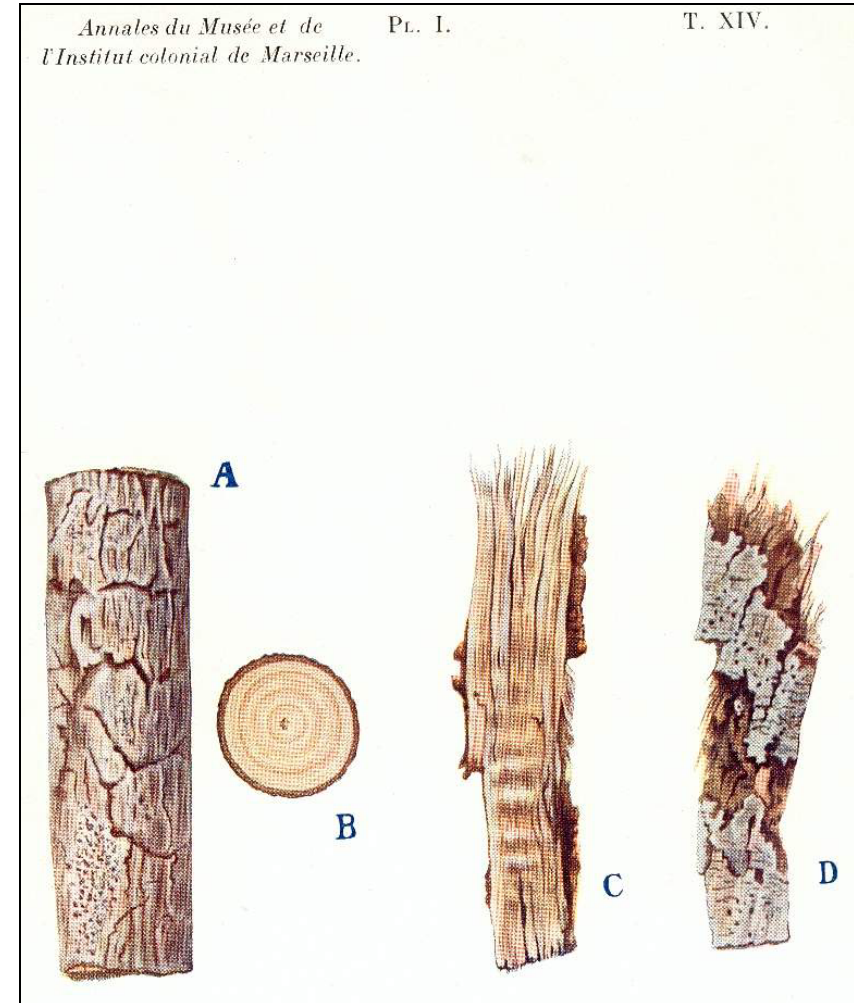
Les Ptaeroxylacées représentent une famille propre à l'Afrique australe et à Madagascar. Cette famille est principalement constituée de trois genres : le genre *Ptaeroxylon* qui ne compte qu'une seule espèce confinée à l'Afrique australe (Transvaal, Sud du Mozambique et Angola), le genre *Bottegoa* (monospécifique) déterminé récemment après une étude très détaillée (315), que l'on retrouve en Ethiopie, au Kenya et en Somalie, et enfin, le genre *Cedrelopsis* qui regroupe huit espèces, toutes localisées à Madagascar (316-318).

Cedrelopsis grevei H. Baillon est une espèce endémique de Madagascar. Cet arbre, du nom vernaculaire Katafa ou Katrafay (de Katra : amer et fay : jus) peut atteindre jusqu'à 15 mètres de hauteur, il a des rameaux à écorce grise et odorante (odeur de cèdre) (117, 319), des feuilles caduques alternes, composées-pennées avec foliole impaire (Figure 24). La floraison s'étale de septembre à décembre (après les premières pluies) et elle est suivie de la fructification, d'octobre à décembre (318). Les inflorescences en panicules très ramifiées portent de nombreuses petites fleurs jaunes polygames donnant pour chacune une capsule brune à cinq valves contenant les fruits secs. Les graines sont ailées et une seule est fertile par carpelle (117, 318). Cette espèce est surtout présente dans les forêts denses sèches ou le bush (parties Sud et Ouest de l'île), du niveau de la mer à 900 mètres d'altitude (318) (Figure 25), sur différents types de sols : siliceux, calcaires, sablonneux, etc...

Le bois est imputrescible, inattaquable par les insectes et il était utilisé dans la fabrication des tombeaux royaux (Sakalaves). De nos jours, cet arbre fait l'objet d'une importante exploitation forestière, menaçant ainsi son existence (116), dans la mesure où il est utilisé de manière plus habituelle comme bois de construction par les Malgaches (318). Son écorce amère est traditionnellement utilisée en thérapeutique. En effet, pulvérisée et appliquée sur le front, elle calmerait les céphalées, elle soulagerait aussi les douleurs des fractures.



Cedrelopsis grevei Baillon : a. rameau inflorescentiel en boutons ; b. ponctuations du limbe vues par transparence ; c. papilles et stomates du limbe, face inférieure ; d. inflorescences et bourgeon (Chauvet 285) ; e. fleur mâle ; e' trichome du calice grossi ; f. diagramme mâle (SF 8528) ; g. bouton ; h. pistillode ; i. CL bouton à maturité et anthérode ; j. CT disque femelle ; k. CT ovaire ; l. diagramme femelle ; m. fruit ; n. graine et embryon (Decary 3316). Échelles : a. d. m. n. = 1 cm ; e. g. i. = 3 mm ; h. j. = 1 mm.



A. un fragment de tige, d'environ 2 centimètres de diamètre, vu extérieurement ; - B. la même tige en section transversale ; - C. un fragment d'écorce pris sur une tige âgée, vue par sa face interne ; - D. le même vu extérieurement.

Figure 24 : caractéristiques botaniques (318) et détail du bois et de l'écorce (319) de *Cedrelopsis grevei*.

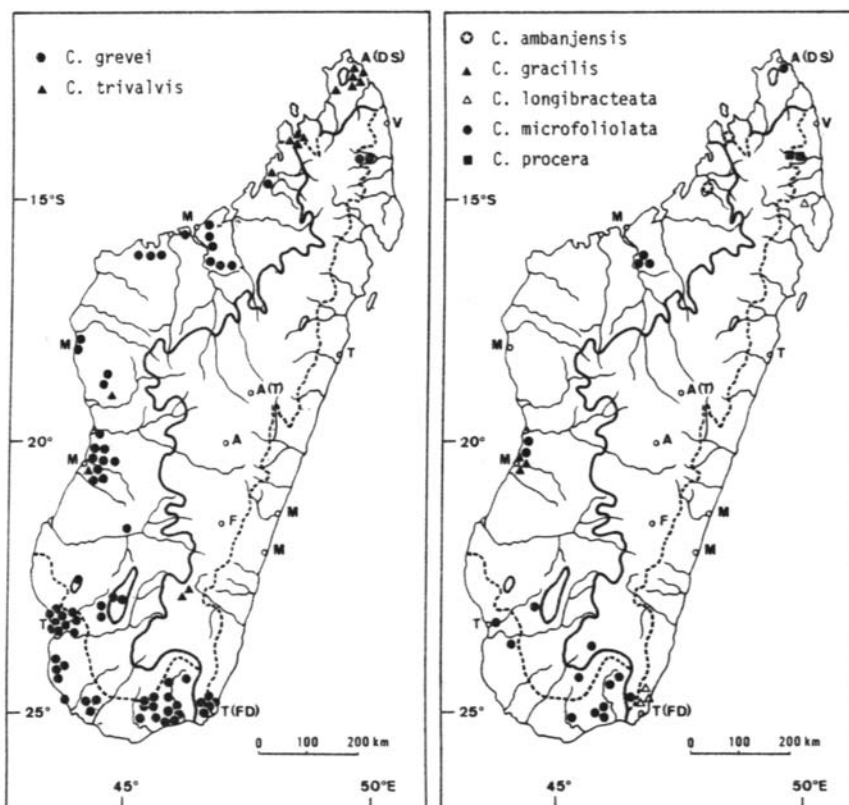


Figure 25 : carte de la répartition géographique à Madagascar de différentes espèces appartenant au genre *Cedrelopsis* (318).

La décoction d'écorce possède des propriétés anti-dysentériques, fébrifuges, toniques et fortifiantes, certains lui attribuent même des vertus aphrodisiaques (318, 320). Les feuilles en décoction sont également utilisées pour traiter la fragilité capillaire, les maux de tête et les maux de gorge. Elle est aussi utilisée pour améliorer le goût et l'arôme du rhum (207).

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

Quelques études ont été réalisées sur les extraits aux solvants du bois, de l'écorce ou des feuilles des genres *Ptaeroxylon* et *Cedrelopsis*. Parmi celles-ci, on peut citer les travaux de Dean et coll. (321) qui ont identifié la ptaeroxyline et l'alloptaeroxyline, deux nouvelles chromones dans les extraits aux solvants du bois de *Ptaeroxylon obliquum* d'Afrique. Une autre étude réalisée par Mulholland et coll. (322) sur l'extrait à l'hexane de l'écorce de *P. obliquum*, a permis l'identification d'un

diterpénoïde « inhabituel » possédant le squelette de l'aromadendrane (dont l'un des deux méthyles géminés est substitué par un motif à cinq carbones) : la cnéorubin X.

La présence de chromones et de coumarines a également été mise en évidence dans les extraits aux solvants du bois et d'écorces de *Cedrelopsis grevei* de Madagascar (323, 324). Mulholland et coll. (325) ont isolé un composé majoritaire, la β -amyrine (triterpène pentacyclique) ainsi que deux dérivés de limonoïdes (triterpénoïdes), le cedmilinol et la cedmiline qui n'avaient jamais été identifiés auparavant dans les autres espèces de la famille des Ptaeroxylacées (321-324). Enfin, d'autres travaux (320, 326) ont permis d'identifier des polyphénols (acides-phénols et flavonoïdes) dans les extraits aux solvants de feuilles.

En 2000, Mulholland et coll. (327) ont passé en revue la composition chimique des Méliacées et des Ptaeroxylacées du Sud et de l'Est de l'Afrique et de Madagascar. Les auteurs constatent que, du point de vue chimique, les deux familles sont bien distinctes (malgré leur ressemblance morphologique), mais que la famille des Ptaeroxylacées se rapproche plus de celle des Cneoracées. En effet, la présence de dérivés de limonoïdes et de diterpénoïdes chez différentes espèces appartenant aux deux familles (*P. obliquum*, *C. grevei*, *Neochamaelea pulverulenta* ou *Cneorum tricoccon*), laisse penser qu'il existe une étroite relation entre-elles.

A notre connaissance, l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* n'a fait l'objet que de deux publications (118, 328). Les travaux réalisés par Menut et coll. (328) nous renseignent sur la composition chimique de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles. Cette composition est très riche en sesquiterpènes oléfiniques (70% du mélange) parmi lesquels on trouve : le (E)-caryophyllène (42,5%), l' α -humulène (6,4%), le germacrène D (3,9%) et le δ -cadinène (2,8%). On remarque également la présence, en quantités appréciables, de monoterpènes comme l' α -pinène (7,9%), le (Z)- β -ocimène (5,3%) et le β -pinène (2,9%). La prédominance du (E)-caryophyllène (67,5%) dans l'huile essentielle de feuilles est également confirmée par Rasoanaivo et

coll. (118), qui ont passé en revue les différentes huiles essentielles qui possèdent un intérêt économique à Madagascar.

III. L'HUILE ESSENTIELLE D'ECORCE DE *CEDRELOPSIS GREVEI* DE MADAGASCAR.

Dans le cadre de nos travaux relatifs aux plantes aromatiques et médicinales de Madagascar, nous nous sommes intéressés à la composition chimique de l'huile essentielle d'écorce de *Cedrelopsis grevei*, qui n'a fait l'objet, à notre connaissance, d'aucune étude. Pour cela, nous avons de nouveau mis en œuvre une technique de séparation : la chromatographie liquide sur colonne et plusieurs techniques analytiques : la CPG/IK, la CPG/SM ainsi que la RMN du carbone-13.

Nous avons étudié six échantillons commerciaux d'huile essentielle de *C. grevei* de Madagascar qui nous ont été fournis par des producteurs malgaches. Les huiles essentielles A à F ont été obtenues à partir de l'écorce par hydrodistillation à la vapeur d'eau dans des alambics en acier inox (appareil industriel). Le matériel végétal a été récolté dans les régions de Toliary (Tuléar), Morondava et Mahajanga (Majunga).

Nous avons réalisé :

- l'étude détaillée de la composition chimique de l'huile essentielle A (20 grammes), par l'analyse des fractions hydrocarbonées et oxygénées après fractionnement ;
- l'étude de la composition chimique de cinq autres huiles essentielles (B à F, 5 grammes chacune) sans fractionnement.

A. ANALYSE DETAILLEE D'UN ECHANTILLON D'HUILE ESSENTIELLE BRUTE.

L'analyse par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 de l'huile essentielle A de *Cedrelopsis grevei*, nous a permis d'identifier 42 composés représentant 66,2% de la composition chimique globale. L'huile essentielle est caractérisée par une

importante fraction hydrocarbonée et par la prédominance de composés sesquiterpéniques (27 sesquiterpènes et 14 monoterpènes). Les produits majoritaires sont le (E)-caryophyllène (9,3%), l' α -copaène (7,7%), l' α -sélinène (5,8%), le δ -cadinène (4,9%), le β -sélinène (4,5%), l' α -humulène (3,3%) et le β -bisabolène (2,8%). Parmi les 11 composés oxygénés identifiés, on trouve l'oxyde de caryophyllène et l'élémol qui représentent seulement 3% environ de la composition chimique de l'huile essentielle totale.

Il apparaît que cette huile essentielle est complexe, par la présence d'un grand nombre de sesquiterpènes ce qui entraîne un nombre élevé de coélutions (Figure 26). De plus, plusieurs de ces molécules sont absentes de nos bibliothèques de spectres, il s'agit essentiellement de sesquiterpènes oxygénés.

De manière à identifier un plus grand nombre de composés, nous avons chromatographié sur colonne ouverte de silice (de type « flash ») l'échantillon A (15 grammes) : deux fractions ont été obtenues, une au pentane contenant les hydrocarbures (F1, 11,0 g), et l'autre à l'oxyde de diéthyle, contenant les composés oxygénés (F2, 3,7 g). Chacune des deux fractions est ensuite chromatographiée avec de la silice plus fine (Figure 27).

1. Etude de la fraction hydrocarbonée.

Une partie de la fraction hydrocarbonée (3 g) est chromatographiée sur colonne ouverte de silice (SiO_2 , ICN 63-200 μm , 60 A) imprégnée de nitrate d'argent. L'élution au pentane conduit à 14 fractions (Tableau VII). Les différentes fractions ont été analysées par CPG/IK, CPG/SM et dix d'entre-elles, sélectionnées en fonction de leur profil chromatographique, l'ont été par RMN du carbone-13.

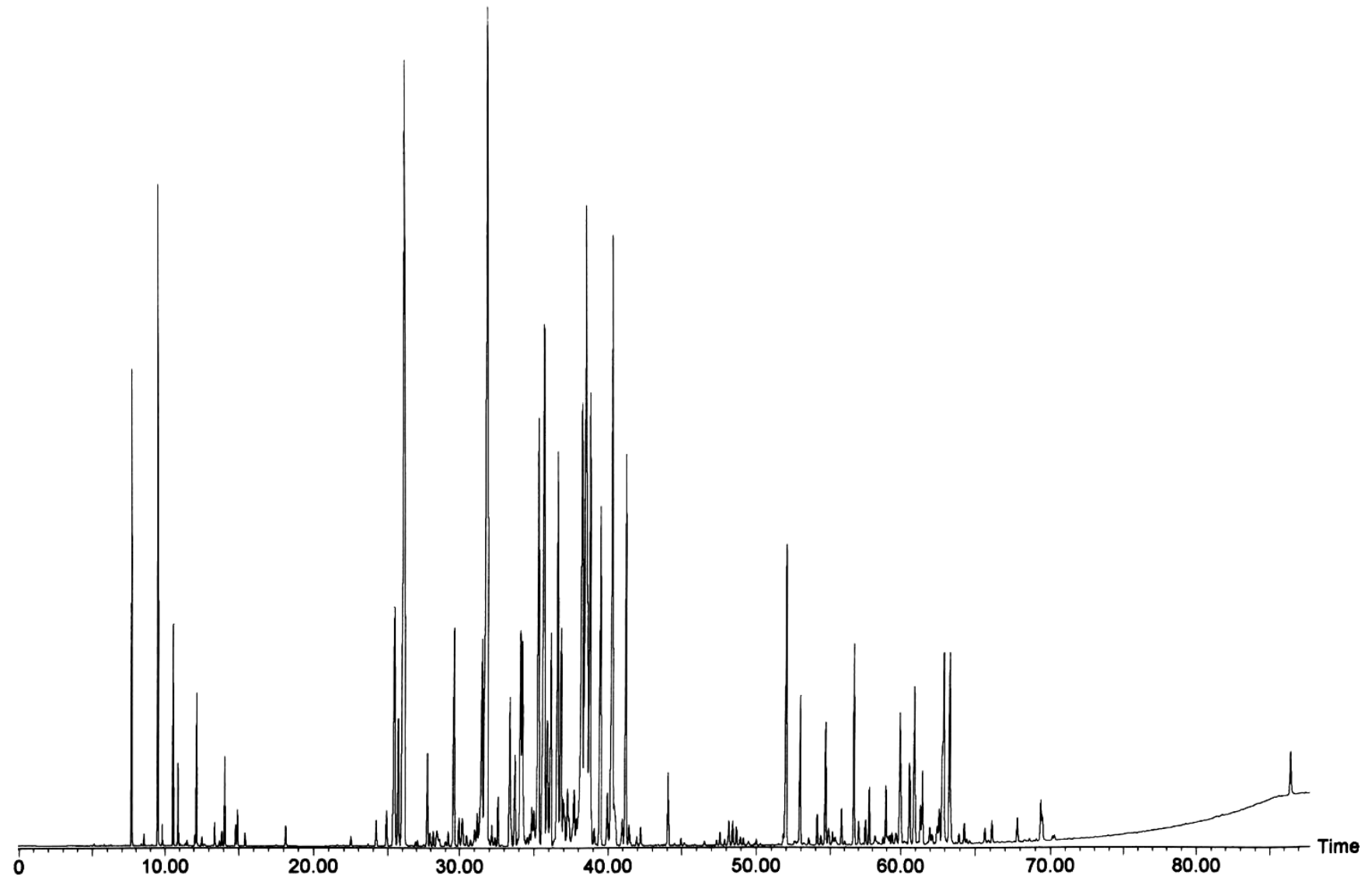


Figure 26 : chromatogramme de l'huile essentielle A de *Cedrelopsis grevei* Baillon sur colonne polaire (Rtx-Wax ; 60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 μm) ; programmation de température : de 60°C à 230°C, à 2°C/mn.

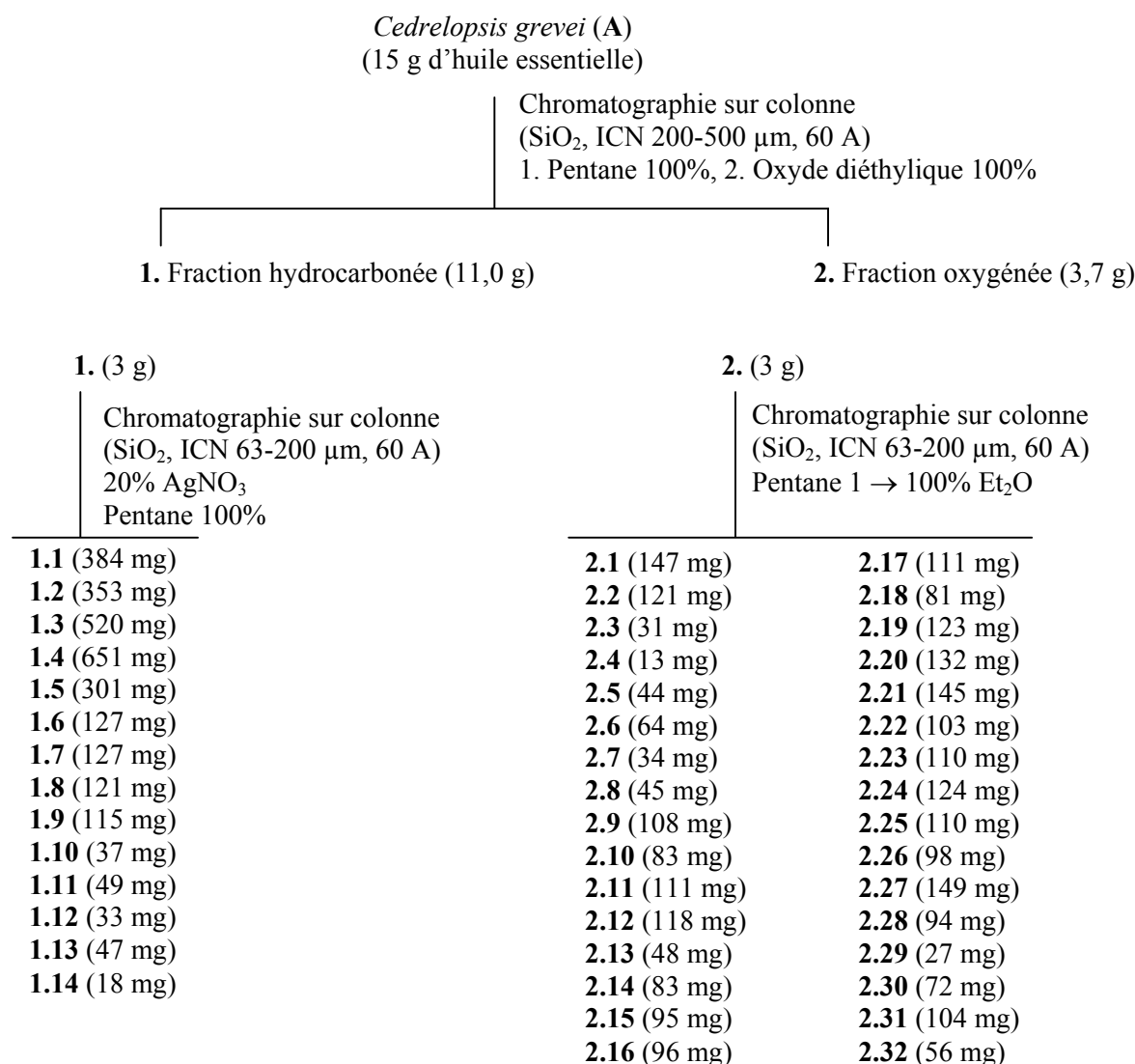


Figure 27 : schéma de fractionnement de l'huile essentielle A de *Cedrelopsis grevei*.

L'étude de ces différentes fractions a permis, bien entendu, de retrouver les constituants qui avaient été préalablement caractérisés dans l'huile essentielle brute A, mais aussi d'identifier 23 nouveaux composés hydrocarbonés. Parmi ceux-ci, nous retrouvons 18 constituants présents dans nos bibliothèques « Arômes » et « Terpènes », nous pouvons citer par exemple le sativène, l' α -gurjunène, le β -sesquiphellandrène et le (E)- α -bisabolène.

| Composés | Fractions | | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 1.5 | 1.6 | 1.7 | 1.8 | 1.9 | 1.10 | 1.11 | 1.12 | 1.13 | 1.14 |
|------------------------|------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|-------------|------------|-----|------|------|------|------|------|
| | Masse (mg) | | 384 | 353 | 520 | 651 | 301 | 127 | 127 | 121 | 115 | 67 | 49 | 33 | 47 | 18 |
| | IK | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Apol | Pol | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>α-thujène</i> | 924 | 1021 | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-pinène</i> | 931 | 1021 | 4,3 | 3,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-fenchène</i> | 943 | 1054 | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>camphène</i> | 945 | 1063 | - | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>sabinène</i> | 966 | 1118 | - | - | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-pinène*</i> | 971 | 1109 | 0,7 | 12,1 | 2,0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| myrcène | 982 | 1155 | - | - | - | 0,7 | 0,7 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>δ-3-carène</i> | 1006 | 1145 | 0,4 | 5,8 | 0,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-terpinène</i> | 1010 | 1175 | - | - | - | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>m-cymène</i> | 1010 | 1258 | - | - | - | - | 0,2 | 0,7 | 0,5 | 0,1 | - | - | - | - | - | - |
| p-cymène | 1013 | 1261 | - | - | - | - | 0,6 | 1,2 | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - |
| limonène* | 1022 | 1194 | - | - | 1,1 | 1,5 | 0,8 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-phellandrène*</i> | 1022 | 1204 | - | - | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (Z)-β-ocimène | 1026 | 1226 | - | - | - | 0,1 | 0,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (E)-β-ocimène | 1037 | 1243 | - | - | - | 0,5 | 1,8 | 1,8 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>γ-terpinène</i> | 1049 | 1237 | - | - | 0,2 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>terpinolène</i> | 1079 | 1276 | - | - | - | 0,2 | 0,2 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>δ-élémente</i> | 1335 | 1463 | - | 0,3 | 1,0 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-cubébène</i> | 1348 | 1451 | - | 1,2 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| cyclosativène* | 1370 | 1480 | 17,9 | 1,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-copaène</i> | 1379 | 1494 | 43,9 | 34,5 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-élémente</i> | 1389 | 1587 | - | - | - | 0,4 | 4,5 | 17,8 | 12,0 | 3,8 | 1,0 | 0,4 | 0,3 | - | - | - |
| <i>sativène</i> | 1396 | 1527 | 0,4 | 0,7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| cypérène* | 1401 | 1520 | 5,4 | 0,9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-gurjunène</i> | 1410 | 1523 | 0,7 | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-cédrène*</i> | 1412 | 1559 | 0,9 | 1,5 | 1,0 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (E)-caryophyllène | 1418 | 1587 | - | - | 10,2 | 26,9 | 36,5 | 16,9 | 1,9 | 0,2 | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------|------|-------------|------------|-------------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|------|------|-------------|-------------|---|
| <i>β-copaène</i> | 1427 | 1581 | 0,1 | 1,4 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| trans- α -bergamotène | 1433 | 1576 | - | 0,4 | 1,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (E)- β -farnésène | 1447 | 1655 | - | - | - | - | - | 0,2 | 1,5 | 3,6 | 4,3 | 5,4 | 2,7 | 1,8 | 0,3 | - | - |
| α -humulène | 1451 | 1664 | - | - | - | - | - | 0,1 | 1,3 | 10,9 | 29,9 | 38,7 | 46,3 | 38,6 | 16,0 | 8,1 | - |
| <i>rotundène</i> | 1460 | 1629 | 1,8 | 9,9 | 3,2 | 0,5 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| alloaromadendrène | 1464 | 1635 | - | 1,9 | 5,5 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ishwarane | 1465 | 1637 | 11,9 | 2,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>4,5-di-épi-aristolochène</i> | 1467 | 1665 | - | - | 5,0 | 2,7 | 1,5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| γ -muurolène* | 1472 | 1677 | - | - | 13,0 | 6,0 | 1,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| γ -curcumène* | 1475 | 1680 | - | - | - | - | - | 5,3 | 13,0 | 14,6 | 12,6 | 5,7 | 2,0 | 0,6 | 0,3 | 0,6 | - |
| α -curcumène* | 1475 | 1762 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,5 | 12,4 | 30,0 | 53,5 | 76,0 | 77,9 | - |
| β -sélinène | 1483 | 1705 | - | - | 10,8 | 13,7 | 9,2 | 2,0 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -sélinène* | 1492 | 1716 | - | - | 10,3 | 9,7 | 15,6 | 11,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -muurolène* | 1494 | 1715 | - | 0,9 | 5,7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>(E,E)-α-farnésène</i> | 1499 | 1736 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,4 | 0,3 | - |
| β -bisabolène* | 1505 | 1716 | - | - | - | - | - | 2,6 | 22,1 | 28,6 | 26,0 | 15,1 | 6,3 | 1,8 | 0,7 | 0,9 | - |
| γ -cadinène | 1508 | 1749 | - | - | 1,3 | 2,0 | 2,3 | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-curcumène*</i> | 1509 | 1733 | - | - | - | - | - | 16,1 | 21,2 | 20,2 | 9,5 | 3,1 | 1,2 | 0,6 | 0,5 | 1,0 | - |
| <i>(Z)-γ-bisabolène*</i> | 1509 | 1744 | - | - | - | - | - | - | 0,9 | 1,0 | 1,0 | 0,7 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | - | - |
| <i>trans-calaménène*</i> | 1512 | 1816 | - | - | - | - | 0,7 | 5,4 | 5,2 | 2,3 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | - | - | - | - |
| δ -cadinène | 1516 | 1745 | - | - | 11,8 | 14,0 | 9,9 | 2,8* | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-sesquiphellandrène*</i> | 1518 | 1758 | - | - | - | - | 0,5 | 2,2 | 1,8 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - |
| α -calacorène | 1531 | 1895 | - | - | - | - | - | 0,9 | 1,7 | 1,9 | 1,4 | 0,5 | 0,2 | - | - | - | - |
| <i>(E)-α-bisabolène</i> | 1533 | 1764 | - | - | - | - | - | - | 0,8 | 1,5 | 1,9 | 1,8 | 1,2 | 0,5 | 0,1 | - | - |
| <i>β-calacorène</i> | 1548 | 1939 | - | - | - | - | - | - | - | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | - | - | - | - |
| <i>cadalène</i> | 1654 | 2203 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,3 | 0,7 | 1,6 | 2,6 | - |
| Total | | | 88,4 | 80,5 | 80,2 | 85,5 | 86,9 | 88,8 | 85,3 | 89,3 | 89,8 | 84,6 | 91,7 | 98,9 | 96,0 | 91,4 | - |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ^{13}C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apol et Pol) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement sont en italique.*

Tableau VII : composés identifiés dans la fraction hydrocarbonée de l'huile essentielle A de *Cedrelopsis grevei*.

Nous identifions également cinq autres composés, absents de nos bibliothèques de spectres, à partir de nos banques « littérature » :

- en spectrométrie de masse, par comparaison des spectres de masse expérimentaux avec d'une part, les spectres de masse contenus dans nos différentes banques commerciales informatisées et d'autre part avec ceux décrits dans la banque « Joulain-König » (20) ;
- en RMN du carbone-13, par comparaison des différentes raies de résonance des carbones appartenant à chaque molécule avec celles présentes dans les bibliothèques de spectres « littérature » constituées au laboratoire, ou alors, par reconstruction du spectre d'un composé à partir de molécules de référence.

Il s'agit du rotundène, du 4,5-di-épi-aristolochène, du β -curcumène, du trans-calaménène et du cadalène. Dans le paragraphe 3, nous reportons les données spectrales de ces différentes molécules.

2. Etude de la fraction oxygénée.

Une chromatographie sur colonne ouverte de silice (SiO_2 , ICN 63-200 μm , 60 A) de la fraction oxygénée (3 g) de l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei*, utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante, nous a donné 32 fractions (Tableau VIII.1-2). Chacune d'entre-elles a été analysée par CPG/IK, CPG/SM et 21 l'ont été par RMN du carbone-13, toujours en tenant compte de leur profil chromatographique.

Ces analyses nous ont permis d'identifier 62 composés oxygénés dont 51 nouveaux constituants par rapport à l'huile essentielle brute. Parmi ceux-ci, 38 constituants sont présents dans nos bibliothèques « Arômes » et « Terpènes », ce sont en majorité des alcools sesquiterpéniques ou des oxydes comme l' α et le β -eudesmol, l'élémol, l' α et l'épi- α -bisabolol, le β -copaèn-4 α -ol, le valérianol, l'oxyde de caryophyllène ou encore l'époxyde d'humulène II.

| Composés | Fractions | | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | 2.6 | 2.7 | 2.8 | 2.9 | 2.10 | 2.11 | 2.12 | 2.13 | 2.14 | 2.15 | 2.16 | |
|--|---------------|------|-------------|------|-------------|------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|------|------|------------|------|------------|------------|-------|
| | Masse (mg) | | 147 | 121 | 31 | 13 | 44 | 64 | 34 | 45 | 108 | 83 | 111 | 118 | 48 | 83 | 95 | 96 | |
| | Pentane/Ether | | 99/1 | 99/1 | 98/2 | 98/2 | 98/2 | 98/2 | 95/5 | 95/5 | 95/5 | 95/5 | 95/5 | 95/5 | 95/5 | 95/5 | 90/10 | 90/10 | 80/20 |
| | IK | | Apol | Pol | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6-méthylhept-5-èn-2-one | 961 | 1330 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,1 | 1,3 | 0,9 | 0,1 | - | - | - | - | |
| <i>linalol</i> | 1084 | 1535 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,1 | |
| <i>fenchol</i> | 1100 | 1571 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,2 | 2,4 | 4,4 | |
| <i>nopinone</i> | 1110 | 1565 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>camphre</i> | 1123 | 1507 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | - | - | - | |
| trans-pinocarvéol | 1124 | 1639 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>cis-verbénol</i> | 1130 | 1663 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>pinocarvone</i> | 1140 | 1557 | - | - | - | - | - | - | 1,8 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| bornéol | 1150 | 1685 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>p-cymèn-8-ol</i> | 1157 | 1825 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>terpinèn-4-ol</i> | 1162 | 1588 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,4 | 6,9 | |
| myrténal | 1171 | 1612 | - | - | - | - | - | - | 5,9 | 8,6 | 1,6 | - | - | - | - | - | - | - | |
| α -terpinéol | 1172 | 1679 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>estragole</i> | 1176 | 1657 | 2,1 | 2,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| myrténol | 1180 | 1775 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>acétate de fenchyle</i> | 1208 | 1464 | 0,4 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>carvone</i> | 1217 | 1717 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,1 | 0,5 | 0,7 | - | - | - | |
| <i>géraniol</i> | 1235 | 1831 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>acétate de bornyle</i> | 1271 | 1573 | - | - | - | 1,9 | 4,7 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>alcool perrillyque</i> | 1278 | 1988 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>acétate de pinocarvyle</i> | 1281 | 1638 | - | - | 0,2 | 1,5 | 0,7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>acétate de myrtényle</i> | 1307 | 1677 | - | - | 0,4 | 1,8 | 1,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>acétate d'α-terpinyle</i> | 1333 | 1685 | - | - | 1,2 | 0,8 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>dihydroagarofurane</i> [†] | 1487 | 1712 | 75,3 | 66,0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>sesquicinéole*</i> | 1505 | 1737 | 0,1 | 6,3 | 71,5 | 55,0 | 7,8 | 2,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>6-épi-shyobunol</i> | 1505 | 1881 | - | - | - | - | - | - | 1,1 | 10,1 | 3,8 | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>hydrate de trans-sesquisabinène</i> | 1530 | 1980 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>α-agarofurane</i> | 1535 | 1878 | - | - | - | - | - | 1,4 | 2,4 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| élémol | 1536 | 2066 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>hydrate de 7-épi-trans-sesquisabinène*</i> | 1543 | 1991 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>(E)-nérolidol</i> | 1547 | 2031 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,5 | |
| <i>palustrol</i> | 1563 | 1915 | - | - | - | - | - | - | 0,2 | 5,1 | 4,9 | 0,7 | 0,1 | - | - | - | - | - | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------|------|------|------|------|------|------|-----|-------------|-------------|------------|-------|-------|--------------|------|-------------|-------------|-------------|
| <i>hydrate de cis-sesquisabinène</i> | 1565 | 2075 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| oxyde de caryophyllène | 1571 | 1972 | - | - | - | - | - | - | 1,2 | 18,9 | 55,2 | 61,5* | 69,7* | 65,9* | 8,5* | - | - | - |
| <i>gleenol*</i> | 1573 | 2025 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,9 | 5,5 | 3,9 | - | - | - |
| <i>β-copaèn-4α-ol*</i> | 1575 | 2141 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>hydrate de 7-épi-cis-sesquisabinène</i> | 1579 | 2094 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>guaïol</i> | 1584 | 2077 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| époxyde d'humulène II | 1593 | 2028 | - | - | - | - | - | - | 0,2 | 16,4 | 28,0 | 25,5 | 19,7 | 11,1 | 1,5 | - | - | - |
| lédol | 1595 | 2016 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>δ-épi-γ-eudesmol</i> | 1610 | 2095 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,6 |
| <i>α-acoréanol*</i> | 1616 | 2123 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7,6 | 33,3 |
| <i>épi-cédrol</i> | 1616 | 2147 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>épi-cubéanol*</i> | 1618 | 2057 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 10,9 | 15,4 | 6,6 | - |
| <i>caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5α-ol*</i> | 1622 | 2285 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Δ-9,10-érémophilèn-11-ol*</i> | 1623 | 2193 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>γ-eudesmol*</i> | 1630 | 2160 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-eudesmol*</i> | 1630 | 2208 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>τ-muurolol*</i> | 1633 | 2177 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>cubéanol</i> | 1634 | 2052 | - | - | - | - | - | - | 13,5 | 3,7 | 0,7 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>valérianol*</i> | 1638 | 2205 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-eudesmol*</i> | 1638 | 2216 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-cadinol*</i> | 1639 | 2220 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-sélin-11-èn-4-ol*</i> | 1642 | 2241 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>oxyde d'α-bisabolol*</i> | 1645 | 2130 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>intermédeol*</i> | 1645 | 2222 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-bisabolol</i> | 1653 | 2145 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 39,5 | 59,2 | 21,6 | - |
| <i>bulnésol*</i> | 1656 | 2202 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-bisabolol</i> | 1666 | 2209 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>épi-α-bisabolol</i> | 1669 | 2212 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-cypérone</i> | 1727 | 2335 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,3 |
| <i>alloévodionol</i> | 1899 | 2786 | - | - | - | - | - | - | 22,2 | 23,8 | 1,6 | 1,1 | 0,7 | - | - | - | - | - |
| Total | | | 77,9 | 75,2 | 73,5 | 61,0 | 14,6 | 4,1 | 24,9 | 51,6 | 72,5 | 87,3 | 89,6 | 92,9 | 83,3 | 64,5 | 85,0 | 77,3 |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ¹³C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms et les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apol et Pol) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement sont en italique.* † : Isomère non déterminé.

Tableau VIII.₁ : composés identifiés dans la fraction oxygénée de l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei*.

| Composés | Fractions | | 2.17 | 2.18 | 2.19 | 2.20 | 2.21 | 2.22 | 2.23 | 2.24 | 2.25 | 2.26 | 2.27 | 2.28 | 2.29 | 2.30 | 2.31 | 2.32 | |
|--|---------------|------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------------|------------|-------|-------|
| | Masse (mg) | | 111 | 81 | 123 | 132 | 145 | 103 | 110 | 124 | 110 | 98 | 149 | 94 | 27 | 72 | 104 | 56 | |
| | Pentane/Ether | | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 50/50 | 0/100 |
| | IK | | Apol | Pol | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6-méthylhept-5-èn-2-one | 961 | 1330 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>linalol</i> | 1084 | 1535 | 4,8 | 3,5 | 2,2 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| fenchol | 1100 | 1571 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>nopinone</i> | 1110 | 1565 | - | 0,5 | 1,2 | 1,2 | 0,2 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>camphre</i> | 1123 | 1507 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| trans-pinocarvéol | 1124 | 1639 | 0,3 | 3,5 | 8,3 | 12,0 | 2,3 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>cis-verbènel</i> | 1130 | 1663 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,2 | 1,3 | 0,1 | |
| <i>pinocarvone</i> | 1140 | 1557 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| bornéol | 1150 | 1685 | - | - | - | - | 0,1 | 0,7 | 1,2 | 1,7 | 1,3 | 1,2 | 0,3 | 0,1 | - | - | - | - | |
| <i>p-cymèn-8-ol</i> | 1157 | 1825 | - | - | - | - | - | - | 0,2 | 0,7 | 1,1 | 1,4 | 0,9 | 0,7 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | - | |
| <i>terpinèn-4-ol</i> | 1162 | 1588 | 4,2 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| myrténal | 1171 | 1612 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| α -terpinéol | 1172 | 1679 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,1 | 1,5 | 6,3 | 12,6 | 1,7 | - | |
| <i>estragole</i> | 1176 | 1657 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| myrténol | 1180 | 1775 | - | - | - | - | - | - | 0,3 | 1,2 | 2,0 | 3,3 | 3,7 | 2,7 | 1,4 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | |
| <i>acétate de fenchyle</i> | 1208 | 1464 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>carvone</i> | 1217 | 1717 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>géraniol</i> | 1235 | 1831 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,1 | 1,0 | 0,1 | |
| <i>acétate de bornyle</i> | 1271 | 1573 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>alcool perrillyque</i> | 1278 | 1988 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,1 | 1,3 | - | |
| <i>acétate de pinocarvyle</i> | 1281 | 1638 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>acétate de myrtènyle</i> | 1307 | 1677 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>acétate d'α-terpinyle</i> | 1333 | 1685 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>dihydroagarofurane</i> [†] | 1487 | 1712 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>sesquicinéole</i> * | 1505 | 1737 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>6-épi-shyobunol</i> | 1505 | 1881 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>hydrate de trans-sesquisabinène</i> | 1530 | 1980 | - | - | 1,2 | 1,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>α-agarofurane</i> | 1535 | 1878 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| élémol | 1536 | 2066 | - | - | - | - | - | 0,2 | 1,8 | 6,2 | 12,5 | 17,3 | 24,7 | 30,7 | 33,3 | 11,5 | 1,0 | 0,4 | |
| <i>hydrate de 7-épi-trans-sesquisabinène</i> * | 1543 | 1991 | - | - | - | - | 22,4 | 20,8 | 19,1 | 10,7 | 2,9 | 0,7 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | - | - | - | |
| <i>(E)-nérolidol</i> | 1547 | 2031 | 6,7 | 2,2 | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>palustrol</i> | 1563 | 1915 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------|------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------|-------------|-------------|------|-------------|------|------|------|------------|------------|-------------|-------------|
| <i>hydrate de cis-sesquisabinène</i> | 1565 | 2075 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,5 | 2,4 |
| oxyde de caryophyllène | 1571 | 1972 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>gleenol*</i> | 1573 | 2025 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-copaèn-4α-ol*</i> | 1575 | 2141 | 1,8 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>hydrate de 7-épi-cis-sesquisabinène</i> | 1579 | 2094 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 25,1 | 44,5 |
| <i>guaïol</i> | 1584 | 2077 | - | - | - | 0,8 | 5,7 | 3,8 | 2,7 | 0,6 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| époxyde d'humulène II | 1593 | 2028 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| lédol | 1595 | 2016 | - | - | 1,5 | 8,7 | 4,5 | 1,1 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>8-épi-γ-eudesmol</i> | 1610 | 2095 | 10,5 | 5,4 | 3,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-acoréol*</i> | 1616 | 2123 | 9,5 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>épi-cédrol</i> | 1616 | 2147 | - | - | 0,2 | 0,3 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 0,5 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>épi-cubéol*</i> | 1618 | 2057 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5α-ol*</i> | 1622 | 2285 | - | - | - | - | - | 0,1 | 0,5 | 1,2 | 2,6 | 3,4 | 3,1 | 3,1 | 1,7 | 0,9 | 0,4 | 0,1 | - |
| <i>Δ-9,10-éremophilèn-11-ol*</i> | 1623 | 2193 | - | - | - | - | - | 1,8 | 2,0 | 1,5 | 1,1 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>γ-eudesmol*</i> | 1630 | 2160 | - | - | - | - | - | 4,9 | 10,6 | 12,2 | 11,2 | 9,7 | 2,5 | 0,7 | 0,1 | - | - | - | - |
| <i>α-eudesmol*</i> | 1630 | 2208 | - | - | - | - | - | 0,3 | 2,3 | 5,5 | 9,3 | 10,9 | 8,8 | 7,0 | 3,1 | 1,0 | 0,5 | 0,1 | - |
| <i>τ-muurolol*</i> | 1633 | 2177 | - | - | - | 1,8 | 5,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>cubéol</i> | 1634 | 2052 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>valérianol*</i> | 1638 | 2205 | - | - | - | - | - | 1,4 | 2,4 | 2,4 | 2,2 | 2,4 | 2,3 | 0,6 | 0,3 | 0,1 | - | - | - |
| <i>β-eudesmol*</i> | 1638 | 2216 | - | - | - | - | - | 2,0 | 5,8 | 10,3 | 17,8 | 21,6 | 18,4 | 16,4 | 8,1 | 3,0 | 1,1 | 1,1 | - |
| <i>α-cadinol*</i> | 1639 | 2220 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,2 | 2,8 | - | - |
| <i>α-sélin-11-èn-4-ol*</i> | 1642 | 2241 | - | - | - | - | - | - | 0,7 | 1,6 | 3,5 | 3,6 | 2,7 | 2,3 | 1,2 | 0,5 | 0,1 | - | - |
| <i>oxyde d'α-bisabolol*</i> | 1645 | 2130 | - | - | 0,2 | 3,7 | 1,6 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>intermédeol*</i> | 1645 | 2222 | - | - | 0,9 | 4,2 | 1,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>β-bisabolol</i> | 1653 | 2145 | 0,6 | 0,3 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>bulnésol*</i> | 1656 | 2202 | - | - | - | - | - | - | 2,6 | 2,8 | 3,2 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-bisabolol</i> | 1666 | 2209 | 17,5 | 27,3 | 16,9 | 3,9 | 0,7 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>épi-α-bisabolol</i> | 1669 | 2212 | 13,6 | 21,1 | 18,2 | 7,9 | 0,6 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>α-cypérone</i> | 1727 | 2335 | 1,2 | 0,5 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>alloévodionol</i> | 1899 | 2786 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total | | | 71,2 | 65,3 | 55,3 | 46,1 | 45,7 | 39,1 | 53,6 | 59,1 | 71,2 | 76,0 | 67,9 | 66,3 | 56,2 | 31,6 | 38,1 | 48,9 | |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ¹³C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms et les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apol et Pol) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement sont en italique.* † : Isomère non déterminé.

Tableau VIII.2 : composés identifiés dans la fraction oxygénée de l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei*.

De plus, 13 autres nouveaux composés oxygénés qui n'étaient pas présents dans nos bibliothèques de spectres, ont été identifiés à partir de nos banques « littérature » : le sesquicinéole, quatre isomères de l'hydrate de sesquisabinène, l' α -acorénol, le gleenol, le β -bisabolol, le 6-épi-shyobunol, le 8-épi- γ -eudesmol, le γ -eudesmol, l'alloévodionol et le 4-épi-cis-dihydroagarofurane. Les données spectrales de ces différentes molécules sont reportées dans le paragraphe 3.

Cependant, malgré le travail d'analyse réalisé, il reste encore un certain nombre de composés oxygénés non identifiés, qui sont pour la plupart des alcools ou des oxydes sesquiterpéniques, mais en très petites quantités. Parmi ceux-ci, sept composés sont présents dans les fractions oxygénées 2.5, 2.6, 2.7, 2.20, 2.21, 2.22, 2.30 et 2.31, à des teneurs variant de 10 à 30%, mais cela ne nous a pas permis de déterminer avec précision leur structure.

3. Identification des constituants de l'huile essentielle de *C. grevei* à partir des données de la littérature.

Dans ce paragraphe, nous avons réuni l'ensemble des 18 composés identifiés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei*, qui n'étaient pas présents dans nos banques de spectres « Arômes » et « Terpènes ». Nous présentons, la structure et l'attribution des déplacements chimiques de chaque molécule identifiée, ainsi que la comparaison des raies de résonance qui ont été observées avec celles de la littérature, lorsqu'elles sont disponibles. De même, une séquence spin-écho a été réalisée pour déterminer la multiplicité des signaux des différents atomes de carbone pour la plupart des composés identifiés.

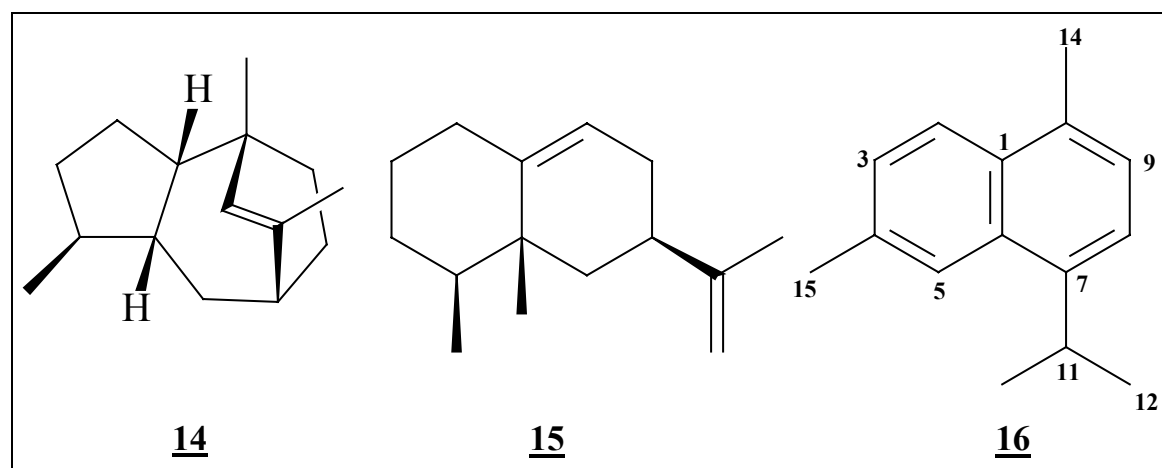
a. Identification des sesquiterpènes hydrocarbonés : rotundène, 4,5-di-épi-aristolochène, trans-calaménène, cadalène et β -curcumène.

L'analyse des fractions oléfiniques par CPG/SM et par RMN du carbone-13 permet l'identification de divers sesquiterpènes hydrocarbonés : rotundène **14** (F1.1 à 1.3), 4,5-di-épi-aristolochène **15** (F1.3 à 1.4), cadalène **16** (F1.14), trans-calaménène

17 (F1.6 à 1.8) et β -curcumène **18** (F1.6 à 1.10). Pour toutes les molécules, on note une très bonne corrélation entre les indices de rétention apolaire et les spectres de masse avec ceux décrits par Joulain et König (20).

Cependant, la recherche des structures des constituants de chaque fraction à partir des différentes bibliothèques informatisées de spectres de masse, du laboratoire (Arômes) ou commerciales (Nist, Wiley), conduit souvent à plusieurs propositions avec des « notes de concordance » très proches. Nous avons donc confirmé sans ambiguïté la structure de ces composés par RMN.

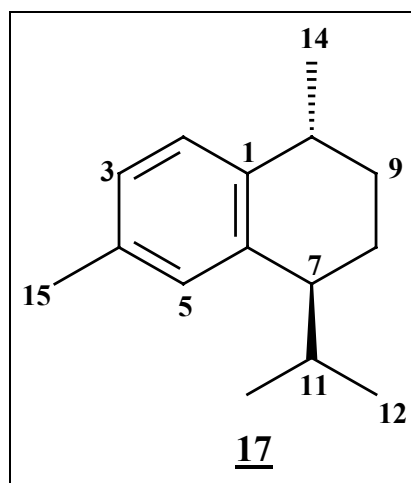
Ainsi, dans les spectres de RMN du carbone-13 des différentes fractions citées ci-dessus, on retrouve les valeurs des déplacements chimiques de chacune des molécules en accord avec celles qui sont décrites dans la littérature : rotundène **14** (20), 4,5-di-épi-aristolochène **15** (20) et cadalène **16** (329) (Figure 28). Pour ce qui est du calaménène **17**, la RMN permet également de préciser la stéréochimie trans des substituants (Figure 29) (20, 330), alors que les spectres de masse des deux isomères sont identiques de même que leurs indices de rétention sur colonne polaire et apolaire (20). Enfin, en ce qui concerne le β -curcumène **18**, les données de la RMN du carbone-13 étaient non seulement absentes de nos bibliothèques « Terpènes » et « Littérature » mais nous n'avons pu les retrouver dans la littérature. Néanmoins, nous avons confirmé la structure de ce composé en réalisant l'attribution des déplacements chimiques à partir de ceux de deux molécules de référence que nous possédions dans nos bibliothèques de spectres : le γ -terpinène et le γ -curcumène. Chacune d'entre-elles présente une partie de squelette commune avec le β -curcumène. La séquence spin-écho réalisée sur la fraction 1.7 a permis de déterminer la multiplicité de chaque atome de carbone. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones du β -curcumène sont données dans la figure 30.



| C | δ (20) | δ 14 (ppm) | δ (20) | δ 15 (ppm) | δ (329) | δ 16 (ppm) |
|----|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | 137,68 | 137,64 | 150,3 | 150,23 | 131,11* | 131,08* |
| 2 | 132,34 | 132,34 | 146,4 | 146,35 | 122,94 | 122,94 |
| 3 | 51,90 | 51,88 | 117,9 | 117,92 | 127,20 | 127,21 |
| 4 | 42,65 | 42,60 | 108,3 | 108,29 | 134,69 | 134,73 |
| 5 | 36,92 | 36,93 | 39,7 | 39,66 | 125,59 | 125,59 |
| 6 | 36,30 | 36,33 | 39,5 | 39,46 | 131,55* | 131,52* |
| 7 | 36,26 | 36,25 | 38,7 | 38,72 | 142,11 | - |
| 8 | 32,43 | 32,42 | 37,7 | 37,72 | 121,41 | 121,42 |
| 9 | 30,84 | 30,84 | 32,3 | 32,31 | 124,81 | 124,81 |
| 10 | 30,23 | 30,25 | 31,6 | 31,51 | 131,82* | 131,85* |
| 11 | 28,87 | 28,97 | 31,5 | 31,41 | 28,24 | 28,21 |
| 12 | 27,59 | 27,60 | 29,3 | 29,27 | 23,64 | 23,65 |
| 13 | 23,69 | 23,67 | 21,1 | 21,09 | 23,64 | 23,65 |
| 14 | 22,48 | 22,51 | 20,8 | 20,77 | 22,04 \blacklozenge | 22,05 \blacklozenge |
| 15 | 15,42 | 15,45 | 15,8 | 15,77 | 19,41 \blacklozenge | 19,45 \blacklozenge |

Les valeurs * et \blacklozenge peuvent être interverties.

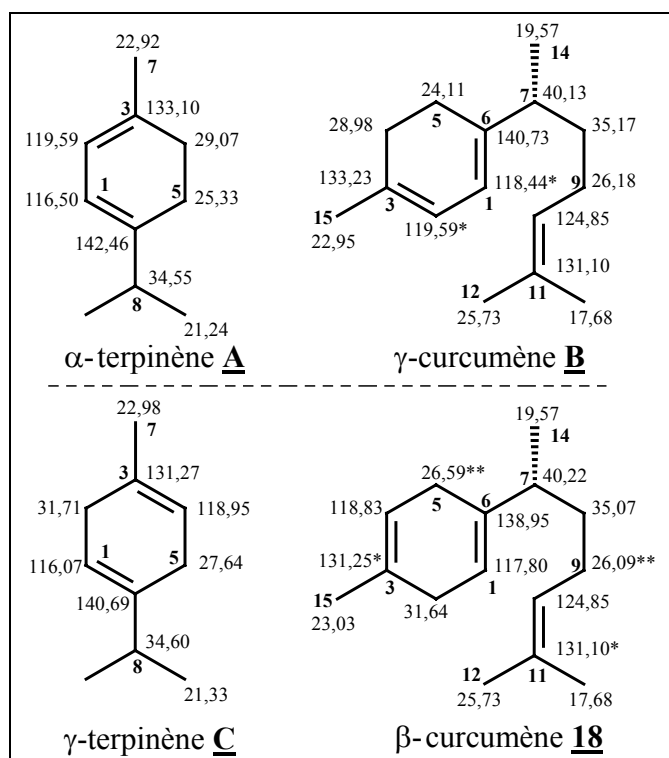
Figure 28 : structures et déplacements chimiques du rotundène **14**, du 4,5-di-épi-aristolochène **15** et du cadalène **16**, mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ **14-16**) et décrits dans la littérature (20, 329).



| C | δ (20) | δ (330) | δ <u>17</u> (ppm) | |
|----|---------------|----------------|--------------------------|---|
| 1 | 139,94 | 139,93 | 139,88 | s |
| 2 | 126,83 | 126,80 | 126,77 | d |
| 3 | 126,24 | 126,21 | 126,17 | d |
| 4 | 134,49 | 134,46 | 134,43 | s |
| 5 | 128,79 | 128,78 | 128,73 | d |
| 6 | 140,11 | 140,00 | 140,04 | s |
| 7 | 43,90 | 43,90 | 43,81 | d |
| 8 | 21,59 | 21,58 | 21,50 | t |
| 9 | 30,92 | 30,63 | 30,85 | t |
| 10 | 32,56 | 35,50 | 32,52 | d |
| 11 | 32,00 | 31,97 | 31,92 | d |
| 12 | 22,38 | 22,33 | 22,32 | q |
| 13 | 21,36* | 21,30* | 21,29* | q |
| 14 | 17,43 | 17,42 | 17,34 | q |
| 15 | 21,36* | 21,13* | 21,14* | q |

Les valeurs * peuvent être interverties.

Figure 29 : structure et déplacements chimiques du trans-calaménène 17, mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ 17) et décrits dans la littérature (20, 330).



| Carbone | δ A (ppm) | δ B (ppm) | δ C (ppm) | δ 18 (ppm) | |
|---------|------------------|---------------------|------------------|----------------------|---|
| 1 | 116,50 | 118,44* | 116,07 | 117,80 | d |
| 2 | 119,59 | 119,59* | 31,71 | 31,64 | t |
| 3 | 133,10 | 133,23 | 131,27 | 131,25* | s |
| 4 | 29,07 | 28,98 | 118,95 | 118,83 | d |
| 5 | 25,33 | 24,11 | 27,64 | 26,59** | t |
| 6 | 142,46 | 140,73 | 140,69 | 138,95 | s |
| 7 | 22,92 | 40,13 | 22,98 | 40,22 | d |
| 8 | 34,55 | 35,17 | 34,60 | 35,07 | t |
| 9 | 21,24 | 26,18 | 21,33 | 26,09** | t |
| 10 | 21,24 | 124,85 [†] | 21,33 | 124,85 [†] | d |
| 11 | | 131,10 [‡] | | 131,10* [‡] | s |
| 12 | | 25,73 [♦] | | 25,73 [♦] | q |
| 13 | | 17,68 [#] | | 17,68 [#] | q |
| 14 | | 19,57 [^] | | 19,57 [^] | q |
| 15 | | 22,95 | | 23,03 | q |

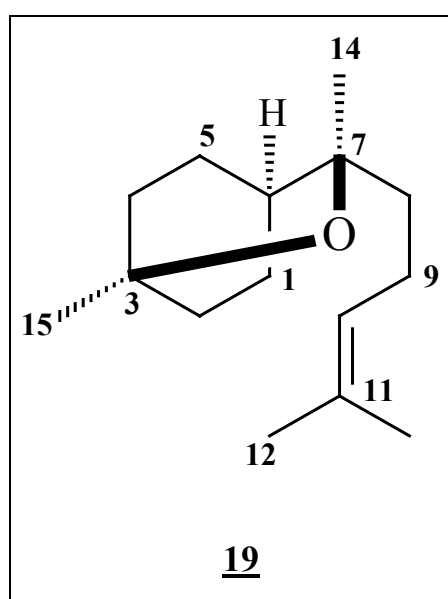
Les valeurs * et ** peuvent être interverties. Carbones superposés : [†], [‡], [♦], [#] et [^].

Figure 30 : structures et déplacements chimiques de l'α-terpinène, du γ-terpinène, du γ-curcumène et du β-curcumène **18**, mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ **18**).

b. Identification des sesquiterpènes oxygénés : sesquicinéole, hydrates du sesquisabinène, α -acorénol, gleenol, β -bisabolol, 6-épi-shyobunol, γ -eudesmol et 8-épi- γ -eudesmol.

◆ Sesquicinéole : le composé majoritaire de la fraction oxygénée 2.3 et 2.4 a été identifié après une analyse par CPG/SM et RMN du carbone-13. Sa structure a été proposée par une bibliothèque de spectres de RMN du carbone-13 (dite « littérature ») constituée au laboratoire. Une séquence spin-écho a également été effectuée. Les déplacements chimiques retrouvés dans l'huile essentielle et appartenant au sesquicinéole (δ **19**) sont en accord avec ceux décrits par Weyerstahl et coll. (331) et sont reportés dans la figure 31.

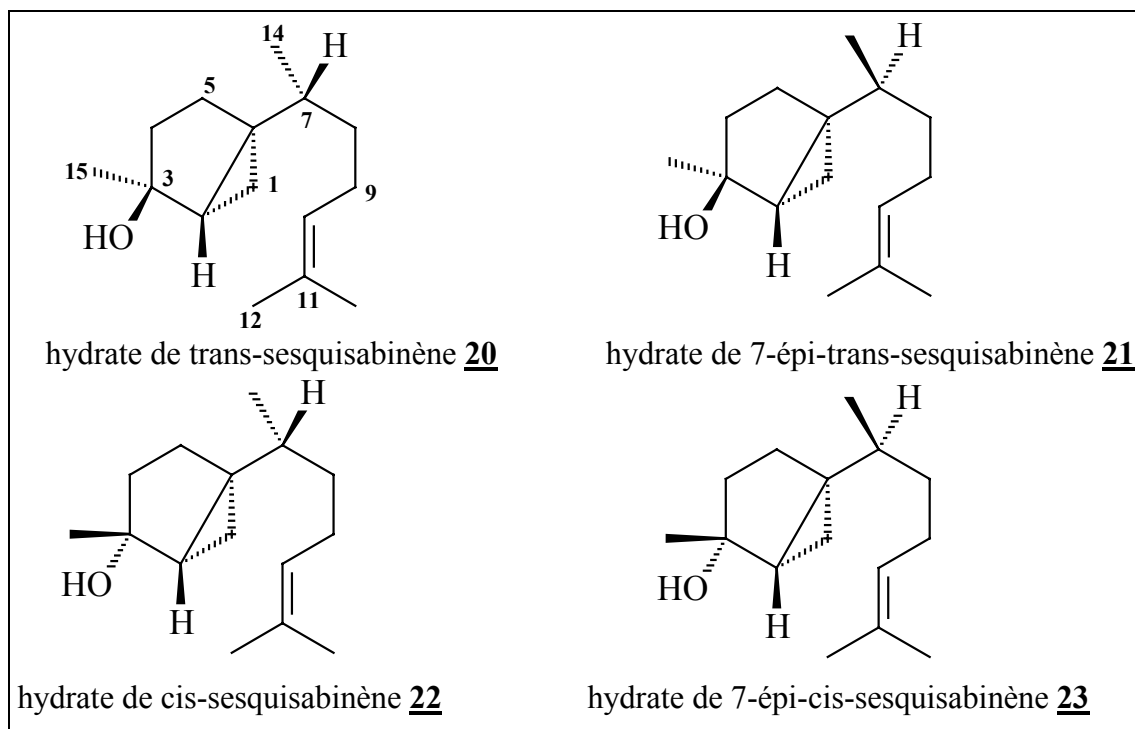
◆ Hydrates de trans-, 7-épi-trans-, cis- et 7-épi-cis-sesquisabinènes : l'étude par CPG/SM des fractions oxygénées 2.19 à 2.25, 2.31 et 2.32, nous conduit à proposer quatre alcools sesquiterpéniques, dont la masse pourrait correspondre à la formule brute $C_{15}H_{26}O$, ayant des spectres de masse presque superposables. Les spectres de RMN du carbone-13 de ces fractions présentent quatre séries de 15 raies de résonance qui appartiendraient à ces quatre composés. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones sont en accord avec celles des quatre isomères de l'hydrate de sesquisabinène (**20-23**), décrites dans la littérature par Weyerstahl et coll. (332) dans l'huile essentielle d'*Hedychium gardnerianum* et présentes dans notre bibliothèque de spectres de RMN construite avec les données de la littérature. Ces molécules sont constituées d'un squelette bicyclo[3.1.0]hexanique. Nous notons la présence dans les spectres de ces molécules du signal d'un carbone méthylénique qui résonne entre 11,32 et 15,44 ppm et qui est en général caractéristique d'un carbone cyclopropanique (Figure 32). On peut noter également que six carbones appartenant à l'hydrate de cis-sesquisabinène sont superposés avec certains carbones appartenant à son épimère en C-7, mais ceci ne gêne en rien l'identification.



| C | δ (331) | δ 19 (ppm) | |
|----|-------------------|--------------------------|---|
| 1 | 22,8 [♦] | 22,72 [♦] | t |
| 2 | 31,9* | 31,82* | t |
| 3 | 69,5 | 69,47 | s |
| 4 | 31,8* | 31,66* | t |
| 5 | 22,6 [♦] | 22,55 [♦] | t |
| 6 | 30,5 | 30,31 | d |
| 7 | 75,3 | 75,59 | s |
| 8 | 41,9 | 41,89 | t |
| 9 | 23,5 | 23,50 | t |
| 10 | 124,9 | 124,73 | d |
| 11 | 131,2 | 131,19 | s |
| 12 | 25,7 | 25,74 [#] | q |
| 13 | 17,6 | 17,60 | q |
| 14 | 25,7 | 25,68 [#] | q |
| 15 | 27,6 | 27,62 | q |

Les valeurs *, [♦] et [#] peuvent être interverties

Figure 31 : structure et déplacements chimiques du sesquicinéole **19**, mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ **19**) et décrits dans la littérature (331).



| C | δ (332) | δ 20 | δ (332) | δ 21 | δ (332) | δ 22 | δ (332) | δ 23 | |
|----|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|---|
| 1 | 13,6 | 13,51 | 15,5 | 15,44 | 11,4 | 11,32 | 13,2 | 13,22 | t |
| 2 | 34,8 | 34,85 [†] | 33,9 | 33,95 | 34,0 | 34,07 | 32,9 | 33,06 | d |
| 3 | 80,6 | 80,58 | 80,5 | 80,48 | 79,5 | 79,37 [♦] | 79,3 | 79,37 [♦] | s |
| 4 | 34,8 | 34,85 [†] | 35,4 | 35,43 | 34,4 | 34,48 | 34,8 | 34,93 | t |
| 5 | 25,8 | 25,93 | 24,8 | 24,85 | 25,9 | 26,03 | 24,5 | 24,59 | t |
| 6 | 34,3 | 34,34 | 33,8 | 33,80 | 33,3 | 33,39 | 32,3 | 32,38 | s |
| 7 | 37,3 | 37,28 | 37,5 | 37,49 | 37,7 | 37,67 | 37,8 | 37,85 | d |
| 8 | 36,5 | 36,49 | 36,6 | 36,59 | 36,2 | 36,08 [#] | 35,9 | 36,08 [#] | t |
| 9 | 26,1 | 26,06 | 26,2 | 26,26 | 26,2 | 26,21 [▲] | 26,1 | 26,21 [▲] | t |
| 10 | 124,9 | 124,83 | 124,9 | 124,95 | 124,9 | 124,90 [*] | 124,8 | 124,90 [*] | d |
| 11 | 131,2 | 131,29 | 131,1 | 131,03 | 131,4 | 131,34 | 131,1 | 131,16 | s |
| 12 | 25,7 | 25,72 | 25,7 | 25,71 | 25,8 | 25,73 [¶] | 25,6 | 25,73 [¶] | q |
| 13 | 17,7 | 17,67 [‡] | 17,8 | 17,82 [*] | 17,8 | 17,69 ^{*\$} | 17,6 | 17,69 ^{*\$} | q |
| 14 | 17,7 | 17,67 [‡] | 17,7 | 17,66 [*] | 17,2 | 17,13 [*] | 17,3 | 17,39 [*] | q |
| 15 | 25,2 | 25,21 | 24,9 | 25,03 | 28,1 | 28,08 | 27,9 | 27,96 | q |

Les valeurs * peuvent être interverties. Carbones superposés : [†], [‡], [♦], [#], [▲], ^{*}, [¶] et ^{\$}.

Figure 32 : structures et déplacements chimiques des isomères de l'hydrate de sesquisabinène (**20-23**) mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ **20-23**) et décrits dans la littérature (332).

♦ α -AcorénoL, gleenol et β -bisabolol : l'analyse par CPG/SM des fractions oxygénées 2.12 à 2.17 nous permet d'identifier trois nouveaux alcools sesquiterpéniques. Pour chacun des composés, plusieurs structures nous ont été proposées à partir des différentes bibliothèques commerciales en spectrométrie de masse parmi lesquelles : l' α -acorénoL **24** (fractions 2.15 à 2.17), le gleenol **25** (fractions 2.12 à 2.14) et le β -bisabolol **26** (fractions 2.14 à 2.16). Les spectres de RMN du carbone-13 de ces différentes fractions nous ont permis de confirmer chacune de ces structures. Ainsi, le logiciel d'aide à l'identification, en recherchant dans la bibliothèque de spectres de la littérature, met en évidence dans les différentes fractions, les déplacements chimiques conformes à ceux :

- de l' α -acorénoL, appartenant à la famille des « acoranes » (squelette spiro[4.5]décane), décrits dans la littérature par Fang et coll. (333) dans l'extrait au solvant du bois de *Juniperus chinensis* (Figure 33) ;
- du gleenol (même squelette), décrits par Weyerstahl et coll. (334) dans l'huile essentielle de Vétiver (Figure 33) ;
- du β -bisabolol, décrits par Elzen et coll. (335) (Figure 34).

♦ 6-épi-Shyobunol (éléma-1,3-dièn-6 α -ol), γ -eudesmol et 8-épi- γ -eudesmol : la RMN du carbone-13 a également permis l'identification, à partir des banques de spectre « littérature », de trois alcools sesquiterpéniques pour lesquels aucune proposition n'était faite par CPG/SM :

- le 6-épi-shyobunol ou éléma-1,3-dièn-6 α -ol (fractions oxygénées 2.8 et 2.9) possédant le squelette de l'élémane ;
- le 8-épi- γ -eudesmol (fractions oxygénées 2.16 à 2.19) et le γ -eudesmol (fractions oxygénées 2.23, 2.24 et 2.26), possédant tous deux le squelette de l'eudesmane (squelette bicyclo[4.4.0]décanique).

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones que nous obtenons (Figure 35) sont conformes avec celles publiées par Weyerstahl et coll. (336) pour le 6-épi-shyobunol **27** isolé de l'huile essentielle de Vétiver haïtien, par Su et coll. (337) pour le 8-épi- γ -eudesmol **28** dans l'extrait au solvant des feuilles de *Cryptomeria*

japonica et par Raharivelomanana et coll. (338) pour le γ -eudesmol **29**. On peut remarquer également que les deux dernières molécules possèdent des spectres de masse quasiment superposables, dans la mesure où elles possèdent la même structure. Elles ne peuvent donc être différenciées que par leur spectre de RMN du carbone-13 ou leurs indices de rétention.

| C | δ (333) | δ 24 | | δ (334) | δ 25 |
|----|----------------|--------------------|---|----------------|--------------------------------------|
| 1 | 135,0 | 135,07 | s | 58,8 | 58,88 |
| 2 | 121,2 | 121,27 | d | 33,9 | 34,02 ^{Ω} |
| 3 | 73,7 | 73,76 | s | 36,3 | 36,32 |
| 4 | 54,7 | 54,81 | d | 142,6 | 142,72 |
| 5 | 45,0 | 45,07 | s | 125,4 | 125,58 |
| 6 | 41,6 | 41,72 | d | 76,4 | 76,41 |
| 7 | 31,4 | 31,46 | q | 45,3 | 45,36 |
| 8 | 30,6 | 30,73 | t | 24,4 | 24,41 |
| 9 | 30,1 | 30,20 | t | 31,7 | 31,74 |
| 10 | 29,1 | 29,17 | t | 34,0 | 34,02 ^{Ω} |
| 11 | 28,0 | 28,02 | q | 29,3 | 29,29 |
| 12 | 28,0 | 27,99 | t | 20,7* | 20,76* |
| 13 | 26,0 | 26,07 | t | 21,2* | 21,23* |
| 14 | 23,2 | 23,30 | q | 16,2 | 16,27 |
| 15 | 14,9 | 15,01 | q | 16,9 | 17,01 |

Les valeurs * peuvent être interverties. Carbones superposés : ^{Ω} .

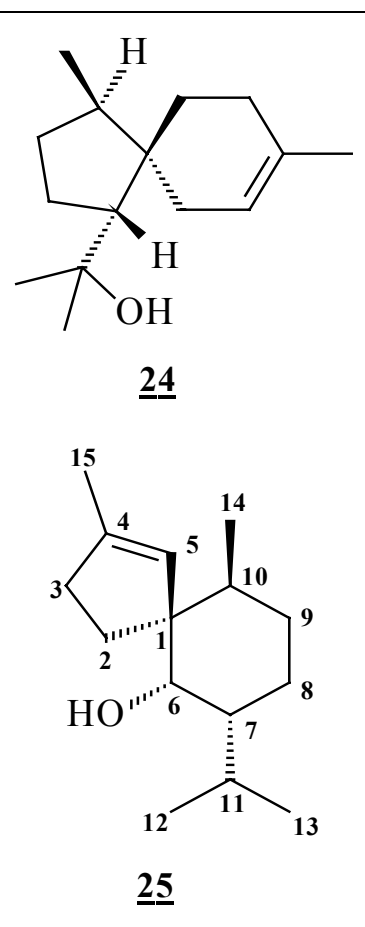
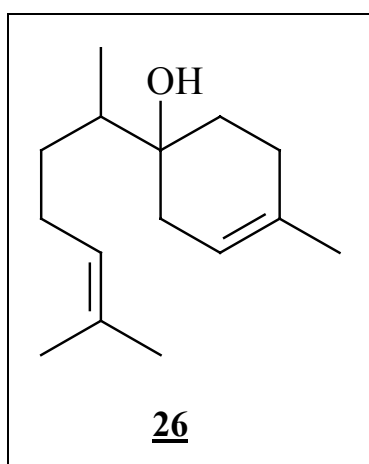
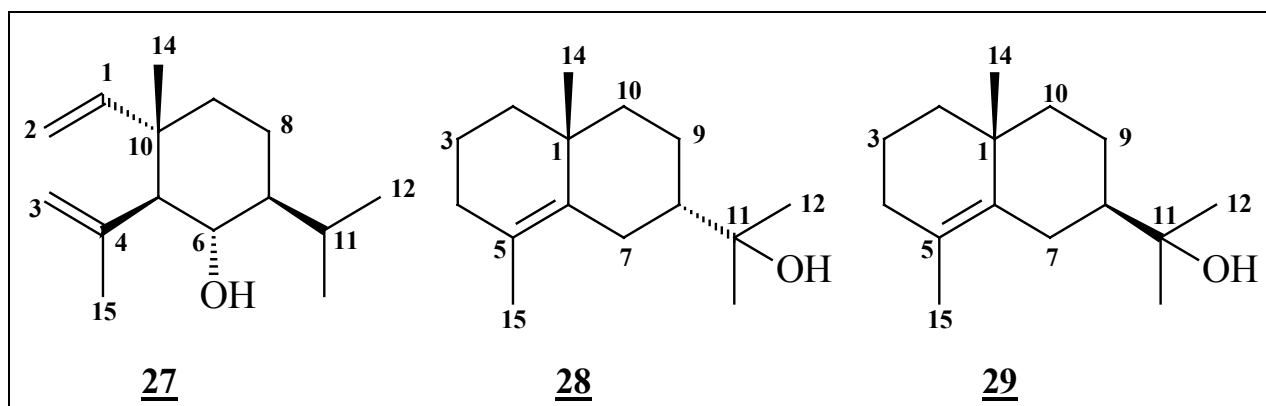


Figure 33 : structures et déplacements chimiques de l' α -acorénol **24** et du gleenol **25**, mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ **24** et δ **25**) et décrits dans la littérature (333, 334).



| C | δ (335) | δ 26 | |
|----|----------------|--------------------|---|
| 1 | 133,8 | 133,84 | s |
| 2 | 131,1 | 131,33 | s |
| 3 | 124,7 | 124,77 | d |
| 4 | 118,4 | 118,48 | d |
| 5 | 72,0 | 72,09 | s |
| 6 | 41,9 | 41,80 | d |
| 7 | 34,3 | 34,84 | t |
| 8 | 30,9 | 30,94 | t |
| 9 | 30,9 | 30,73 | t |
| 10 | 27,0 | 27,05 | t |
| 11 | 26,5 | 26,54 | t |
| 12 | 25,5 | 25,72 | q |
| 13 | 23,1 | 23,30 | q |
| 14 | 17,5 | 17,69 | q |
| 15 | 13,5 | 13,55 | q |

Figure 34 : structure et déplacements chimiques du β -bisabolol **26**, mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ **26**) et décrits dans la littérature (335).



| C | δ (336) | δ 27 (ppm) | | δ (337) | δ 28 (ppm) | | δ (338) | δ 29 (ppm) | |
|----|----------------|--------------------------|---|----------------|--------------------------|---|----------------|--------------------------|---|
| 1 | 149,1 | 149,15 | d | 34,4 | 34,43 | s | 34,51 | 34,48 | s |
| 2 | 110,2 | 110,19 | t | 39,4 | 39,45 | t | 42,32 | 42,28 | t |
| 3 | 113,8 | 113,85 | t | 18,9 | 18,93 | t | 19,19 | 19,15 | t |
| 4 | 144,9 | 144,87 | s | 32,7 | 32,72 | t | 33,22 | 33,18 | t |
| 5 | 60,8 | 60,89 | d | 126,0 | 125,89 | s | 124,48 | 124,47 | s |
| 6 | 69,5 | 69,53 | d | 135,0 | 134,99 | s | 134,92 | 134,88 | s |
| 7 | 49,4 | 49,48 | d | 25,4 | 25,38 | t | 26,42 | 26,38 | t |
| 8 | 19,1 | 19,11 | t | 44,1 | 44,12 | d | 50,56 | 50,52 | d |
| 9 | 39,0 | 39,02 | t | 22,6 | 22,59 | t | 23,33 | 23,29 | t |
| 10 | 41,0 | 41,05 | s | 38,1 | 38,12 | t | 40,28 | 40,24 | t |
| 11 | 26,2 | 26,22 | d | 74,6 | 74,55 | s | 72,88 | 72,92 | s |
| 12 | 16,2* | 16,25* | q | 27,8* | 27,85* | q | 27,16* | 27,20* | q |
| 13 | 21,0* | 21,00* | q | 29,8* | 29,81* | q | 26,85* | 26,95* | q |
| 14 | 17,6 | 17,69 | q | 25,9 | 25,93 | q | 24,67 | 24,63 | q |
| 15 | 26,2 | 26,22 | q | 19,6 | 19,64 | q | 19,28 | 19,25 | q |

Les valeurs * peuvent être interverties.

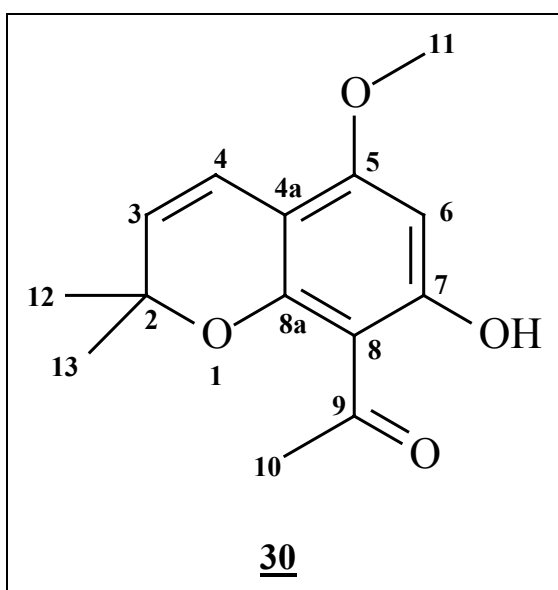
Figure 35 : structures et déplacements chimiques du 6-épi-shyobunol (éléma-1,3-diène-6 α -ol) **27**, du 8-épi- γ -eudesmol **28** et du γ -eudesmol **29**, mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ **27-29**) et décrits dans la littérature (336-338).

c. Identification de l'alloévodionol.

L'analyse des fractions oxygénées 2.8 et 2.9 en CPG/SM et en RMN du carbone-13 a conduit à l'identification de l'alloévodionol **30** (8-acétyl-7-hydroxy-5-méthoxy-2,2-diméthylchromène). Cette molécule nous a été proposée par une bibliothèque commerciale en spectrométrie de masse. Ce composé avait été identifié par Schulte et coll. (324) dans l'extrait d'écorces de *Cedrelopsis grevei* et par Kamperdick et coll. (339) dans l'extrait de feuilles de *Melicope ptelefolia*. Les déplacements chimiques des carbones sont reportés dans la figure 36.

d. Identification du 4-épi-cis-dihydroagarofurane.

L'analyse des fractions oxygénées 2.1 et 2.2 par CPG/IK et CPG/SM, laisse apparaître un composé majoritaire dont la masse pourrait correspondre à la formule brute $C_{15}H_{26}O$. C'est la structure du dihydroagarofurane qui nous a été proposée, à la fois par notre bibliothèque laboratoire (Arômes) et par nos bibliothèques commerciales. Nous pouvons remarquer que le spectre de masse du trans-dihydroagarofurane que nous possédons dans nos bibliothèques laboratoires, se superpose avec celui de notre composé et leurs indices de rétention sont également très proches. L'étude des fragmentations (Figure 37) se révèle assez complexe, avec la perte d'un des deux méthyles géminés aboutissant à la formation de l'ion à m/z 207 ($[C_{14}H_{23}O]^+$, pic de base), suivie de la perte d'une molécule d'eau après un double réarrangement d'hydrogène (r2H), entraînant ainsi la formation de l'ion à m/z 189 ($[C_{14}H_{21}]^+$). Les clivages α , initiés par le site radicalaire (coupure homolytique) et les clivages inductifs i , initiés par la charge (coupure hétérolytique), permettent d'expliquer la formation d'autres ions moins abondants.



| C | δ (339) | δ <u>30</u> (ppm) | |
|----|----------------|---------------------------------|---|
| 2 | 77,9 | 77,88 | s |
| 3 | 124,6 | 124,49 | d |
| 4 | 116,5 | 116,56 | d |
| 4a | 102,8 | 102,74 | s |
| 5 | 161,0 | 160,96 | s |
| 6 | 92,3 | 92,25 | d |
| 7 | 166,4 | 166,42 | s |
| 8 | 106,0 | 105,91 | s |
| 8a | 156,2 | 156,17 | s |
| 9 | 203,3 | 203,15 | s |
| 10 | 33,1 | 33,07 | q |
| 11 | 55,7 | 55,70 | q |
| 12 | 27,8 | 27,81 | q |
| 13 | 27,8 | 27,81 | q |

Figure 36 : structure et déplacements chimiques de l'alloévodionol **30**, mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ **30**) et décrits dans la littérature (339).

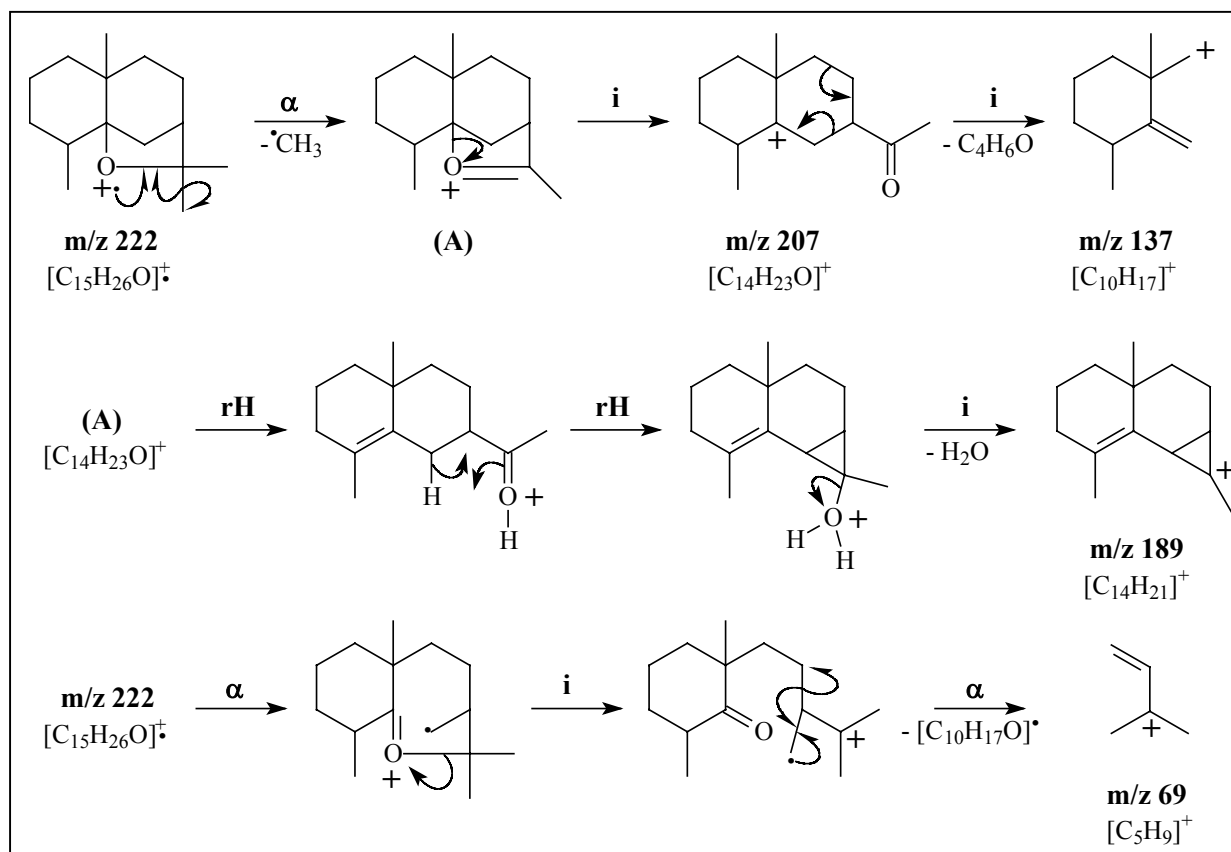
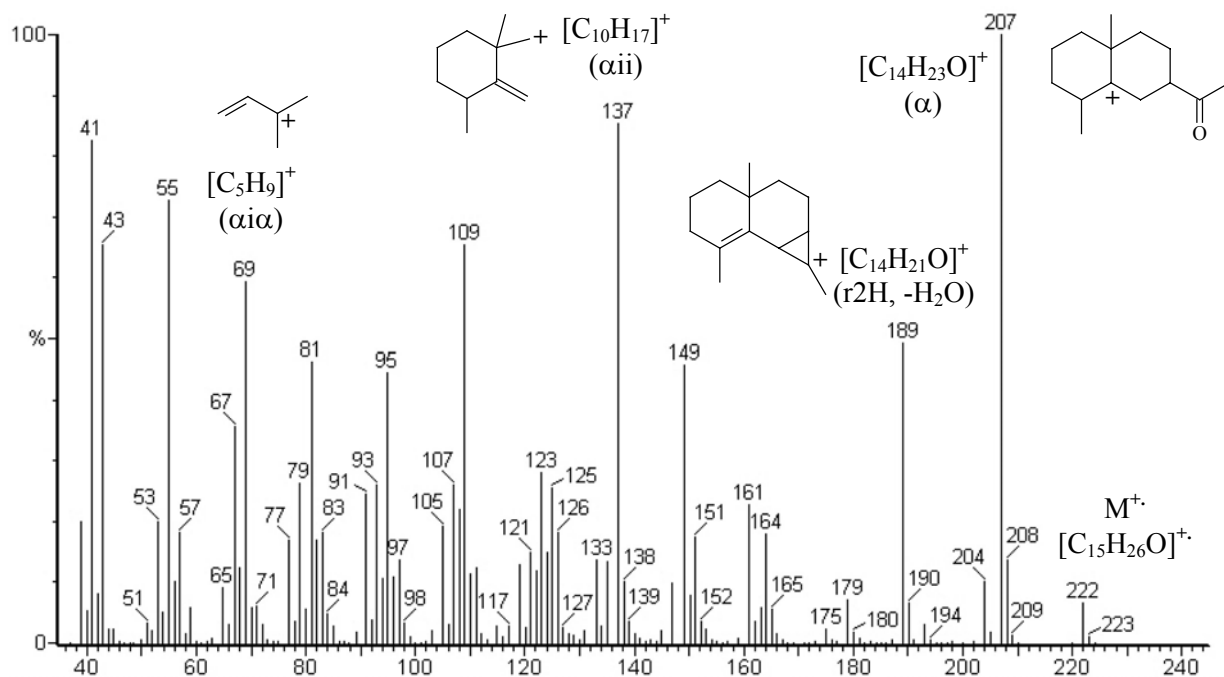


Figure 37 : spectre de masse et fragmentation du dihydroagarofurane.

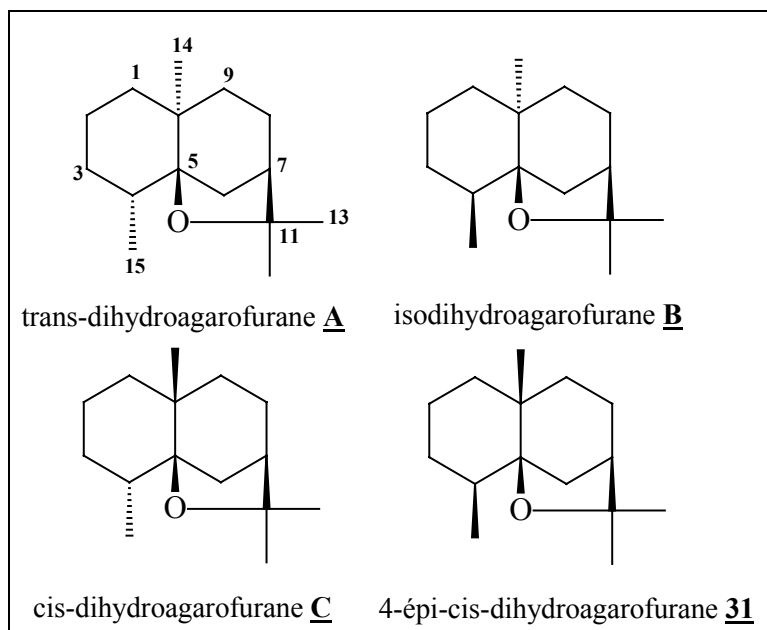
La structure du dihydroagarofurane, proposé par la SM, doit être vérifiée en RMN du carbone-13. Nous nous sommes donc intéressés à un certain nombre de

molécules, déjà présentes dans nos bibliothèques de spectres ou décrites dans la littérature, qui seraient susceptibles de correspondre à notre composé :

- le trans-dihydroagarofurane (déjà présent dans nos banques de spectres) et décrit en RMN du carbone-13 par Itokawa et coll. (340) dans l'huile essentielle d'*Alpinia japonica* ;
- l'isodihydroagarofurane (épimère en C-4 du trans-dihydroagarofurane) décrit par Thomas et coll. (341) ;
- le cis-dihydroagarofurane identifié par Southwell et coll. (342) dans l'huile essentielle de *Prostanthera*.

Cependant, après comparaison des déplacements chimiques de chacune des molécules précédemment citées avec ceux retrouvés dans l'huile essentielle (δ **31**) (Figure 38), nous constatons qu'aucun de ces composés ne correspond à notre constituant. Une séquence spin-écho a également été réalisée pour déterminer la multiplicité des différents atomes de carbone de la molécule. Elle est en accord avec la structure d'un dihydroagarofurane. Il semble que nous soyons bien en présence d'un isomère du dihydroagarofurane en l'occurrence le 4-épi-cis-dihydroagarofurane **31**, qui à notre connaissance n'est pas décrit dans la littérature. Notre proposition de structure est basée principalement sur la comparaison des spectres de RMN du carbone-13 des quatre isomères, le spectre du proton (enregistré à 200 MHz) ne donnant pas d'informations exploitables si ce n'est qu'il confirme la présence de quatre méthyles (trois singulets et un doublet).

Les quatre isomères du dihydroagarofurane, représentés dans l'espace (Figure 39), mettent en évidence l'existence de divers effets γ selon l'isomère considéré, en accord avec la structure proposée. Ces effets γ sont particulièrement perceptibles et informatifs quand on compare le cis-dihydroagarofurane et notre molécule. Toutefois, il serait souhaitable de pouvoir purifier un peu plus notre composé (actuellement 75% dans la fraction 2.1) afin de confirmer sa structure par une caractérisation structurale complète (RMN bidimensionnelle).



| C | δ A (340) | δ B (341) | δ C (342) | δ 31 (ppm) | |
|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| 1 | 37,6 | 36,1 | 36,7 | 36,21 | t |
| 2 | 17,0 | 21,4 | 21,6 | 17,77 | t |
| 3 | 29,5 | 32,2 | 33,2 | 30,52 | t |
| 4 | 40,5 | 32,2 | 32,6 | 43,12 | d |
| 5 | 87,8 | 87,3 | 88,5 | 86,93 | s |
| 6 | 38,4 | 38,1 | 30,7 | 42,24 | t |
| 7 | 44,6 | 43,8 | 43,0 | 43,42 | d |
| 8 | 25,1 | 25,1 | 25,9 | 25,82 | t |
| 9 | 38,1 | 38,1 | 35,3 | 37,09 | t |
| 10 | 38,4 | 38,6 | 39,7 | 39,69 | s |
| 11 | 81,2 | 81,0 | 81,2 | 81,55 | s |
| 12 | 30,6 | 30,2 | 30,1 | 31,29 | q |
| 13 | 23,6 | 23,5 | 23,1 | 25,21 | q |
| 14 | 22,9 | 23,0 | 22,5 | 23,32 | q |
| 15 | 17,7 | 15,7 | 15,0 | 16,85 | q |

Figure 38 : structures et déplacements chimiques du trans-, du cis- et de l'isodihydroagarofurane décrits dans la littérature (340-342). Déplacements chimiques du 4-épi-cis-dihydroagarofurane **31** mesurés dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* (δ **31**).

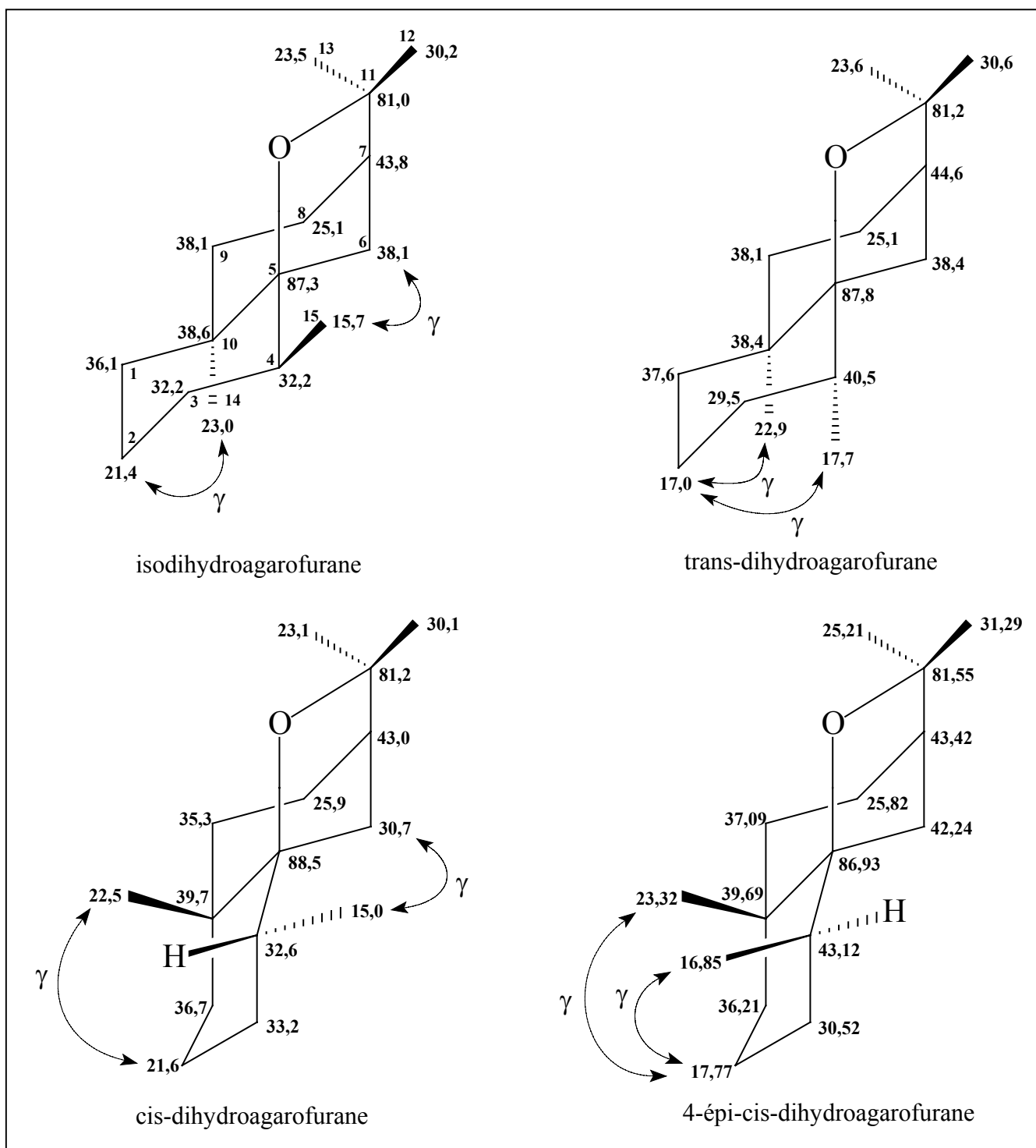


Figure 39 : structures et déplacements chimiques du trans-, du cis- et de l'isodihydroagarofurane décrits dans la littérature (340-342). Déplacements chimiques du 4-épi-cis-dihydroagarofurane **31** mesurés dans l'huile essentielle de *C. grevei*.

4. Bilan de l'analyse détaillée de l'huile essentielle A de *C. grevei*.

L'analyse détaillée de l'huile essentielle A d'écorce de *C. grevei*, par combinaison des techniques chromatographiques, la CPG/IK et la chromatographie sur colonne ouverte de silice et des techniques spectrométriques, la spectrométrie de masse et la RMN du carbone-13, a conduit à l'identification de 115 constituants qui représentent 84,3% de la composition chimique globale (Tableau IX). Parmi ceux-ci, nous avons identifié 18 composés, essentiellement sesquiterpéniques, qui n'étaient pas présents dans nos bibliothèques de spectres.

Nous remarquons d'une part, que la fraction hydrocarbonée représente environ 70% de la composition chimique globale, et d'autre part, que l'huile essentielle est très riche en composés sesquiterpéniques hydrocarbonés et oxygénés. Les principaux constituants majoritaires qui caractérisent l'échantillon A sont : le (E)-caryophyllène (9,3%), l' α -copaène (7,7%), l' α -sélinène (5,8%), le δ -cadinène (4,9%), le β -sélinène (4,5%), l' α -humulène (3,3%) et le β -bisabolène (2,8%).

Parmi ces sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés identifiés, certains possèdent un squelette linéaire (farnésane) : comme le (E)- β -farnésène (0,7%) et le (E,E)- α -farnésène (trace) ou un squelette cyclique (bisabolane, élémène et humulane) : comme l' α et le γ -curcumène (2,3% et 1,8%), le β -bisabolène (2,8%), le β -bisabolol (1,3%), l' α -bisabolol (0,5%), le β -élémène (1,7%), l'élémol (1,3%) et l' α -humulène (3,3%). Les sesquiterpènes bicycliques possédant le squelette bicyclo[4.4.0]décanique, sont largement majoritaires dans l'huile essentielle. On retrouve principalement trois groupes :

- les eudesmanes, qui sont représentés par l' α et le β -sélinène (5,8% et 4,5%), l' α , le β et le γ -eudesmol (1,0%, 0,9% et 0,5%), etc... ;
- les cadinanes, représentés par le δ et le γ -cadinène (4,9% et 1,0%) et l' α -cadinol (trace) ;

- les muurolanes, avec l' α et le γ -muurolène (1,5% et 2,3%) ou encore le τ -muurolol (0,1%).

Les deux derniers groupes, appartenant à la famille des « cadinanes », se distinguent en fonction de la stéréochimie de la jonction des cycles et de la position axiale ou équatoriale du groupement isopropyle.

On retrouve également d'autres sesquiterpènes bicycliques (caryophyllane) possédant le squelette bicyclo[7.2.0]undécannique comme le (E)-caryophyllène (9,3%) qui est le composé majoritaire de l'huile essentielle, ainsi que le caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5 α -ol (0,2%).

Enfin, on distingue les sesquiterpènes tricycliques possédant le squelette tricyclo[4.4.0.0^{2,7}]décannique (copaane) tels l' α -copaène (7,7%), le β -copaène (0,2%) ou le β -copaèn-4 α -ol (trace), ainsi qu'un sesquiterpène polycyclique, l'ishwarane (1,5%).

B. COMPOSITION CHIMIQUE DES CINQ AUTRES ECHANTILLONS (B-F) DE *CEDRELOPSIS GREVEI*.

L'étude détaillée de l'huile essentielle A de *Cedrelopsis grevei*, nous a permis de la caractériser et nous a servi de base pour l'analyse directe de cinq autres échantillons qui n'ont pas été soumis à un fractionnement par chromatographie sur colonne. Ainsi, l'étude par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 des huiles essentielles B à F, nous a permis d'identifier dans chacune d'elles de 45 à 52 composés (67 composés au total) représentant de 72,4% à 82,8% de leur composition chimique globale. Les résultats de l'analyse sont décrits dans le tableau X.

| Composés | IK | | A |
|-------------------------------|----------|---------|------------|
| | Apolaire | Polaire | |
| <i>α-thujène</i> | 924 | 1025 | tr |
| <i>α-pinène</i> | 931 | 1025 | 1,4 |
| <i>α-fenchène</i> | 943 | 1054 | tr |
| <i>camphène</i> | 945 | 1063 | tr |
| 6-méthylhept-5-èn-2-one | 961 | 1337 | 0,1 |
| <i>sabinène</i> | 966 | 1118 | tr |
| <i>β-pinène</i> | 971 | 1112 | 2,2 |
| myrcène | 981 | 1159 | 0,3 |
| <i>δ-3-carène</i> | 1006 | 1148 | 0,8 |
| <i>α-terpinène</i> | 1010 | 1175 | tr |
| <i>m-cymène</i> | 1010 | 1258 | tr |
| <i>p-cymène</i> | 1012 | 1267 | 0,2 |
| limonène* | 1022 | 1200 | 0,6 |
| <i>β-phellandrène</i> | 1022 | 1204 | tr |
| (Z)- <i>β-ocimène</i> | 1026 | 1230 | 0,1 |
| (E)- <i>β-ocimène</i> | 1037 | 1247 | 0,4 |
| <i>γ-terpinène</i> | 1049 | 1237 | tr |
| <i>terpinolène</i> | 1079 | 1276 | tr |
| <i>linalol</i> | 1084 | 1535 | 0,1 |
| fenchol | 1100 | 1581 | 0,1 |
| <i>nopinone</i> | 1110 | 1565 | 0,1 |
| <i>camphre</i> | 1123 | 1507 | tr |
| trans-pinocarvéol | 1124 | 1643 | 0,3 |
| <i>cis-verbèneol</i> | 1130 | 1663 | tr |
| <i>pinocarvone</i> | 1140 | 1557 | tr |
| bornéol | 1150 | 1687 | 0,4 |
| <i>p-cymèn-8-ol</i> | 1157 | 1825 | 0,1 |
| <i>terpinèn-4-ol</i> | 1162 | 1588 | 0,1 |
| myrténal | 1170 | 1574 | 0,1 |
| <i>α-terpinéol</i> | 1172 | 1699 | 0,1 |
| <i>estragole</i> | 1176 | 1657 | 0,1 |
| myrténol | 1179 | 1775 | 0,1 |
| <i>acétate de fenchyle</i> | 1208 | 1464 | tr |
| <i>carvone</i> | 1217 | 1717 | tr |
| <i>géraniol</i> | 1235 | 1831 | tr |
| <i>acétate de bornyle</i> | 1271 | 1573 | tr |
| <i>alcool perrillyque</i> | 1278 | 1988 | tr |
| <i>acétate de pinocarvyle</i> | 1281 | 1638 | tr |
| <i>acétate de myrtényle</i> | 1307 | 1677 | tr |
| <i>acétate d'α-terpinyle</i> | 1333 | 1685 | tr |
| <i>δ-élémente</i> | 1334 | 1462 | 0,2 |

| | | | |
|--|------|------|------------|
| α -cubébène | 1348 | 1450 | 0,2 |
| cyclosativène | 1369 | 1473 | 1,1 |
| α -copaène | 1377 | 1487 | 7,7 |
| β -élémente | 1387 | 1585 | 1,7 |
| <i>sativène</i> | 1396 | 1527 | 0,1 |
| cypérène* | 1401 | 1520 | 0,6 |
| α -gurjunène | 1410 | 1523 | 0,1 |
| α -cédrène | 1414 | 1562 | 0,1 |
| (E)-caryophyllène | 1419 | 1604 | 9,3 |
| β -copaène | 1427 | 1581 | 0,2 |
| trans- α -bergamotène | 1432 | 1576 | 0,3 |
| (E)- β -farnésène | 1447 | 1656 | 0,7 |
| α -humulène | 1451 | 1658 | 3,3 |
| <i>rotundène</i> | 1460 | 1629 | 1,5 |
| alloaromadendrène | 1461 | 1637 | 0,6 |
| ishwarane | 1463 | 1636 | 1,5 |
| <i>4,5-di-épi-aristolochène</i> | 1467 | 1665 | 1,6 |
| γ -muurolène* | 1471 | 1677 | 2,3 |
| α -curcumène* | 1471 | 1764 | 2,3 |
| γ -curcumène* | 1473 | 1680 | 1,8 |
| β -sélinène | 1483 | 1709 | 4,5 |
| <i>4-épi-cis-dihydroagarofurane</i> | 1487 | 1712 | 1,5 |
| α -sélinène | 1493 | 1716 | 5,8 |
| α -muurolène | 1494 | 1715 | 1,5 |
| <i>(E,E)-α-farnésène</i> | 1496 | 1742 | tr |
| β -bisabolène | 1502 | 1717 | 2,8 |
| <i>β-curcumène + sesquicinéole*</i> | 1503 | 1733 | 2,4 |
| <i>6-épi-shyobunol</i> | 1505 | 1881 | 0,1 |
| γ -cadinène | 1507 | 1747 | 1,0 |
| <i>(Z)-γ-bisabolène</i> | 1509 | 1744 | 0,2 |
| <i>trans-calaménène</i> | 1510 | 1826 | 0,6 |
| δ -cadinène | 1516 | 1745 | 4,9 |
| <i>β-sesquiphellandrène</i> | 1518 | 1758 | 0,3 |
| <i>α-calacorène</i> | 1528 | 1895 | 0,4 |
| <i>hydrate de trans-sesquisabinène</i> | 1530 | 1980 | tr |
| <i>(E)-α-bisabolène</i> | 1533 | 1763 | 0,2 |
| élémol | 1534 | 2077 | 1,3 |
| <i>α-agarofurane</i> | 1535 | 1878 | tr |
| <i>hydrate de 7-épi-trans-sesquisabinène*</i> | 1543 | 1991 | 0,9 |
| <i>(E)-nérolidol</i> | 1547 | 2031 | 0,2 |
| <i>β-calacorène</i> | 1548 | 1939 | tr |
| <i>palustrol</i> | 1563 | 1915 | 0,1 |

| | | | |
|--|------|------|------------|
| <i>hydrate de cis-sesquisabinène</i> | 1565 | 2075 | <i>tr</i> |
| oxyde de caryophyllène* | 1570 | 1978 | 2,0 |
| <i>gleenol*</i> | 1573 | 2025 | 0,1 |
| <i>β-copaèn-4α-ol</i> | 1575 | 2141 | <i>tr</i> |
| <i>hydrate de 7-épi-cis-sesquisabinène</i> | 1579 | 2094 | 0,4 |
| <i>guaïol</i> | 1584 | 2077 | 0,2 |
| époxyde d'humulène II | 1593 | 2035 | 0,8 |
| lédol | 1597 | 2016 | 0,1 |
| <i>8-épi-γ-eudesmol</i> | 1610 | 2095 | 0,2 |
| <i>α-acorénol*</i> | 1616 | 2123 | 0,5 |
| <i>épi-cédrol</i> | 1616 | 2147 | <i>tr</i> |
| <i>épi-cubénol*</i> | 1618 | 2057 | 0,3 |
| <i>caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5α-ol*</i> | 1622 | 2285 | 0,2 |
| <i>Δ-9,10-éremophilèn-11-ol*</i> | 1623 | 2193 | 0,1 |
| <i>γ-eudesmol*</i> | 1630 | 2160 | 0,5 |
| <i>α-eudesmol*</i> | 1630 | 2208 | 1,0 |
| <i>τ-muurolol*</i> | 1633 | 2177 | 0,1 |
| <i>cubénol</i> | 1634 | 2052 | 0,1 |
| <i>valérianol*</i> | 1638 | 2205 | 0,2 |
| <i>α-cadinol</i> | 1639 | 2220 | <i>tr</i> |
| <i>α-sélin-11-èn-4-ol*</i> | 1642 | 2241 | 0,2 |
| <i>β-eudesmol*</i> | 1643 | 2216 | 0,9 |
| <i>oxyde d'α-bisabolol*</i> | 1645 | 2130 | 0,1 |
| <i>intermédeol*</i> | 1645 | 2222 | 0,1 |
| <i>β-bisabolol</i> | 1652 | 2140 | 1,3 |
| <i>cadalène</i> | 1654 | 2203 | <i>tr</i> |
| <i>bulnésol*</i> | 1656 | 2202 | 0,1 |
| <i>α-bisabolol</i> | 1668 | 2209 | 0,5 |
| <i>épi-α-bisabolol</i> | 1671 | 2212 | 0,4 |
| <i>α-cypérone</i> | 1727 | 2335 | <i>tr</i> |
| <i>alloévodionol</i> | 1899 | 2786 | 0,3 |

Total

84,3

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ¹³C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement de l'huile essentielle A sont en italique.* Les pourcentages des composés identifiés par RMN du carbone-13 après fractionnement sont en gras italique. tr : Composés à l'état de trace (<0,1%).

Tableau IX : Composition chimique de l'huile essentielle A de *Cedrelopsis grevei*.

| Composés | IK | | B | C | D | E | F |
|------------------------------|----------|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Apolaire | Polaire | | | | | |
| α -pinène | 931 | 1025 | 1,3 | 1,5 | 0,8 | 0,8 | 0,9 |
| camphène | 945 | 1063 | - | 0,1 | - | - | - |
| 6-méthylhept-5-èn-2-one | 961 | 1337 | - | 0,1 | 0,1 | - | - |
| β -pinène | 971 | 1112 | 2,3 | 0,4 | 1,3 | 1,3 | 1,6 |
| myrcène | 981 | 1159 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | - |
| δ -3-carène | 1006 | 1148 | 0,8 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,2 |
| p-cymène | 1012 | 1267 | - | 0,1 | 0,1 | - | 0,1 |
| limonène | 1022 | 1200 | 0,5 | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 0,2 |
| (Z)- β -ocimène | 1026 | 1230 | - | 0,1 | 0,1 | - | - |
| (E)- β -ocimène | 1037 | 1247 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | - |
| terpinolène | 1079 | 1276 | - | 0,2 | - | - | - |
| linalol | 1084 | 1535 | - | 0,1 | 0,1 | - | - |
| fenchol | 1100 | 1581 | - | 0,1 | - | - | 0,1 |
| trans-pinocarvéol | 1124 | 1643 | - | 0,1 | 0,1 | - | 0,5 |
| bornéol | 1150 | 1687 | - | 0,1 | - | - | 0,1 |
| myrténal | 1170 | 1574 | - | - | - | - | 0,2 |
| α -terpinéol | 1172 | 1699 | - | 0,1 | 0,1 | - | 0,2 |
| myrténol | 1179 | 1775 | - | - | 0,1 | - | 0,2 |
| δ -élémente | 1334 | 1462 | - | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 1,1 |
| α -cubébène | 1348 | 1450 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,5 |
| cyclosativène | 1369 | 1473 | 1,6 | 1,6 | 3,8 | 4,2 | 0,9 |
| α -copaène | 1377 | 1487 | 6,2 | 11,0 | 4,9 | 5,0 | 8,4 |
| β -élémente | 1387 | 1585 | 1,2 | 0,2 | 1,3 | 1,4 | 9,6 |
| sativène | 1396 | 1527 | - | 0,2 | - | 0,1 | 0,2 |
| cypérène* | 1401 | 1520 | 0,2 | 0,5 | 0,3 | 0,2 | 1,2 |
| α -gurjunène | 1410 | 1523 | 0,3 | - | - | 0,2 | - |
| α -cédrène | 1414 | 1562 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| (E)-caryophyllène | 1419 | 1604 | 10,6 | 12,5 | 5,8 | 6,0 | 1,3 |
| β -copaène | 1427 | 1581 | - | - | - | - | 0,3 |
| trans- α -bergamotène | 1432 | 1576 | 0,3 | 0,1 | 0,5 | 0,5 | 0,2 |
| (E)- β -farnésène | 1447 | 1656 | 1,3 | 0,8 | 1,8 | 1,8 | 0,2 |
| α -humulène | 1451 | 1658 | 4,0 | 5,4 | 1,6 | 2,1 | 0,8 |
| rotundène | 1460 | 1629 | 0,3 | 0,4 | - | - | - |
| alloaromadendrène | 1461 | 1637 | 1,4 | 1,5 | 0,9 | 0,9 | 3,7 |
| ishwarane | 1463 | 1636 | 1,1 | 1,0 | 13,3 | 13,9 | 17,4 |
| γ -muurolène* | 1471 | 1677 | 2,2 | 4,4 | 2,0 | 1,9 | 2,5 |
| α -curcumène* | 1471 | 1764 | 1,5 | - | 1,5 | 1,5 | - |
| γ -curcumène* | 1473 | 1680 | 3,1 | - | 1,5 | 1,7 | - |
| β -sélinène | 1483 | 1709 | 4,3 | 7,3 | 6,1 | 6,3 | 2,8 |
| valencène | 1489 | 1715 | - | 0,8 | - | 1,8 | - |

| | | | | | | | |
|--|------|------|-------------|------------|-------------|------------|------------------------|
| α -sélinène | 1493 | 1716 | 5,7 | 9,4 | 5,3 | 7,3 | 1,1 |
| α -muurolène | 1494 | 1715 | 1,7 | 2,3 | 2,4 | 3,4 | 2,7 |
| (E,E)- α -farnésène | 1496 | 1742 | - | - | 1,7 | 1,6 | 0,8 |
| β -bisabolène | 1502 | 1717 | 2,3* | 4,0 | 3,4* | 0,3 | 0,6 |
| γ -cadinène | 1507 | 1747 | 1,2 | 0,9 | 0,7 | 0,8 | 1,2 |
| calaménène | 1510 | 1826 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 2,5[†] |
| δ -cadinène | 1516 | 1745 | 5,6 | 7,4 | 3,6 | 3,6 | 3,2 |
| α -calacorène | 1528 | 1895 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,7 |
| (E)- α -bisabolène | 1533 | 1763 | 0,4 | - | - | 0,3 | - |
| élémol | 1534 | 2077 | 1,3 | 0,2 | 1,0 | 0,8 | 0,8 |
| hydrate de 7-épi-trans-sesquisabinène* | 1543 | 1991 | - | - | 0,1 | - | 0,1 |
| (E)-nérolidol | 1547 | 2031 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | - |
| β -calacorène | 1548 | 1939 | - | - | - | - | 0,3 |
| palustrol | 1563 | 1915 | 0,2 | - | - | - | - |
| oxyde de caryophyllène | 1570 | 1978 | 1,7 | 0,5 | 1,2 | 1,2 | 1,3 |
| hydrate de 7-épi-cis-sesquisabinène | 1579 | 2094 | 0,3 | - | - | 0,1 | 0,1 |
| guaïol | 1584 | 2077 | 0,3 | 0,3 | - | 0,2 | 0,1 |
| époxyde d'humulène II | 1593 | 2035 | 0,7 | 0,3 | 0,6 | 0,5 | 0,5 |
| lédol | 1597 | 2016 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,4 |
| α -acorénol* | 1616 | 2123 | - | - | - | 0,2 | - |
| α -eudesmol* | 1630 | 2208 | 1,6 | 1,7 | 1,0 | 1,1 | 0,4 |
| β -eudesmol* | 1643 | 2216 | 1,2 | 1,1 | 0,8 | 0,8 | 0,5 |
| β -bisabolol | 1652 | 2140 | - | - | 0,8 | - | - |
| cadalène | 1654 | 2203 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | - |
| α -bisabolol | 1668 | 2209 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,2 |
| épi- α -bisabolol | 1671 | 2212 | 0,8 | 0,1 | - | 0,5 | 0,4 |
| alloévodionol | 1899 | 2786 | - | - | - | - | 0,7 |
| Total | | | 72,4 | 82,8 | 74,3 | 77,9 | 74,2 |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ^{13}C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms et les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). [†] : Isomère trans identifié par RMN du carbone-13.

Tableau X : composition chimique des cinq huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*.

Qualitativement, les compositions chimiques des six huiles essentielles de *C. grevei* sont assez proches, dans la mesure où elles sont toutes caractérisées par la prédominance des mêmes sesquiterpènes hydrocarbonés. En effet, l'ishwarane (1,0-17,4%, produit assez original peu rencontré dans les huiles essentielles), le (E)-caryophyllène (1,3-12,5%), l' α -copaène (4,9-11,0%), l' α -sélinène (1,1-9,4%), le δ -cadinène (3,2-7,4%), le β -sélinène (2,8-7,3%), l' α -humulène (0,8-5,4%) et le γ -muurolène (1,9-4,4%) sont les constituants majoritaires. En ce qui concerne les sesquiterpènes oxygénés, le fractionnement de l'échantillon A nous a permis d'identifier un grand nombre de ces molécules, qui cependant, n'ont pu toutes être retrouvées dans les échantillons B à F. Nous mettons également en évidence une variabilité quantitative de l'huile essentielle de *C. grevei* de Madagascar, le (E)-caryophyllène et l'ishwarane étant chacun le composé majoritaire de trois échantillons.

Ces résultats confirment l'originalité de l'huile essentielle d'écorce de *C. grevei*. Cette huile essentielle est constituée d'un grand nombre de sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés, possédant des squelettes très variés. Par ailleurs, la composition chimique des huiles essentielles étudiées est très différente de l'huile essentielle de feuilles décrite dans la littérature (328). La teneur en (E)-caryophyllène est nettement plus faible dans nos échantillons (1,3-12,5% contre 42,5%) et de très nombreux sesquiterpènes hydrocarbonés (δ -élémane, β -copaène, rotundène, ishwarane, 4,5-di-épi-aristolochène, β -bisabolène, β -curcumène, trans-calaménène, etc...) et oxygénés (sesquicinéole, élémol, hydrates de sesquisabinène, oxyde de caryophyllène, époxyde d'humulène II, 8-épi- γ -eudesmol, γ -eudesmol, α -eudesmol, β -eudesmol, β -bisabolol, α -bisabolol, épi- α -bisabolol, etc...) sont présents dans nos échantillons dans des proportions modérées à la différence de ceux décrits dans la littérature (328).

La mise en œuvre d'une technique de séparation, la chromatographie liquide sur colonne et de plusieurs techniques analytiques, la CPG/IK, le couplage CPG/SM ainsi que la RMN du carbone-13, nous a donc permis de caractériser, après fractionnement ou directement à partir du mélange complexe, les six huiles essentielles d'écorce de

Cedrelopsis grevei. Dans le chapitre suivant, nous allons appliquer la même méthodologie à l'étude d'huiles essentielles de différentes plantes aromatiques appartenant toutes au genre *Helichrysum*.

CHAPITRE IV

***HELICHRYSUM* DE MADAGASCAR :**
COMPOSITION CHIMIQUE DES
HUILES ESSENTIELLES DE
DIFFERENTES ESPECES

I. DESCRIPTION BOTANIQUE ET USAGES.

La flore malgache est particulièrement riche, notamment par sa diversité spécifique et par la présence très importante d'espèces endémiques. Le genre *Helichrysum* (du grec « helios » : soleil et de « chrysos » : or) qui appartient à la famille des Composées ou Astéracées, n'échappe pas à cette règle. A Madagascar, sur plus de 400 espèces décrites dans le monde, surtout en Afrique australe, dans les pays circumméditerranéens, l'Europe occidentale et l'Australie, 115 espèces, toutes endémiques de la grande Ile, sont actuellement connues (343).

Dans ce dernier chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition chimique de sept espèces malgaches : *Helichrysum bracteiferum* (DC) H. Humbert, *H. gymnocephalum* (DC) H. Humbert, *H. selaginifolium* Vig. et Humb., *H. hypnoides* (DC) Vig. et Humb., *H. cordifolium* D.C., *H. faradifani* Sc. Ell. et *Helichrysum* sp. (dont l'espèce n'a pu être déterminée avec précision).

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Mme Ranarivelo et Mr Ratsimbason du Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques qui ont réalisé l'identification botanique, récolté les plantes et préparé les huiles essentielles.

Helichrysum bracteiferum (DC) H. Humbert du nom vernaculaire Rambiazina, est un arbuste de 1 à 3 mètres de haut, ayant des rameaux ultimes couverts d'un tomentum brun-fauve dense formé de petits poils crépus très fins (Figure 40). Les feuilles sessiles sont atténuées à la base et petites (20-30 x 4-5 mm). Elles sont tomenteuses sur les deux faces (grisâtres, pâles sur le dessus et brun-fauve et plus denses sur le dessous) et trinervées dès la base. Les capitules homogames sont très petits (3 mm environ) groupés en glomérules denses très nombreux disposés en amples corymbes terminaux pourvus de petites bractées axillantes. L'involucre possède des bractées internes de couleur jaune soufre. Les fleurs sont au nombre de deux ou trois, toutes homogames et contenues dans les capitules. Les akènes (fruits) sont papilleux

(343). Cette espèce est présente de 800 à 2200 mètres d'altitude, sur toutes les zones déforestées. Elle est caractéristique avec les Ericacées (*Philippia*) des « savoka » (116), qui correspondent à la végétation secondaire qui s'est développée après abandon de la culture (jachère). On la retrouve dans les rocailles siliceuses, au milieu de la végétation éricoïde des sommets, dans le massif du Tsaratanana (au Nord), le massif de l'Andrangovallo (à l'Est du lac Alaotra) ou le massif de l'Ankaratra (au Sud d'Antananarivo).

Helichrysum gymnocephalum (DC) H. Humbert (Immortelle à tête nue) du nom vernaculaire Rambiazina (comme pour *H. bracteiferum*), est un arbuste de 1 à 4 mètres de haut qui a des rameaux ultimes couverts d'un tomentum aranéeux blanchâtre et très fin (Figure 40). Les feuilles sont lancéolées (5-7 x 1-1,2 cm) et longuement atténuées vers la base en pétioles courts, couvertes sur les deux faces d'un tomentum aranéeux et possédant trois nervures principales bien visibles en dessous. Les capitules homogames sont petits (de 3 à 4 mm), serrés par deux ou cinq en petits glomérules aux sommets des corymbes. L'involucre possède des bractées régulièrement imbriquées, tomenteuses et de couleur jaune soufre pour certaines (bractées moyennes et supérieures). Les fleurs (de 4 à 9) sont toutes homogames. La floraison s'étale de février à mai. Les akènes sont également papilleux. On trouve cette plante dans les mêmes zones géographiques que l'espèce *bracteiferum*.

Les deux espèces *H. bracteiferum* et *H. gymnocephalum* sont souvent confondues du fait de leur grande similitude morphologique. Elles partagent toutes deux le même nom vernaculaire Rambiazina, mais elles peuvent être différenciées en fonction de la taille de leurs feuilles. La première avec de petites feuilles, est appelée le mâle « lahy », tandis que la seconde avec des feuilles plus larges, est appelée la femelle « vavy ». Il faut évoquer ici tout le symbolisme pour en parler, le Rambiazina vavy est le plus beau, symbole de la mère maîtresse, accueillante et responsable du foyer familial (118).



Helichrysum bracteiferum : 1, rameau ; 2, feuille (face inférieure) ; 3, capitule. – *Helichrysum gymnocephalum* : 4–5, rameau ; 6, feuille (face inférieure) ; 7, capitule.
– *Helichrysum selaginifolium* : 8, rameau ; 9, glomérule de capitules ; 10, bractée moyenne.

Figure 40 : caractéristiques botaniques d'*Helichrysum bracteiferum*, d'*H. gymnocephalum* et d'*H. selaginifolium*.

Helichrysum selaginifolium Vig. et Humb. est un arbrisseau éricoïde très rameux de 1 à 1,5 mètres de haut ou une plante suffrutescente de 10 à 60 cm dans les lieux soumis aux incendies périodiques. Il possède des rameaux très grêles (rameaux ultimes de 1 à 1,5 mm de diamètre), dressés et tomenteux (Figure 40). Les feuilles sont étroitement deltoïdes-acuminées (longues de 5 à 9 mm et larges de 0,5 mm à la base). Elles sont également uninerves et pourvues d'un tomentum grisâtre lâche sur la face inférieure (externe) sauf sur la nervure, abondant sur les bords, formé de poils aranéux très fins et brillants. La face supérieure (interne) est glabre. Les capitules hétérogames sont très petits et regroupés en glomérules globuleux. L'involucre est campanulé (long d'environ 5 mm) et les bractées sont glabres ou pourvues de poils très fins à l'extérieur. L'onglet (partie intérieure et rétrécie de certains pétales) est scarieux et fortement induré, environ quatre fois plus long que l'appendice. L'appendice est rapproché en couronne, de plus ou moins un millimètre de long, blanc-jaunâtre à jaune soufre. Les fleurs sont aux nombres de 10 à 20 dont plusieurs sont femelles. La floraison s'étale d'août à octobre. Les akènes sont généralement papilleux. Cette espèce est présente de 900 à 2500 mètres d'altitude, dans la forêt sclérophylle et dans la végétation éricoïde des crêtes, d'où elle s'est largement répandue dans la prairie secondaire soumise aux incendies.

Helichrysum hypnoides (DC) R. Vig. et H. Humb. est un arbrisseau ou sous-arbrisseau éricoïde extrêmement rameux de 10 à 80 cm de hauteur, à tiges minces mais fortement lignifiées (cassantes) et couvertes d'un fin tomentum aranéux blanc-grisâtre plus ou moins lâche (Figure 41). Les feuilles sont sessiles, lancéolées-linéaires, très petites (longues de 3 à 5 mm et larges de 0,5 à 1,5 mm à la base). Elles sont munies sur les bords de poils intriqués avec ceux des rameaux, glabres ou glabrescentes sur les deux faces ou sur la face inférieure seulement, avec une nervure médiane très forte (saillante). Les capitules hétérogames sessiles sont tous ou la plupart solitaires ou par deux ou trois au sommet des ramilles ou en partie rapprochés en petits glomérules terminaux. L'involucre est long de 3 à 4 mm et est entouré par les feuilles supérieures beaucoup plus courtes que lui. Les fleurs sont aux nombres de 3 à 15 et sont disposées en capitule (plusieurs sont femelles). Les corolles sont de couleur

rouge ou brunâtre, surtout au sommet. La floraison s'étale de mars à octobre. Les akènes sont papilleux. Cette espèce est présente de 1400 à 2800 mètres d'altitude, dans les rocailles siliceuses, surtout dans la végétation éricoïde des sommets (du Nord à l'extrémité Sud-Est des hautes montagnes : massif de Tsaratanana, massif de l'Akaratra, etc...).

Helichrysum faradifani Sc. Ell. du nom vernaculaire Ahibalala (herbe des sauterelles) est une plante suffrutescente de 20 à 60 cm de hauteur, à tige rameuse assez fortement lignifiée dans sa partie inférieure (Figure 41). Elle est dressée dès la base, avec des rameaux rougeâtres finement hérissés de petits poils flagelliformes. Les feuilles membraneuses sessiles, sont étroites ou plus ou moins largement lancéolées (2-4 x 0,2-1 cm), plus longues que les entre-nœuds, sauf vers le haut des rameaux florifères où elles sont progressivement réduites. La face supérieure des feuilles est couverte du même indument que les rameaux (poils flagellés) tandis que la face inférieure est tomenteuse-aranéuse. On compte trois nervures issues de la base du limbe. Les capitules hétérogames possèdent des pédoncules ultimes plus courts que les involucre, disposés en corymbes composés souvent de manière assez amples (jusqu'à 6 à 8 cm de large). L'involucre ovoïde-campanulé (long de 3 mm et large de 2,5 mm) est glabre, à bractées régulièrement imbriquées en cinq séries environ. Les fleurs sont au nombre d'une vingtaine dont 1 à 6 sont femelles. La floraison s'étale toute l'année suivant les stations. Les akènes sont glabres. Cette espèce est présente du niveau de la mer jusqu'à 1800 mètres d'altitude, dans les lieux rocaillieux ou sablonneux découverts, sur les berges de ruisseaux, les talus et les « savoka ». Elle semble se répartir sur l'ensemble de l'île.



Helichrysum hypnoides : 1, rameau ; 2, capitule ; 3, bractée moyenne. – *Helichrysum faradifani* : 4, rameau, 5–7, feuilles de rameaux juvéniles (face inférieure), formes de spécimens divers ; 8, capitules. – *Helichrysum cordifolium* : 9, rameau ; 10, feuille ; 11, capitule.

Figure 41 : caractéristiques botaniques d'*Helichrysum hypnoides*, d'*H. faradifani* et d'*H. cordifolium*.

Helichrysum cordifolium D.C. du nom vernaculaire Forsiavadika ou Tsimanandra, est une plante suffrutescente très rameuse (de 0,5 à 1,2 mètres de hauteur et parfois jusqu'à 2 à 3 mètres, appuyée sur les buissons). Elle possède des rameaux juvéniles couverts d'un tomentum lâche (Figure 41). Les feuilles à limbe membraneux sont largement ovale-obcordées (3-5 x 2-3,5 cm), densément hérissées à la face supérieure de petits poils flagellés, couvertes à la face inférieure d'un tomentum persistant dense. On compte trois à cinq nervures principales. Le pétiole est mince, égalant environ la moitié de la longueur du limbe. Les capitules hétérogames sont campanulés (longs de 3 mm et larges de 2 mm à mi-hauteur), groupés en glomérules et agencés en corymbes terminaux. L'involucre est hémisphérique dans sa moitié inférieure. Les fleurs sont au nombre de 15 environ, dont 1 à 5 sont femelles. La floraison s'étale toute l'année suivant les localités. Cette espèce se répartie de 800 à 1600 mètres d'altitude (descendant jusque vers 200 mètres d'altitude le long du chemin de fer et de la route de Tamatave et jusque vers 600 mètres dans l'Ambongo). On la retrouve en lisières de forêts, dans les ravins, etc... Elle est localisée dans le centre de l'île et on trouve également quelques spécimens aux Comores (probablement introduits comme plante médicinale).

En ce qui concerne *Helichrysum* sp., nous ne détaillerons pas cette espèce qui est en cours d'identification par nos collègues botanistes de Madagascar.

Chacune de ces espèces possède des propriétés médicinales. Diverses études ont démontré l'activité antimicrobienne et les propriétés antiseptiques d'un grand nombre d'espèces appartenant au genre *Helichrysum* (120, 344-352). *Helichrysum bracteiferum* et *H. gymnocephalum* sont utilisés traditionnellement en thérapeutique, sous forme de tisanes ou en sirop préparé à partir des feuilles pour soigner les aphtes, les gingivites ou les ulcères (353). Ces deux plantes sont également utilisées sous forme de pommade, par mélange des feuilles broyées avec du saindoux, contre les rhumatismes ou la goutte. Les feuilles et les sommités fleuries ont des propriétés diurétiques, fortifiantes et soulageraient les névralgies (320). Le Rambiazina (*H. bracteiferum* et *H. gymnocephalum*) est reconnu pour avoir des propriétés

analgésiques, aphrodisiaques, antiseptiques, antiscorbutiques, désodorisantes, toniques et vermifuges (117, 207). Il entre aussi dans la fabrication du dentifrice local (*H. gymnocephalum*). Les feuilles du Rambiazina servaient également pour embaumer les morts. *Helichrysum cordifolium* est utilisé contre les coliques, contre les syphilis graves (les feuilles sont brûlées pour en appliquer les cendres sur la partie malade), les céphalées et il possède également des propriétés cicatrisantes (320). L'espèce *faradifani* a des propriétés antitussives et est aussi utilisée comme décontracturant, contre les maux d'estomac ou contre les névralgies (320).

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

Depuis plusieurs décennies, de nombreux travaux ont été publiés sur le genre *Helichrysum*. L'analyse des données de la littérature nous informe qu'il existe une grande variabilité phénotypique pour les différentes espèces du genre *Helichrysum*. On rencontre également des problèmes de variabilité intraspécifique et interspécifique, l'ensemble aboutissant à des compositions chimiques variant dans des proportions importantes. Les études chimiques les plus courantes, à partir de l'huile essentielle ou d'extraits aux solvants organiques, concernent principalement les composés terpéniques (142, 354-378), les flavonoides (358, 379-387), les composés phénoliques (345, 388, 389), les lactones (358, 390) et les composés coumariniques (391, 392). L'étude des huiles essentielles d'*Helichrysum* porte essentiellement sur des plantes circumméditerranéennes, sud africaines et australiennes et nous présentons ici les principaux composés majoritaires qui ont été identifiés dans la littérature pour chacune d'entre elles et qui en définissent le type chimique :

- α -pinène : *H. stoechas* var. *α -syncladum* [59%, Portugal (358)] ; *H. odoratissimum* [40,6 et 47,1%, Cameroun (362), 43,4%, Kenya (363) et 15,0%, associé à l' α -humulène (13,0%), Zimbabwe (364)] ; *H. stoechas* ssp. *stoechas* [28,3%, associé à l'épi- α -bisabolol (21,9%), Espagne (365)] ; *H. italicum* [29,9%, Côte Adriatique (366) et 21,7%, Yougoslavie (367, 368)] ;
- δ -3-carène : *H. picardii* [60,0-74,3%, Espagne (369)] ;
- γ -terpinène : *H. splendidum* [14,9%, Zimbabwe (370)] ;

- géraniol : *H. taenari* [50,0%, associé au camphène (18,6%), Grèce (371)], *H. italicum* ssp. *italicum* [35,6%, Grèce (350)] ; *H. amorginum* [32,1%, associé à l'acétate de géranyle (20,8%), Grèce (350)] ;
- acétate de néryle : *H. italicum* ssp. *microphyllum* [38,6 ± 15,1%, Amérique du Nord (372) et 28,9 ± 3,5%, Sardaigne (373)], *H. italicum* ssp. *italicum* [16,6 ± 2,0%, Amérique du Nord (372) et 15,8-42,5%, Corse (374)] ;
- carvacrol : *H. doerfleri* [42,5%, Grèce (375)] ;
- (E)-caryophyllène : *H. heldreichii* [38,5%, Grèce (375)].
- β-sélinène : *H. italicum* ssp. *microphyllum* [17,1%, associé au γ-curcumène (13,7%), Grèce (375)] ;
- α-curcumène : *H. italicum* [28,6%, Côte Adriatique (366)] ;
- rosifoliol : *H. italicum* ssp. *microphyllum* [20,2 ± 3,2%, associé au γ-curcumène (18,2 ± 2,2%) et au linalol (14,9 ± 2,2%), Sardaigne (373)] ;
- guaiol : *H. italicum* ssp. *serotinum* [9,0%, associé au nonadécane (7,4%) et au nérol (7,0%), Espagne (365)] ;
- α-eudesmol : *H. doerfleri* [11,7%, associé à trois autres isomères, Grèce (375)] ;
- oxyde de manoyle : *H. rupestre* [33,3%, Iles Baléares (351)] ;
- acide 2,4,6-tris(1,1-diméthyléthyl)benzoïque : *H. ambiguum* [48,6%, Iles Baléares (351)] ;
- acide hexadécanoïque : *H. orientale* [17,5%, associé au nonacosane (11,0%), Grèce (375)].

Enfin, en 1998 la composition chimique de l'huile essentielle d'*Helichrysum* a été passée en revue par Lawrence (376). A notre connaissance, seules trois espèces malgaches ont fait l'objet d'une publication. Il s'agit d'*Helichrysum bracteiferum*, *H. gymnocephalum* et *H. selaginifolium*.

- ◆ La composition chimique de l'huile essentielle d'*Helichrysum bracteiferum* a été étudiée par Ramanoelina et coll. (377) et les constituants majoritaires sont le 1,8-cinéole (17,7%), l'α-humulène (11,6%), le terpinèn-4-ol (9,6%), le (E)-caryophyllène (9,6%) et le β-pinène (8,2%).

- ◆ En ce qui concerne l'huile essentielle d'*Helichrysum gymnocephalum*, trois études ont été décrites :

- De Medici et coll. (120) ont identifié comme composés majoritaires, le 1,8-cinéole (17,2-14,6%), le bornéol (16,2-10,4%), le (E)-caryophyllène (12,7-9,9%), le β -pinène (8,2-6,4%) et l'eugénol (2,2-13,5%).

- Theron et coll. (378) ont également mis en évidence la présence du 1,8-cinéole (20,4-14,1%), du 3-éthyl-2,5-diméthylhexan-1,3-diène (17,2-2,8%, l'identification de ce composé semble cependant sujette à caution étant donné son ordre d'élution), de l' α -farnésène (12,7-1,8%), du β -pinène (3,1-10,6%), du (E)-caryophyllène (1,2-9,5%) et de l' α -humulène (0,6-13,2%).

- Möllenbeck et coll. (142) ont signalé la prédominance du 1,8-cinéole (66,7%) dans l'huile essentielle, suivi du (E)-caryophyllène (3,3%), du β -pinène (2,7%), de l' α -pinène (2,5%) et du p-cymène (2,3%).

Nous remarquons que malgré les variations quantitatives parfois importantes de la composition, le 1,8-cinéole reste toujours le composé majoritaire de l'huile essentielle d'*Helichrysum gymnocephalum*.

- ◆ La composition chimique de l'huile essentielle d'*Helichrysum selaginifolium* (142) est très différente de celles des deux espèces décrites précédemment. En effet, elle est caractérisée par la présence de deux composés monoterpéniques majoritaires, le β -pinène (40,5%) et l' α -pinène (16,4%) ainsi qu'un oxyde sesquiterpénique : l'oxyde de caryophyllène (6,4%).

III. COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'*HELICHRYSUM*.

Dans ce chapitre, nous allons donc décrire la composition chimique des huiles essentielles de sept espèces endémiques de Madagascar. Nous avons de nouveau utilisé la même méthodologie que dans les chapitres précédents, à savoir la mise en œuvre d'une technique de séparation, la chromatographie sur colonne, et de plusieurs techniques analytiques, la CPG/IK, la CPG/SM ainsi que la RMN du carbone-13.

Nous disposons de trois huiles essentielles commerciales : *H. gymnocephalum* (5 grammes), *H. bracteiferum* (7 grammes) et *H. faradifani* (6 grammes). Ces huiles

essentielles collectives nous ont été fournies par des producteurs malgaches et ont été obtenues à partir du végétal (partie aérienne) par hydrodistillation à la vapeur d'eau dans des alambics industriels. Le matériel végétal a été récolté dans les zones d'altitudes, sur les hauts plateaux à l'Est, dans les régions d'Antananarivo, de Moramanga et d'Antsirabe.

Nous disposions également de sept autres échantillons d'huile essentielle (environ 200 à 300 mg chacune) qui nous ont été fournis par Mme Lalasoa Ranarivelo et Mr Michel Ratsimbason du Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques (C.N.A.R.P.) de Madagascar. Nos collaborateurs ont identifié les espèces, récolté les plantes et préparé les huiles essentielles. Un spécimen de chaque plante a été déposé à l'Herbarium du département de botanique du C.N.A.R.P. L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation des parties aériennes de la plante avec un essencier de type Clevenger. Nous reportons ci-dessous, pour chaque plante, le lieu et la date de récolte, le numéro de l'échantillon et le rendement de l'huile essentielle :

- ✓ *H. gymnocephalum* ; Anjozorobe, mars 1997, HE 2830 ; 0,41%
- ✓ *H. bracteiferum* ; Behenjy, février 1999, HE 1075 ; 0,16%
- ✓ *H. faradifani* ; Anjozorobe, mai 1995, HE 2792 ; 0,07%
- ✓ *H. selaginifolium* ; Anjozorobe, mai 1995, HE 2831 ; 0,01%
- ✓ *H. cordifolium* ; Fandriana, juin 1997, HE 2793 ; 0,03%
- ✓ *H. hypnoides* ; Anjozorobe, mai 1995, HE 2833 ; 0,012%
- ✓ *Helichrysum* sp. ; Fandriana, HE 2794 ; 0,03%

Nous avons étudié :

- la composition chimique des huiles essentielles commerciales d'*H. gymnocephalum*, d'*H. bracteiferum* et d'*H. faradifani*, par l'analyse des fractions hydrocarbonées et oxygénées obtenues après fractionnement sur gel de silice ;
- la composition chimique de sept autres échantillons d'huiles essentielles sans fractionnement[♦] : les trois précédentes espèces, *H. gymnocephalum*, *H. bracteiferum* et

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

H. faradifani et quatre nouvelles espèces, *H. selaginifolium*, *H. cordifolium*, *H. hypnoides* ainsi qu'un échantillon d'*Helichrysum* sp.

A. COMPOSITION CHIMIQUE DE TROIS HUILES ESSENTIELLES : *H. GYMNOCEPHALUM*, *H. BRACTEIFERUM* et *H. FARADIFANI*.

Pour chacune des trois huiles essentielles commerciales, nous avons réalisé l'analyse de l'huile essentielle globale par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13. Nous avons ensuite procédé à un fractionnement sur gel de silice, ce fractionnement étant plus ou moins important selon l'échantillon étudié. Nous détaillons chacune des analyses dans les paragraphes suivants, ainsi que l'analyse de l'échantillon qui nous a été fourni par le C.N.A.R.P., analysé directement par CPG/IK, CPG/SM et RMN du ^{13}C sans fractionnement.

1. Composition chimique de l'huile essentielle d'*H. gymnocephalum*.

Les deux échantillons d'*H. gymnocephalum*, l'un fourni par le C.N.A.R.P. (A1), l'autre commercial (A2) ont été analysés par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13. L'analyse directe de ces deux échantillons a permis d'identifier 21 et 34 constituants représentant respectivement 91,9 et 95,4% de la composition chimique.

L'huile essentielle d'*H. gymnocephalum* est très riche en composés monoterpéniques (Tableau XI). Elle est caractérisée par la prédominance du 1,8-cinéole (59,7 et 66,3%), de l' α -pinène (4,4 et 3,6%), du p-cymène (6,4 et 3,5%), du β -pinène (3,3 et 2,6%) et d'un monoterpène oxygéné, le terpinèn-4-ol (2,8 et 3,3%).

De manière à identifier un plus grand nombre de composés, nous avons chromatographié sur colonne ouverte de silice (de type « flash ») l'huile essentielle commerciale d'*Helichrysum gymnocephalum* (A2, 1,09 g) : quatre fractions ont été obtenues, une au pentane contenant les composés hydrocarbonés (117 mg), et trois autres en utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante, contenant les composés oxygénés (Figure 42).

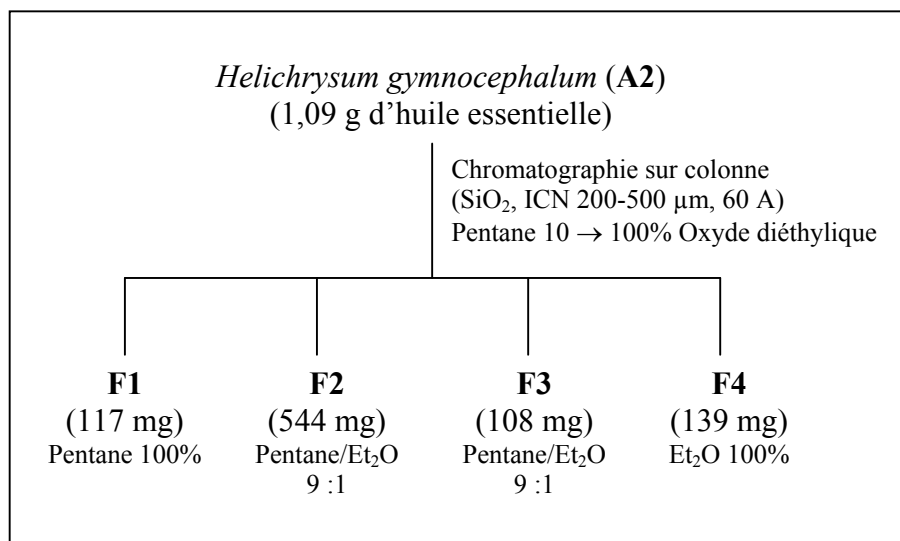


Figure 42 : schéma de fractionnement de l'huile essentielle d'*Helichrysum gymnocephalum* (A2).

a. Chromatographie sur colonne de silice « flash » de l'huile essentielle.

L'analyse de la fraction hydrocarbonée (117 mg) conduit à l'identification de sept nouveaux hydrocarbures par rapport à l'huile essentielle brute (Tableau XI) :

- deux monoterpènes, le δ -3-carène et le (E)- β -ocimène ;
- trois sesquiterpènes, le cyclosativène, le trans-calaménène et le β -copaène (dont l'identification par SM a été confirmée par RMN du carbone-13 dans l'huile essentielle d'*Helichrysum bracteiferum*) ;
- et deux diterpènes, le géranyl-p-cymène et le géranyl- α -terpinène dont l'identification par SM et surtout par RMN du carbone-13 a été rendue possible à partir de trois molécules de référence que nous possédions dans nos bibliothèques de spectres : l' α -terpinène, le p-cymène et le géranyl-p-cymène. Dans le paragraphe suivant, sont reportés les spectres de masse et les déplacements chimiques de ces différentes molécules.

| | | A1 | A2 | F1 | F2 | F3 | F4 | |
|--|---------------|---------|--------------|--------------|-------------|-------|-------------|-------------|
| | Masse (mg) | 300 | 1090 | 117 | 544 | 108 | 139 | |
| | Pentane/Ether | | | 100/0 | 90/10 | 90/10 | 0/100 | |
| | Solvant (ml) | | | 450 | 150 | 100 | 300 | |
| Composés | IK | | | | | | | |
| | Apolaire | Polaire | | | | | | |
| α -thujène | 924 | 1027 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | - | - | - |
| α -pinène | 932 | 1027 | 4,4 | 3,6 | 3,3 | - | - | - |
| <i>6-méthylhept-5-èn-2-one</i> | 962 | 1342 | - | tr | - | - | 0,2 | - |
| sabinène | 966 | 1126 | 1,4 | 1,1 | 2,4 | - | - | - |
| β -pinène | 972 | 1116 | 3,3 | 2,6 | 5,1 | - | - | - |
| myrcène | 982 | 1165 | 1,0 | 0,9 | 3,0 | - | - | - |
| α -phellandrène | 999 | 1169 | - | 0,5 | 1,6 | - | - | - |
| δ -3-carène | 1006 | 1152 | - | tr | 0,2 | - | - | - |
| α -terpinène | 1011 | 1185 | - | 0,7 | 2,3 | - | - | - |
| p-cymène | 1015 | 1278 | 6,4 | 3,5 | 14,2 | - | - | - |
| limonène | 1024 | 1206 | 1,7* | 0,9* | 3,6* | - | - | - |
| 1,8-cinéole | 1024 | 1213 | 59,7* | 66,3* | - | 96,3 | 90,2 | 0,8 |
| β -phellandrène | 1024 | 1214 | - | 0,2* | 1,6* | - | - | - |
| (<i>E</i>)- β -ocimène | 1037 | 1253 | - | tr | 0,3 | - | - | - |
| γ -terpinène | 1051 | 1250 | - | 1,9 | 7,5 | - | - | - |
| <i>trans-oxyde de linalol</i> (<i>forme furane</i>) | 1072 | 1474 | - | 0,1 | - | - | - | 0,6 |
| p-cyménène | 1074 | 1442 | - | 0,2 | 0,9 | - | - | - |
| terpinolène | 1080 | 1287 | - | 0,4 | 1,8 | - | - | - |
| linalol | 1085 | 1549 | 0,8 | 0,5 | - | - | - | 4,4 |
| p-mentha-1,5-dièn-8-ol* | 1149 | 1729 | - | 0,5 | - | - | - | 3,5 |
| terpinèn-4-ol | 1166 | 1607 | 2,8 | 3,3 | - | - | - | 32,0 |
| <i>myrténal</i> | 1170 | 1632 | - | tr | - | - | 0,3 | - |
| p-mentha-1(7),2-dièn-8-ol | 1172 | 1786 | - | 1,0 | - | - | - | 7,3 |
| α -terpinéol* | 1175 | 1700 | 1,2 | 0,9 | - | - | - | 9,1 |
| <i>myrténol*</i> | 1175 | 1798 | - | 0,1 | - | - | - | 0,5 |
| <i>citronellol</i> | 1210 | 1771 | - | 0,1 | - | - | - | 0,9 |
| <i>cyclosativène</i> | 1370 | 1481 | - | 0,1 | 0,5 | - | - | - |
| α -copaène | 1376 | 1492 | - | 0,2 | 1,5 | - | - | - |
| (<i>E</i>)-caryophyllène | 1420 | 1600 | 1,6 | 1,1 | 9,7 | - | - | - |
| β -copaène | 1427 | 1591 | - | 0,1 | 0,3 | - | - | - |
| α -humulène | 1453 | 1672 | 1,8 | 0,6 | 8,2 | - | - | - |
| γ -muurolène* | 1471 | 1687 | 0,3 | 0,2 | 1,5 | - | - | - |
| β -sélinène | 1483 | 1718 | - | 0,1 | 0,7 | - | - | - |
| α -sélinène | 1494 | 1724 | - | 0,4 | 2,1 | - | - | - |
| α -muurolène | 1494 | 1724 | 0,3 | | | - | - | - |

| | | | | | | | | |
|--|------|------|------------------|------------|------------|------|------------|------------|
| α -bulnésène* | 1501 | 1714 | - | 0,2 | 0,7 | - | - | - |
| γ -cadinène | 1509 | 1762 | 0,8 | 0,7 | 5,8 | - | - | - |
| <i>trans-calaménène</i> | 1511 | 1835 | 0,3 [†] | 0,1 | 1,2 | - | - | - |
| δ -cadinène | 1517 | 1760 | 0,5 | 0,7 | 6,1 | - | - | - |
| α -cadinène | 1531 | 1792 | - | 0,2 | 1,2 | - | - | - |
| spathuléol | 1564 | 2129 | - | 0,1 | - | - | - | 1,1 |
| oxyde de caryophyllène | 1572 | 1988 | 1,6 | 0,6 | - | - | 3,4 | 1,2 |
| 6,7-époxyde d'humulène | 1595 | 2046 | 1,1* | 0,3 | - | - | 1,7 | 0,5 |
| τ -cadinol | 1629 | 2170 | 0,4 | - | - | - | - | - |
| τ -muurolool* | 1639 | 2176 | - | 0,4 | - | - | - | 3,1 |
| <i>α-cadinol*</i> | 1639 | 2238 | - | 0,3 | - | - | - | 1,8 |
| <i>géranyl-p-cymène</i> | 1939 | 2298 | - | 0,2 | 1,7 | - | - | - |
| <i>géranyl-α-terpinène</i> | 1943 | 2214 | - | 0,4 | 2,9 | - | - | - |
| Total | | | 91,9 | 96,8 | 92,5 | 96,3 | 95,8 | 66,8 |

A1 : Huile essentielle fournie par le C.N.A.R.P. A2 : Huile essentielle commerciale. Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ^{13}C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élu­tion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement de l'huile essentielle A2 sont en italique.* Les pourcentages des composés identifiés par RMN du carbone-13 après fractionnement sont en gras italique. [†] : Isomère non déterminé. F1 à F4 : quatre fractions obtenues par chromatographie sur colonne (silice ICN 200-500 μm , 60 A) de l'huile essentielle A2.

Tableau XI : composés identifiés dans l'huile essentielle d'*Helichrysum gymnocephalum*.

De même, la RMN du carbone-13 a permis de déterminer l'isomère trans du calaménène à partir des valeurs des déplacements chimiques de ses carbones, valeurs qui diffèrent nettement de celles de l'isomère cis. En effet, cet isomère ne peut être distingué en SM de l'isomère cis dans la mesure où les deux spectres de masse sont parfaitement superposables et leurs indices de rétention sont identiques sur les deux colonnes.

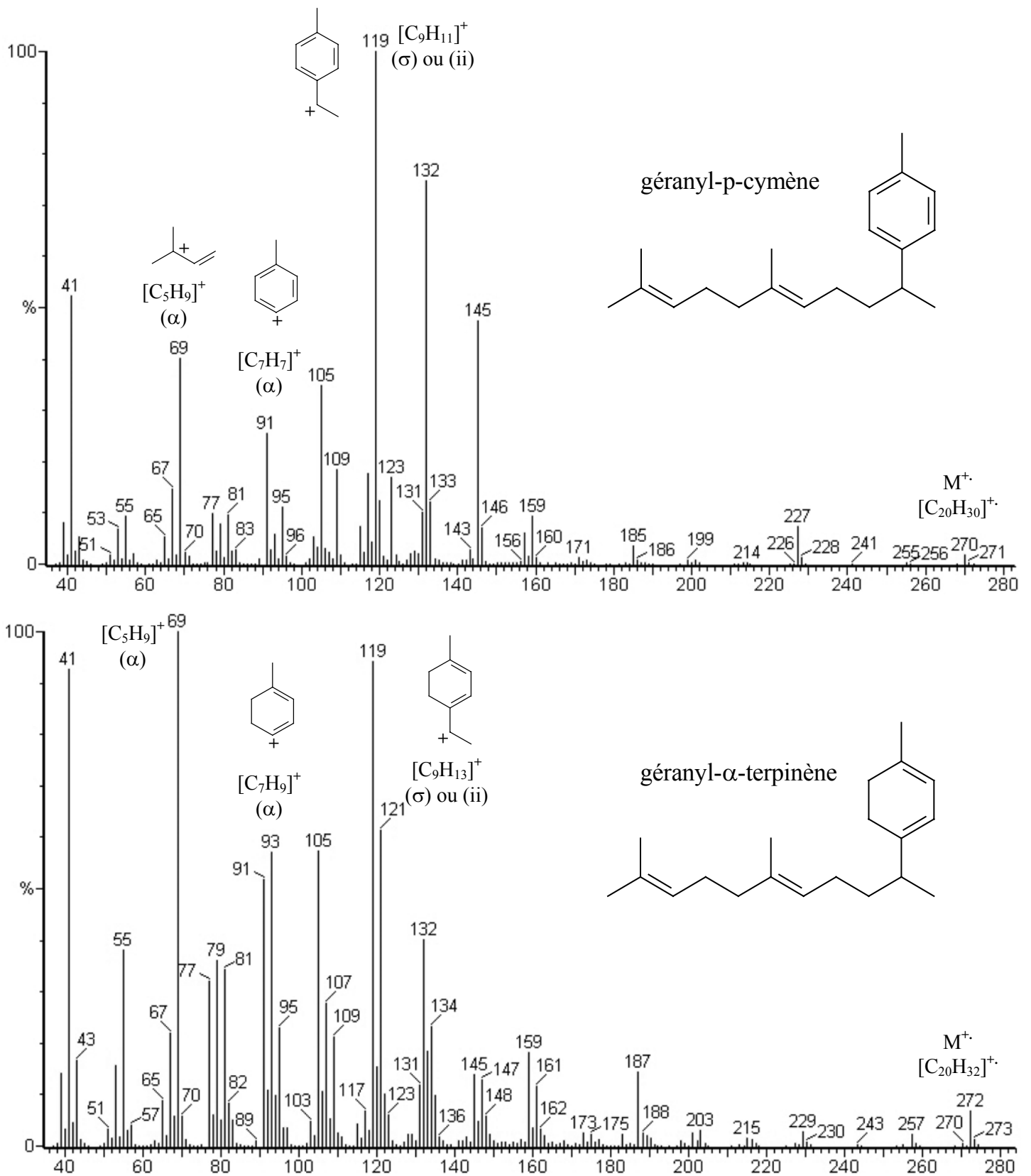
L'étude des fractions 2 et 3 (544 mg et 108 mg) ne présente que peu d'intérêt dans la mesure où le 1,8-cinéole constitue 96,3% et 90,2% de la composition chimique. Cependant, deux nouveaux composés ont pu être identifiés, la 6-méthylhept-5-èn-2-one et un aldéhyde pinanique, le myrténal. La quatrième

fraction (139 mg) a permis l'identification de quatre nouveaux composés oxygénés : le trans-oxyde de linalol (forme furane), le myrténol, le citronellol et l' α -cadinol.

b. Analyses spectrales : identification des constituants de l'huile essentielle d'*Helichrysum gymnocephalum*.

L'analyse par CPG/SM et RMN du carbone-13 de la fraction hydrocarbonée 1, a permis l'identification d'un hydrocarbure diterpénique : le géranyl-p-cymène dont les données spectrales étaient présentes dans nos bibliothèques de spectres enregistrés au laboratoire et qui avait auparavant été identifié dans l'huile essentielle de *Cistus monspeliensis* (393). Toutefois, un second composé, possédant un pic moléculaire à m/z 272 ($C_{20}H_{32}$), est présent et nous laisse penser que nous sommes peut être en présence d'un autre diterpène possédant une insaturation en moins par rapport au géranyl-p-cymène (pic moléculaire à m/z 270).

Pour le spectre de masse du géranyl-p-cymène (Figure 43), nous observons le fragment à m/z 91 (formé par clivage α) correspondant à l'ion $[C_7H_7]^+$ caractéristique du noyau aromatique, tandis que pour notre composé inconnu, nous observons le fragment à m/z 93 légèrement plus abondant que l'ion à m/z 91 ($[C_7H_9]^+$). Le fragment à m/z 69 correspond à l'ion $[C_5H_9]^+$. Cet ion, présent dans le spectre de masse du géranyl-p-cymène (et du composé inconnu), est caractéristique de la perte d'une partie du motif géranyle de la molécule.

Figure 43 : spectres de masse du géranyl-p-cymène et du géranyl- α -terpinène.

L'analyse par RMN du carbone-13 nous permet d'envisager la présence du motif α -terpinène dans la molécule. Le spectre de RMN du carbone-13 du géranyl- α -terpinène peut être « reconstruit » à partir de ceux de l' α -terpinène et du géranyl-p-cymène. On note une bonne concordance pour la plupart des carbones. Cependant, sur six carbones nous constatons une variation des déplacements chimiques entre les deux molécules. Ces différences peuvent s'expliquer par la présence d'un motif structural (motif géranyle) rattaché à l'un des deux groupements méthyle de l'isopropyle comme c'est le cas entre le p-cymène et le géranyl-p-cymène. De plus, on retrouve parmi ces six carbones, quatre présentant les mêmes variations des déplacements chimiques observés pour le couple p-cymène/géranyl-p-cymène. Cependant, pour deux d'entre eux, résonant à 24,12 et 118,47 ppm, nous n'observons pas les mêmes différences. Le contrôle des signaux restant nous confirme la présence du même squelette hydrocarboné (motif géranyle) que celui du géranyl-p-cymène. En effet, la plupart des raies de résonance appartenant aux deux molécules sont superposées (intensités doubles). L'ensemble de ces données nous conduit à proposer la structure du géranyl- α -terpinène **32**. La structure de ce diterpène et l'attribution des différents signaux de RMN du carbone-13 sont données dans la figure 44. Il est à noter enfin, que l'attribution de ses déplacements chimiques a été réalisée en parallèle à partir de l'étude de la fraction hydrocarbonée de l'huile essentielle d'*Helichrysum bracteiferum*.

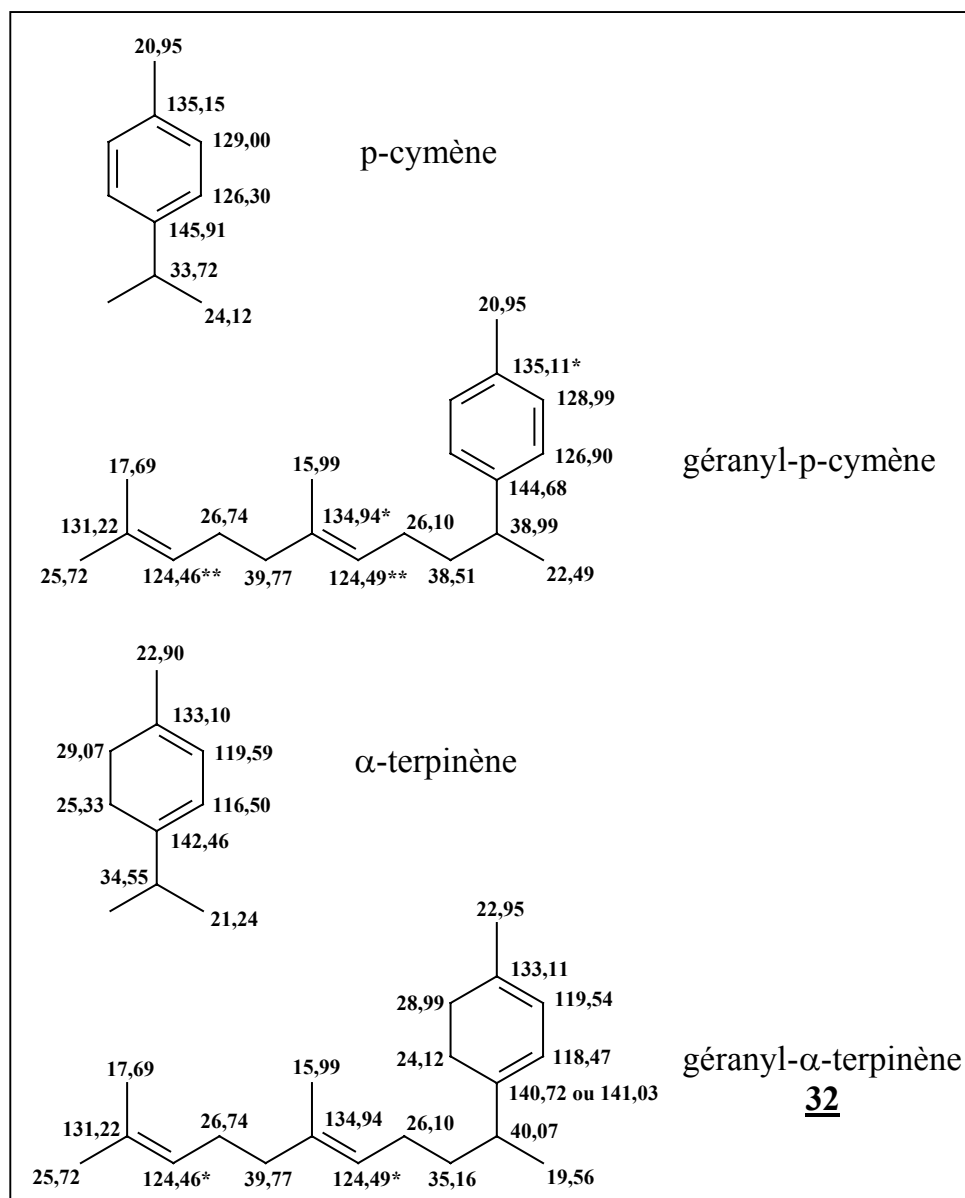


Figure 44 : structure et valeurs des déplacements chimiques du p-cymène, de l' α -terpinène, du géranyl-p-cymène et du géranyl- α -terpinène 32.

c. Bilan de l'analyse de l'huile essentielle d'*H. gymnocephalum*.

L'analyse de l'huile essentielle commerciale (échantillon A2) d'*Helichrysum gymnocephalum* par les techniques chromatographiques habituelles (chromatographie sur colonne et CPG/IK) et les techniques spectrométriques, la CPG/SM et la RMN du carbone-13, a conduit à l'identification de 47 constituants qui représentent 96,8% de la composition chimique globale contre seulement 34 analysés sans fractionnement (Tableau XI). Les principaux constituants qui caractérisent ces échantillons sont le 1,8-

cinéole (59,7 et 66,3%), l' α -pinène (4,4 et 3,6%), le p-cymène (6,4 et 3,5%), le β -pinène (3,3 et 2,6%) et le terpinèn-4-ol (2,8 et 3,3%). On constate donc que la fraction monoterpénique est ultra majoritaire dans les deux échantillons. La fraction sesquiterpénique est constituée par une vingtaine de composés ((E)-caryophyllène, α -humulène, γ -cadinène ou oxyde de caryophyllène par exemple), mais représente moins de 9% environ de la composition.

La composition chimique de nos deux échantillons est très proche de celle publiée par Möllenbeck et coll. (142). Cependant, quelques différences sont observées lors de l'analyse qualitative et quantitative des constituants minoritaires. En effet, nous avons pu identifier de nombreux sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés : α -humulène (0,6-1,8%), 6,7-époxyde d'humulène (0,6-1,6%), γ -cadinène (0,7-0,8%), δ -cadinène (0,5-0,7%), γ -muurolène (0,2-0,3%), etc... A notre connaissance, nous reportons pour la première fois la présence de deux diterpènes dans l'huile essentielle d'*Helichrysum* : le géranyl- α -terpinène et le géranyl-p-cymène.

Par contre, cette composition diffère de celles décrites par De Medici et coll. (120) (1,8-cinéole, 14,6-17,2% ; bornéol, 10,4-16,2% ; (E)-caryophyllène, 9,9-12,7% ; eugénol, 2,2-13,5%) ou par Theron et coll. (378) (1,8-cinéole, 14,1-20,4% ; 3-éthyl-2,5-diméthylhexan-1,3-diène, 2,8-17,2% ; α -farnésène, 1,8-12,7%).

2. Composition chimique de l'huile essentielle d'*H. bracteiferum*.

L'huile essentielle d'*Helichrysum bracteiferum* qui nous a été fournie par le C.N.A.R.P. (B1) a été analysée par les techniques habituelles et 33 composés ont été identifiés représentant 90,3% de la composition chimique. Le 1,8-cinéole (27,3%), le β -pinène (11,9%) et l' α -pinène (5,4%) sont les principaux constituants monoterpéniques dans l'huile essentielle suivis de deux sesquiterpènes hydrocarbonés, l' α -humulène et le (E)-caryophyllène (10,1% et 7,1%).

L'analyse de l'huile essentielle commerciale d'*Helichrysum bracteiferum* (B2) nous a permis d'identifier 37 constituants représentant 88,2% de la composition. Le composé majoritaire est également le 1,8-cinéole, mais il ne représente que 19,4% de la composition totale. Parmi les autres constituants les plus importants, nous notons de nouveau l' α -humulène (13,5%), le β -pinène (12,5%), le (E)-caryophyllène (9,7%) et l' α -pinène (5,1%).

Comme précédemment, nous avons chromatographié sur colonne ouverte de silice (de type « flash ») l'huile essentielle commerciale d'*Helichrysum bracteiferum* (B2, 1 g) : quatre fractions ont été obtenues, une fraction hydrocarbonée et trois autres fractions oxygénées (Figure 45).

a. Chromatographie sur colonne de silice « flash » de l'huile essentielle.

L'analyse par CPG/SM et RMN du carbone-13 de la fraction hydrocarbonée (553 mg) conduit à l'identification de sept nouvelles oléfines par rapport à l'huile essentielle brute (Tableau XII). Il s'agit principalement de composés sesquiterpéniques et des deux diterpènes déjà identifiés dans *H. gymnocephalum*. Parmi les sesquiterpènes, le β -copaène **33**, l' α et le β -ylangène (**34** et **35**) n'étaient pas présents dans nos bibliothèques de spectres. Ils ont été identifiés à partir de leur spectre de masse et de leurs indices de rétention sur colonne apolaire (20).

L'étude des trois fractions oxygénées (175 mg, 51 mg et 102 mg) nous a conduit à caractériser 14 nouveaux composés oxygénés, tous présents dans nos bibliothèques de spectres. Parmi ceux-ci, on peut citer divers alcools sesquiterpéniques possédant le squelette bicyclo[4.4.0]décanique, comme l' α -cadinol, le β -eudesmol ou le sélin-11-èn-4 α -ol.

| Composés | IK | | F1 | F2 | F3 | F4 | |
|-----------------------------------|----------|---------|---------------|-------|-------------|-------------|-------|
| | | | Masse (mg) | 553 | 175 | 51 | 102 |
| | | | Pentane/Ether | 100/0 | 90/10 | 90/10 | 50/50 |
| | | | Solvant (ml) | 500 | 100 | 200 | 350 |
| Composés | IK | | | | | | |
| | Apolaire | Polaire | | | | | |
| nonène | 883 | 936 | 0,2 | - | - | - | |
| α -thujène | 924 | 1029 | 0,5 | - | - | - | |
| α -pinène | 932 | 1029 | 6,0 | - | - | - | |
| octèn-3-ol | 961 | 1441 | - | - | - | 1,3 | |
| sabinène | 967 | 1127 | 1,7 | - | - | - | |
| β -pinène | 974 | 1118 | 16,3 | - | - | - | |
| myrcène | 982 | 1152 | 1,2 | - | - | - | |
| α -terpinène | 1011 | 1186 | 0,6 | - | - | - | |
| p-cymène | 1014 | 1277 | 2,0 | - | - | - | |
| 1,8-cinéole | 1023 | 1217 | - | 86,9 | 12,1 | - | |
| limonène* | 1024 | 1207 | 6,4 | - | - | - | |
| β -phellandrène* | 1024 | 1215 | 0,6 | - | - | - | |
| γ -terpinène | 1050 | 1250 | 1,4 | - | - | - | |
| <i>trans</i> -hydrate de sabinène | 1053 | 1456 | - | - | - | 0,4 | |
| terpinolène | 1080 | 1288 | 0,4 | - | - | - | |
| <i>nonaldéhyde</i> | 1083 | 1400 | - | 0,5 | 0,8 | - | |
| linalol | 1086 | 1550 | - | - | 0,4 | 14,4 | |
| <i>fenchol</i> | 1100 | 1571 | - | - | 0,3 | 0,1 | |
| <i>trans</i> -pinocarvéol | 1124 | 1640 | - | - | - | 0,6 | |
| <i>lavandulol</i> * | 1148 | 1662 | - | - | - | 0,3 | |
| bornéol | 1148 | 1697 | - | - | 0,1 | - | |
| terpinèn-4-ol | 1167 | 1607 | - | - | 7,0 | 9,1 | |
| α -terpinéol | 1174 | 1698 | - | - | - | 5,8 | |
| <i>myrténol</i> | 1180 | 1775 | - | - | - | 0,4 | |
| <i>géraniol</i> | 1234 | 1829 | - | - | - | 0,5 | |
| α -cubébène | 1350 | 1459 | 0,4 | - | - | - | |
| <i>acétate de géranyle</i> | 1360 | 1744 | - | - | 0,5 | - | |
| α -ylangène | 1373 | 1485 | 0,4 | - | - | - | |
| α -copaène | 1377 | 1494 | 0,9 | - | - | - | |
| β -bourbonène | 1385 | 1520 | 0,2 | - | - | - | |
| β -élémente | 1389 | 1593 | 0,9 | - | - | - | |
| β -ylangène | 1420 | 1573 | 0,6 | - | - | - | |
| (E)-caryophyllène* | 1423 | 1601 | 14,6 | - | - | - | |
| β -copaène | 1429 | 1593 | 1,2 | - | - | - | |
| aromadendrène | 1440 | 1607 | 1,0 | - | - | - | |

| | | | | | | |
|--|------|------|-------------|------|-------------|---------------------------|
| α -humulène | 1457 | 1674 | 21,1 | - | - | - |
| γ -muurolène | 1474 | 1688 | 2,6 | - | - | - |
| β -sélinène | 1485 | 1720 | 2,3 | - | - | - |
| lédène* | 1495 | 1694 | 0,4 | - | - | - |
| α -sélinène + α -muurolène* | 1495 | 1725 | 2,9 | - | - | - |
| <i>(E,E)-α-farnésène</i> | 1502 | 1749 | 0,2 | - | - | - |
| γ -cadinène | 1509 | 1760 | 1,2 | - | - | - |
| <i>calaménène</i> [†] | 1512 | 1833 | 0,4 | - | - | - |
| δ -cadinène | 1517 | 1758 | 2,4 | - | - | - |
| spathuléol | 1566 | 2131 | - | - | - | 4,7 |
| <i>palustrol</i> | 1567 | 1912 | - | - | 0,3 | - |
| globulol | 1575 | 2081 | - | - | - | 2,1 |
| oxyde de caryophyllène | 1577 | 1992 | - | - | 19,1 | - |
| 6,7-époxyde d'humulène | 1603 | 2052 | - | - | 23,0 | - |
| <i>cubénol</i> | 1612 | 2047 | - | - | 2,6 | - |
| <i>épi-cubénol</i> | 1616 | 2054 | - | - | 2,4 | - |
| caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5 α -ol | 1622 | 2282 | - | - | - | 2,2 |
| τ -cadinol* | 1637 | 2177 | - | - | - | 3,6 |
| α -eudesmol* | 1637 | 2207 | - | - | - | 4,5 |
| <i>α-cadinol*</i> | 1641 | 2217 | - | - | - | } 7,4 [#] |
| <i>β-eudesmol*</i> | 1641 | 2217 | - | - | - | |
| <i>sélin-11-èn-4α-ol*</i> | 1641 | 2238 | - | - | - | 1,9 |
| <i>géranyl-p-cymène</i> | 1940 | 2301 | 0,4 | - | - | - |
| <i>géranyl-α-terpinène</i> | 1944 | 2215 | 0,7 | - | - | - |
| Total | | | 92,1 | 87,4 | 68,6 | 59,3 |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ^{13}C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement sont en italique.* F1 à F4 : quatre fractions obtenues par chromatographie sur colonne. [†] : Isomère non déterminé. [#] : Rapport de 1,9/0,9 (intensités relatives moyennes) entre le β -eudesmol et l' α -cadinol estimé par RMN du carbone-13.

Tableau XII : composés identifiés dans la chromatographie sur colonne « flash » de l'huile essentielle commerciale d'*Helichrysum bracteiferum* (B2).

b. Etude de la fraction hydrocarbonée de l'huile essentielle.

Etant donné son importance, puisqu'elle représente environ les deux tiers de

l'huile essentielle, il nous a paru intéressant d'étudier en détail la fraction hydrocarbonée par un fractionnement plus poussé. Nous souhaitons ainsi confirmer par RMN du carbone-13 la présence de certains composés sesquiterpéniques et éventuellement identifier de nouveaux constituants. Nous avons donc réalisé une seconde chromatographie sur colonne « flash » de l'huile essentielle (B2, 5 g) : deux fractions ont été obtenues, une au pentane contenant les hydrocarbures (3,14 g) et l'autre à l'oxyde de diéthyle contenant les composés oxygénés (1,5 g). Une partie de la fraction hydrocarbonée (2 g) a été ensuite chromatographiée avec de la silice plus fine imprégnée de nitrate d'argent (Figure 45). L'élution au pentane conduit à 16 fractions (Tableau XIII). Les différentes fractions ont été analysées par CPG/IK, CPG/SM et 8 d'entre-elles l'ont été par RMN du carbone-13.

Nous avons pu ainsi identifier 12 nouveaux composés hydrocarbonés par rapport à la première chromatographie. Chacun de ces constituants est présent dans nos bibliothèques « Arômes » (SM) et « Terpènes » (RMN ^{13}C). On peut citer par exemple l'alloaromadendrène, le β -bisabolène ou l' α -cadinène. En ce qui concerne le β -copaène, l' α et le β -ylangène, il a été possible, dans certaines fractions de confirmer la présence de ces molécules par RMN du carbone-13, en comparant les valeurs de leurs déplacements chimiques avec celles de la littérature (voir paragraphe c). De même, nous avons pu caractériser les deux isomères cis et trans du calaménène qui possèdent des spectres de masse et des indices de rétention identiques, grâce aux valeurs de leurs déplacements chimiques.

| Composés | Masse (mg) | | F1.1 | F1.2 | F1.3 | F1.4 | F1.5 | F1.6 | F1.7 | F1.8 | F1.9 | F1.10 | F1.11 | F1.12 | F1.13 | F1.14 | F1.15 | F1.16 | |
|----------------------------|------------|---------|-------------|------|------|--------------|--------------|------|------------|------|------|-------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| | IK | | 64 | 72 | 62 | 62 | 74 | 133 | 156 | 149 | 140 | 139 | 161 | 54 | 76 | 168 | 99 | 71 | |
| | Apolaire | Polaire | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| nonène | 883 | 936 | 1,1 | 0,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -thujène | 922 | 1028 | - | - | 0,7 | 1,1 | 0,7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -pinène | 933 | 1027 | 37,9 | 13,0 | 8,6 | 5,1 | 1,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -fenchène | 941 | 1062 | - | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| camphène | 945 | 1075 | 0,3 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 0,7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β -pinène + sabinène | 972 | 1117 | 7,2 | 57,8 | 52,5 | 49,6† | 30,9† | 4,1 | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| myrcène | 982 | 1165 | - | - | - | - | - | - | 0,2 | 1,1 | 1,7 | 2,3 | 2,7 | 0,4 | 0,3 | - | - | - | - |
| α -phellandrène | 999 | 1171 | - | - | - | - | 0,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -terpinène | 1010 | 1187 | - | - | - | - | - | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 0,7 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - |
| p-cymène | 1014 | 1277 | - | - | - | - | 1,7 | 2,3 | 1,5 | 1,8 | 3,4 | 4,6 | 5,6 | 1,7 | 1,0 | 0,2 | - | - | - |
| limonène* | 1022 | 1206 | - | 0,7 | 0,9 | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 9,1 | 12,6 | 11,8 | 13,5 | 8,6 | 0,7 | 0,2 | - | - | - | - |
| β -phellandrène* | 1022 | 1215 | - | - | - | 0,6 | 3,9 | 1,4 | 0,8 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (E)- β -ocimène | 1037 | 1253 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,7 | 0,2 | 0,4 | - | - | - | - |
| γ -terpinène | 1050 | 1249 | - | - | - | - | 2,0 | 4,0 | 3,6 | 3,3 | 2,0 | 0,8 | 0,4 | - | - | - | - | - | - |
| terpinolène | 1079 | 1286 | - | - | - | - | - | 0,2 | 0,3 | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1,2 | - | - | - | - | - | - |
| α -cubébène | 1351 | 1458 | - | - | 0,4 | 0,6 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -ylangène | 1370 | 1487 | 11,9 | 2,5 | 2,6 | 1,6 | 0,8 | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| isolédène | 1375 | 1470 | 1,5 | 0,7 | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 0,3 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -copaène | 1379 | 1499 | 26,3 | 6,6 | 6,5 | 3,9 | 1,7 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β -élémente | 1388 | 1589 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,6 | 2,0 | 1,7 | 1,1 | 0,4 | - | - |
| β -bourbonène | 1389 | 1515 | 0,5 | 1,1 | 2,4 | 2,0 | 1,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| sativène | 1392 | 1529 | 1,9 | 0,5 | 0,5 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β -ylangène | 1417 | 1570 | - | 3,1 | 5,5 | 4,3 | 3,8 | 0,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|------|------|-----|-----|-----|-------------|-------------|------|-------------|------|------|-------------|--------------|------|------|------|-------------|-------------|
| (E)-caryophyllène | 1423 | 1600 | - | - | - | - | 4,2 | 43,3 | 41,1 | 37,3 | 35,9 | 30,1 | 12,6 | 0,7 | - | - | - | - |
| β-copaène | 1428 | 1592 | 0,8 | 8,4 | 9,8 | 7,6 | 6,6 | 1,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| aromadendrène | 1441 | 1610 | - | - | 2,0 | 12,7 | 14,6 | 5,7 | 3,3 | 2,1 | 1,2 | 0,6 | - | - | - | - | - | - |
| α-humulène | 1454 | 1670 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 21,7 | 79,3 | 89,6 | 94,2 | 88,4 | 51,1 |
| <i>alloaromadendrène</i> | 1459 | 1647 | - | - | - | 1,8 | 2,7 | 1,0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>γ-gurjunène*</i> | 1469 | 1651 | - | - | 0,2 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| γ-muuroolène* | 1469 | 1684 | - | - | - | 0,3 | 1,5 | 8,6 | 7,6 | 7,5 | 7,6 | 7,1 | 3,9 | 0,5 | 0,1 | - | - | - |
| β-sélinène | 1484 | 1721 | - | - | - | - | - | 2,8 | 5,8 | 6,1 | 6,3 | 7,6 | 5,7 | 1,0 | 0,2 | - | - | - |
| lédène* | 1493 | 1696 | - | - | - | - | 2,4 | 2,2 | 1,9 | 1,9 | 1,7 | 1,4 | 0,7 | - | - | - | - | - |
| α-sélinène + α-muuroolène* | 1493 | 1724 | - | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 2,9 | 5,3# | 6,6 | 7,4 | 9,2# | 10,3‡ | 2,9 | 1,1 | - | - | - |
| (E,E)-α-farnésène | 1495 | 1747 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,6 | 1,3 |
| <i>β-bisabolène</i> | 1500 | 1722 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,4 | 0,8 | 1,3 |
| γ-cadinène | 1508 | 1762 | - | - | - | - | - | 0,3 | 2,2 | 3,3 | 4,1 | 5,6 | 6,1 | 1,5 | 0,4 | - | - | - |
| <i>trans-calaménène</i> | 1511 | 1835 | - | - | - | - | 1,5 | 0,7 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>cis-calaménène</i> | 1511 | 1835 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,7 | 2,7 | 2,1 | 1,4 | 0,6 | - | - |
| δ-cadinène | 1517 | 1762 | - | - | - | - | 0,9 | 7,2 | 7,3 | 7,2 | 7,6 | 7,9 | 5,7 | 1,3 | 0,8 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| <i>α-cadinène</i> | 1532 | 1793 | - | - | - | - | - | - | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 1,1 | 1,6 | - | - | - | - | - |
| géranyl-p-cymène | 1938 | 2298 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,0 | 3,0 | 8,4 |
| géranyl-α-terpinène | 1942 | 2213 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,5 | 4,5 | 10,6 |

Total 89,4 96,3 95,0 95,2 87,5 92,3 92,7 93,7 93,2 93,8 91,8 94,3 97,2 99,4 98,1 73,1

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ¹³C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement sont en italique.* F1.1 à F1.16 : seize fractions obtenues par chromatographie sur colonne. † : Identification du β-pinène et du sabinène en RMN du ¹³C. # : Identification de l'α-sélinène et de l'α-muuroolène en RMN du ¹³C. ‡ : Identification de l'α-sélinène en RMN du ¹³C.

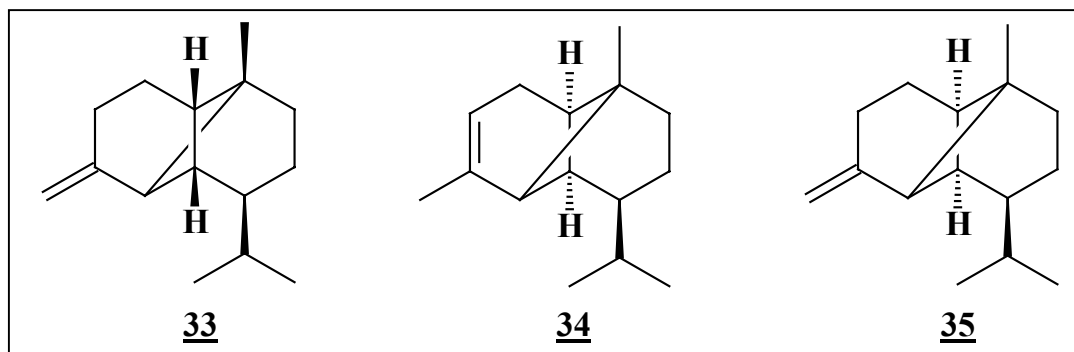
Tableau XIII : composés identifiés dans la fraction hydrocarbonée de l'huile essentielle d'*Helichrysum bracteiferum* (B2).

c. Analyses spectrales : identification des constituants de l'huile essentielle d'*Helichrysum bracteiferum*.

L'étude par CPG/SM des fractions hydrocarbonées 1 et 4 (Tableau XIII) nous a permis d'identifier trois nouveaux sesquiterpènes tricycliques de formule brute $C_{15}H_{24}$, possédant le squelette tricyclo[4.4.0.0^{2,7}]décanique (copaane) : le β -copaène **33**, l' α et le β -ylangène (**34** et **35**). En effet, on note une très bonne corrélation entre les spectres de masse expérimentaux et ceux décrits dans la littérature (20). Les spectres de RMN du carbone-13 de ces deux fractions hydrocarbonées nous ont permis de confirmer chacune de ces structures : les déplacements chimiques du β -copaène et du β -ylangène décrits dans la littérature par Joulain et König (20) et ceux de l' α -ylangène décrits par De Buyck et coll. (394), sont conformes aux déplacements chimiques de nos trois molécules présentes dans l'huile essentielle d'*Helichrysum bracteiferum* (Figure 46).

d. Bilan de l'analyse de l'huile essentielle d'*H. bracteiferum*.

L'analyse de l'huile essentielle commerciale d'*Helichrysum bracteiferum* (B2), nous a permis d'identifier 70 constituants représentant 92,9% de la composition chimique (Tableau XIV). Les constituants majoritaires sont le 1,8-cinéole (19,4%), l' α -humulène (13,5%), le β -pinène (12,5%), le (E)-caryophyllène (9,7%) et l' α -pinène (5,1%). Cette composition chimique est proche de l'huile essentielle qui nous a été fournie par le C.N.A.R.P. (B1) et elles s'accordent toutes les deux avec celle décrite par Ramanoelina et coll. (377). Cependant, plusieurs sesquiterpènes hydrocarbonés (le β -élémane, le β -ylangène, le β -copaène, l' α -muurolène et le D-germacrène), oxygénés (le spathulénol, le globulol, le 6,7-époxyde d'humulène et le τ -cadinol), deux diterpènes (le géranyl-p-cymène et le géranyl- α -terpinène) et l'acétate d'eugényle sont présents dans nos échantillons dans des proportions modérées à la différence de celui décrit dans la littérature (377).



| C | δ (20) | δ 33 (ppm) | δ (394) | δ 34 (ppm) | δ (20) | δ 35 (ppm) |
|----|---------------|--|----------------|--------------------------|---------------|--|
| 1 | 151,99 | 152,00 | 142,6 | 142,60 | 151,66 | 151,55 |
| 2 | 105,82 | 105,81 | 117,1 | 117,09 | 106,15 | 106,18 |
| 3 | 59,74 | 59,72 | 48,3 | 48,26 | 48,35 | 48,37 |
| 4 | 43,80 | 43,76 | 45,5 | 45,41 | 48,19 | 48,25 |
| 5 | 42,71 | 42,70 | 44,7 | 44,68 | 44,41 | 44,44 |
| 6 | 40,82 | 40,77 | 43,2 | 43,10 | 42,79 | 42,79 |
| 7 | 36,72 | 36,67 | 39,4 | 39,40 | 40,95 | 41,02 |
| 8 | 36,57 | 36,54 | 36,7 | 36,66 | 36,73 | 36,76 |
| 9 | 32,45 | 32,44* | 32,6 | 32,52 | 32,44 | 32,44* |
| 10 | 24,29 | 24,28 | 30,9 | 30,87 | 24,20 | 24,21 |
| 11 | 22,35 | 22,33 | 23,3 | 23,27 | 22,95 | 22,98 |
| 12 | 21,75 | 21,74 | 22,2 | 22,18 | 21,90 | 21,92 |
| 13 | 20,07 | 20,03* | 19,9 | 19,95 | 20,04 | 20,03* |
| 14 | 19,90 | 19,90 ^{Ω} | 19,5 | 19,50 | 19,90 | 19,90 ^{Ω} |
| 15 | 19,58 | 19,56 ^{\diamond} | 19,1 | 19,10 | 19,58 | 19,56 ^{\diamond} |

Carbones superposés : *, *, ^{Ω} et ^{\diamond} .

Figure 46 : structure et déplacements chimiques du β -copaène **33**, de l' α et du β -ylangène (**34** et **35**) mesurés dans l'huile essentielle d'*Helichrysum bracteiferum* (δ **33-35**) et décrits dans la littérature (20, 394).

| Composés | IK | | B1 | B2 |
|---|----------|---------|-------------|-------------|
| | Apolaire | Polaire | | |
| | nonène | 881 | 930 | - |
| α -thujène | 923 | 1022 | 0,6 | 0,5 |
| α -pinène | 931 | 1022 | 5,4 | 5,1 |
| <i>α-fenchène</i> | 942 | 1056 | - | tr |
| <i>camphène</i> | 944 | 1065 | - | 0,1 |
| octèn-3-ol | 961 | 1441 | - | 0,2 |
| sabinène | 966 | 1119 | 2,0 | 1,3 |
| β -pinène | 973 | 1113 | 11,9 | 12,5 |
| myrcène | 982 | 1159 | 1,1 | 0,9 |
| <i>α-phellandrène</i> | 998 | 1163 | - | tr |
| α -terpinène | 1010 | 1179 | 0,5 | 0,7 |
| p-cymène | 1014 | 1269 | 2,0 | 0,8 |
| limonène* | 1024 | 1202 | 4,0 | 4,4 |
| 1,8-cinéole* | 1024 | 1213 | 27,3 | 19,4 |
| β -phellandrène* | 1024 | 1214 | - | 0,2 |
| <i>(E)-β-ocimène</i> | 1037 | 1247 | - | 0,2 |
| γ -terpinène | 1049 | 1242 | 0,7 | 1,4 |
| <i>trans-hydrate de sabinène</i> | 1053 | 1456 | - | tr |
| terpinolène | 1079 | 1279 | 0,2 | 0,3 |
| <i>nonaldéhyde</i> | 1083 | 1400 | - | 0,1 |
| linalol | 1085 | 1543 | 1,4 | 1,5 |
| <i>fenchol</i> | 1100 | 1571 | - | tr |
| <i>trans-pinocarvéol</i> | 1124 | 1640 | - | 0,1 |
| <i>lavandulol*</i> | 1148 | 1662 | - | tr |
| terpinèn-4-ol | 1162 | 1599 | 1,8 | 1,3 |
| α -terpinéol | 1174 | 1697 | 1,1 | 0,5 |
| <i>myrténol</i> | 1180 | 1786 | - | tr |
| <i>géraniol</i> | 1234 | 1829 | - | 0,1 |
| α -cubébène | 1349 | 1448 | - | 0,3 |
| <i>acétate de géranyle</i> | 1360 | 1744 | - | tr |
| <i>α-ylangène</i> | 1371 | 1472 | - | 0,3 |
| <i>isolédène</i> | 1375 | 1470 | - | 0,1 |
| α -copaène | 1376 | 1482 | 0,3 | 0,6 |
| <i>β-bourbonène</i> | 1384 | 1508 | - | 0,1 |
| β -élémente | 1388 | 1589 | 0,8 | 0,2 |
| <i>sativène</i> | 1392 | 1529 | - | 0,1 |
| <i>β-ylangène</i> | 1421 | 1561 | - | 0,6* |
| (E)-caryophyllène | 1421 | 1587 | 7,1* | 9,7* |
| <i>β-copaène</i> | 1427 | 1582 | - | 0,8 |
| aromadendrène | 1438 | 1600 | 1,0 | 0,5 |
| α -humulène | 1454 | 1660 | 10,1 | 13,5 |
| <i>alloaromadendrène</i> | 1458 | 1630 | - | 0,1 |
| <i>γ-gurjunène</i> | 1460 | 1651 | - | tr |
| γ -muurolène | 1472 | 1684 | 0,9 | 1,7 |

| | | | | |
|--|------|------|------------------|------------------------|
| D-germacrène | 1479 | 1705 | 1,4 | - |
| β -sélinène | 1483 | 1706 | 1,2 | 1,4 |
| acétate d'eugényle | 1486 | 2263 | 0,2 | - |
| lédène | 1492 | 1683 | - | 0,5* |
| α -sélinène + α -muurolène | 1492 | 1724 | - | 1,9* |
| bicyclogermacrène | 1494 | 1729 | 1,3* | - |
| <i>(E,E)-α-farnésène</i> | 1495 | 1747 | - | <i>tr</i> |
| <i>β-bisabolène</i> | 1502 | 1715 | - | 0,2 |
| γ -cadinène | 1507 | 1760 | 0,5 | 0,8 |
| <i>trans-calaménène</i> | 1510 | 1821 | 0,2 [†] | 0,1[#] |
| <i>cis-calaménène</i> | 1510 | 1821 | - | 0,3[#] |
| δ -cadinène | 1515 | 1758 | 0,9 | 1,7 |
| <i>α-cadinène</i> | 1532 | 1793 | - | 0,2 |
| spathuléol | 1564 | 2129 | 1,4 | 0,4 |
| <i>palustrol</i> | 1567 | 1912 | - | tr |
| oxyde de caryophyllène | 1572 | 1976 | 0,8* | 1,0 |
| globulol | 1575 | 2081 | 0,4* | 0,2 |
| 6,7-époxyde d'humulène | 1596 | 2034 | 1,1 | 1,1 |
| <i>cubénol</i> | 1612 | 2047 | - | 0,1 |
| <i>épi-cubénol</i> | 1616 | 2054 | - | 0,1 |
| caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5 α -ol | 1622 | 2282 | - | 0,2 |
| τ -cadinol* | 1637 | 2177 | 0,2 | 0,4 |
| α -eudesmol* | 1637 | 2207 | - | 0,5 |
| <i>α-cadinol*</i> | 1641 | 2217 | - | } 0,8 |
| <i>β-eudesmol*</i> | 1641 | 2217 | 0,5 | |
| <i>sélina-11-èn-4α-ol*</i> | 1641 | 2238 | - | 0,2 |
| <i>géranyl-p-cymène</i> | 1939 | 2294 | - | 0,1 |
| <i>géranyl-α-terpinène</i> | 1943 | 2219 | - | 0,3 |
| Total | | | 90,3 | 92,9 |

B1 : Huile essentielle fournie par le C.N.A.R.P. B2 : Huile essentielle commerciale. Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ^{13}C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement de l'huile essentielle B2 sont en italique.* Les pourcentages des composés identifiés par RMN du carbone-13 après fractionnement sont en gras italique. [†] : Isomère non déterminé. tr : Composés à l'état de trace (<0,1%). [#] : Pourcentages recalculés à partir des fractions F1.5-F1.9 pour l'isomère trans et des fractions F1.10-F1.14 pour l'isomère cis (la somme de ces deux pourcentages correspond exactement au pourcentage présent sur le profil chromatographique de l'huile essentielle B2).

Tableau XIV : composés identifiés dans l'huile essentielle d'*H. bracteiferum*.

3. Composition chimique de l'huile essentielle d'*H. faradifani*.

A notre connaissance, l'huile essentielle de cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude. Nous disposons de deux nouveaux échantillons : l'un fourni par le C.N.A.R.P. en faible quantité (C1) et l'autre commercial (C2), en quantité suffisante pour qu'il soit possible de réaliser un fractionnement.

En ce qui concerne l'huile essentielle fournie par le C.N.A.R.P., on est en présence d'une composition chimique dominée par le (E)-caryophyllène (33,9%) et le linalol (16,0%). L' α -humulène (5,4%), le limonène (4,6%) et l'oxyde de caryophyllène (4,5%) sont les autres constituants importants de cette huile essentielle. N'ayant pas fractionné cette huile essentielle, nous donnons sa composition résultant de l'analyse par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13.

L'huile essentielle commerciale d'*Helichrysum faradifani* est caractérisée par une teneur importante en α -fenchène (32,3%). Ce monoterpène hydrocarboné possédant le squelette bicyclo[2.2.1]heptane a pu être identifié en spectrométrie de masse et en RMN du carbone-13 grâce à nos bibliothèques « littérature » (voir paragraphe c). Cette huile essentielle est également riche en γ -curcumène (19,4%) et en (E)-caryophyllène (14,2%). Pour cette huile essentielle commerciale nous avons suivi le même schéma de fractionnement que pour *H. bracteiferum* (Figure 47).

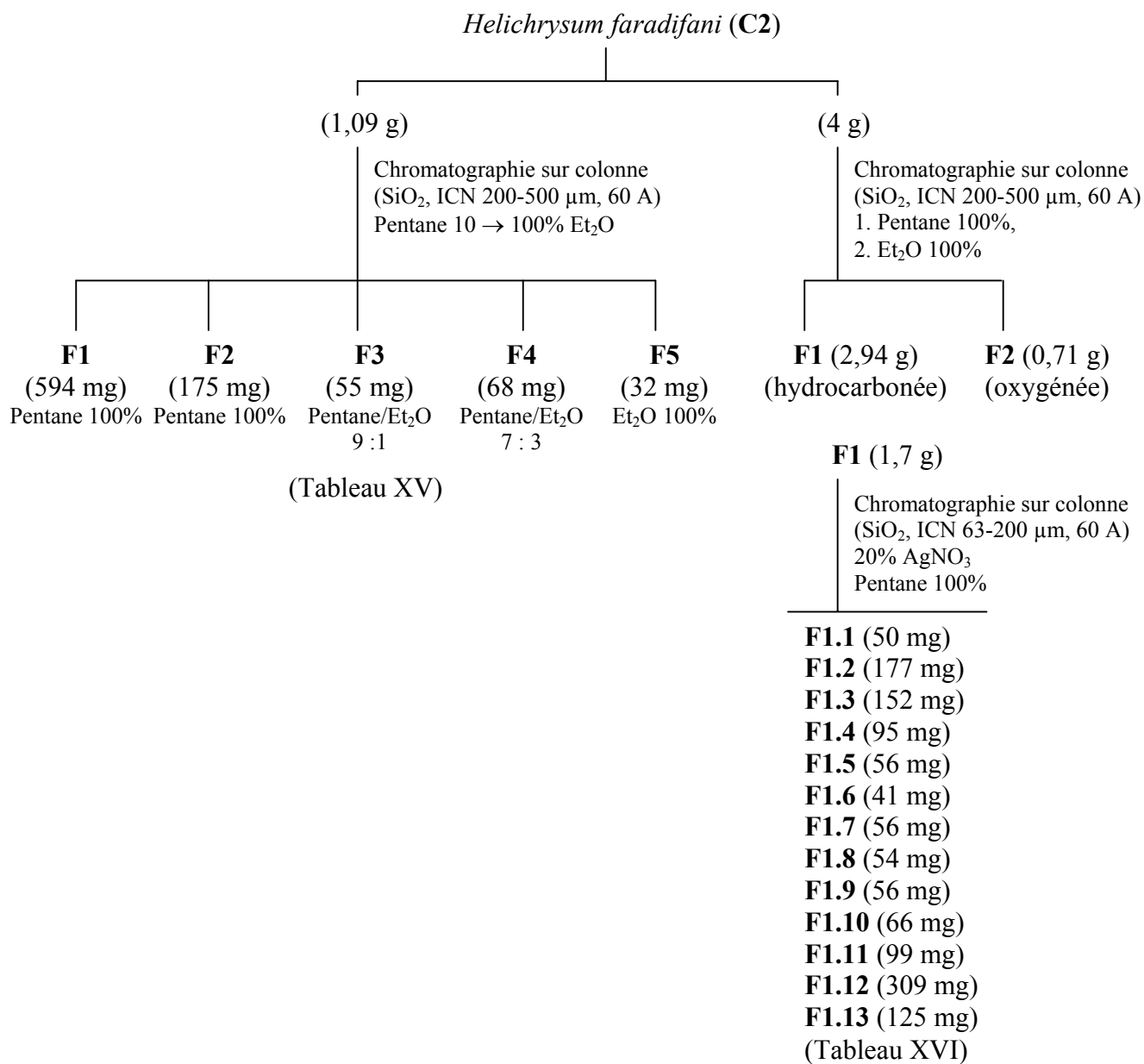


Figure 47 : schéma de fractionnement de l'huile essentielle d'*Helichrysum faradifani* (C2).

a. Chromatographie sur colonne de silice « flash » de l'huile essentielle.

L'huile essentielle d'*Helichrysum faradifani* (C2, 1,09 g) a été fractionnée sur colonne de silice avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (Figure 47). L'étude des deux fractions hydrocarbonées (F1, 594 mg et F2, 175 mg) dont l' α -fenchène et le γ -curcumène sont les deux composés majoritaires, nous a conduit à l'identification de cinq nouveaux constituants (Tableau XV), dont l' α et le β -himachalène possédant le squelette bicyclo[5.4.0]undécannique.

L'analyse des trois fractions oxygénées [F3 (55 mg), F4 (68 mg) et F5 (32 mg)] nous a amené à caractériser six nouveaux composés oxygénés. La fraction F3 est riche en esters : acétate de lavandulyle, acétate de fenchyle et acétate de bornyle. On retrouve également quelques oxydes et des composés cétoniques en plus faible proportion (oxyde de caryophyllène, 1,8-cinéole, nonan-2-one, octan-2-one). Enfin, les fractions F4 et F5 sont caractérisées par la prédominance d'alcools monoterpéniques et sesquiterpéniques, tels que le linalol, l' α -terpinéol, le lavandulol, le bornéol, le fenchol, l' α et le β -bisabolol.

Enfin, l'étude de la fraction oxygénée F4 (68 mg) par CPG/SM et RMN du carbone-13, nous amène à supposer la présence d'un monoterpène oxygéné (28,1%) de formule brute $C_{10}H_{18}O$ dont la structure est proposée dans le paragraphe c.

| Composés | | | | | | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 |
|---|----------|---------|-------------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------|-------|
| | | | | | | 594 | 175 | 55 | 68 | 32 |
| | | | | | | 100/0 | 100/0 | 90/10 | 70/30 | 0/100 |
| | | | | | | - | 400 | 200 | 250 | 300 |
| Composés | IK | | | | | | | | | |
| | Apolaire | Polaire | | | | | | | | |
| α -pinène | 931 | 1027 | 2,0 | - | - | - | - | - | - | |
| α -fenchène | 945 | 1069 | 40,1 | 1,7 | - | - | - | - | - | |
| camphène | 945 | 1074 | 0,6 | - | - | - | - | - | - | |
| <i>octèn-3-ol</i> | 961 | 1441 | - | - | - | - | 0,3 | - | - | |
| <i>octan-2-one</i> | 968 | 1281 | - | - | 0,2 | - | - | - | - | |
| β -pinène | 971 | 1115 | 1,5 | 0,1 | - | - | - | - | - | |
| myrcène | 981 | 1164 | 0,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | |
| α -phellandrène | 998 | 1169 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | |
| <i>acétate d'hexyle</i> | 999 | 1269 | - | - | 0,2 | - | - | - | - | |
| p-cymène | 1013 | 1275 | 0,3 | 0,8 | - | - | - | - | - | |
| limonène* | 1022 | 1205 | 3,6 | 1,7 | - | - | - | - | - | |
| 1,8-cinéole | 1022 | 1212 | - | - | 3,0 | - | - | - | - | |
| β -phellandrène* | 1022 | 1214 | 0,3 | 0,1 | - | - | - | - | - | |
| (E)- β -ocimène | 1037 | 1253 | 0,2 | 0,2 | - | - | - | - | - | |
| <i>nonan-2-one</i> | 1070 | 1384 | - | - | 0,5 | - | - | - | - | |
| terpinolène | 1079 | 1286 | 0,3 | 0,2 | - | - | - | - | - | |
| linalol | 1086 | 1539 | - | - | - | - | 15,7 | - | - | |
| fenchol | 1101 | 1573 | - | - | - | - | 2,4 | - | - | |
| monoterpène oxygéné (C ₁₀ H ₁₈ O) | 1111 | 1569 | - | - | - | - | 28,1 | - | - | |
| lavandulol* | 1150 | 1664 | - | - | - | - | 4,4 | 1,5 | - | |
| bornéol* | 1150 | 1687 | - | - | - | - | 4,2 | - | - | |
| terpinèn-4-ol | 1163 | 1591 | - | - | - | - | 2,6 | - | - | |
| α -terpinéol | 1174 | 1683 | - | - | - | - | 1,6 | 23,8 | - | |
| acétate de fenchyle | 1208 | 1467 | - | - | 3,5 | - | - | - | - | |
| acétate de bornyle | 1271 | 1575 | - | - | 3,0 | - | - | - | - | |
| acétate de lavandulyle | 1278 | 1604 | - | - | 45,8 | - | - | - | - | |
| α -copaène* | 1376 | 1492 | 1,0 | - | - | - | - | - | - | |
| isoitalicène* | 1376 | 1498 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | |
| italicène | 1408 | 1542 | 1,3 | - | - | - | - | - | - | |
| α -cédrène | 1413 | 1565 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | |
| (E)-caryophyllène | 1421 | 1598 | 17,6 | 17,3 | - | - | - | - | - | |
| trans- α -bergamotène | 1433 | 1585 | 0,6 | 0,1 | - | - | - | - | - | |
| <i>α-guaiène</i> | 1436 | 1591 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | |
| <i>α-himachalène</i> | 1446 | 1638 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | |
| α -humulène | 1455 | 1669 | 0,5 | 5,8 | - | - | - | - | - | |
| <i>alloaromadendrène</i> | 1463 | 1641 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | |
| γ -muurolène* | 1475 | 1684 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | |
| γ -curcumène* | 1475 | 1690 | 14,5 | 46,1 | - | - | - | - | - | |
| α -curcumène* | 1475 | 1775 | 1,7 | 16,4 | - | - | - | - | - | |

| | | | | | | | |
|---------------------------------------|------|------|------------|------------|------------|------------|------|
| β -sélinène | 1485 | 1716 | 0,7 | 0,4 | - | - | - |
| <i>β-himachalène</i> | 1497 | 1705 | 0,2 | 0,1 | - | - | - |
| β -bisabolène | 1501 | 1724 | 1,2 | 3,3 | - | - | - |
| γ -cadinène | 1507 | 1758 | 0,3 | 0,2 | - | - | - |
| <i>calaménène</i> [†] | 1510 | 1834 | - | 0,1 | - | - | - |
| δ -cadinène | 1515 | 1755 | 0,7 | 0,6 | - | - | - |
| <i>(E)-nérolidol</i> | 1546 | 2029 | - | - | - | 1,2 | - |
| oxyde de caryophyllène | 1571 | 1973 | - | - | 5,0 | 0,4 | - |
| <i>τ-cadinol</i> | 1639 | 2160 | - | - | - | 0,5 | - |
| β -bisabolol | 1653 | 2143 | - | - | - | 3,5 | - |
| α -bisabolol | 1667 | 2206 | - | - | - | 6,5 | - |
| Total | | | 91,3 | 95,4 | 61,2 | 71,4 | 25,3 |

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ¹³C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement sont en italique.* F1 à F5 : cinq fractions obtenues par chromatographie sur colonne (silice ICN 200-500 μ m, 60 A). [†] : Isomère non déterminé.

Tableau XV : composés identifiés dans la chromatographie sur colonne « flash » de l'huile essentielle d'*Helichrysum faradifani* (C2).

b. Etude de la fraction hydrocarbonée de l'huile essentielle.

Toujours à cause de son importance dans l'huile essentielle, nous nous sommes proposés d'étudier plus finement la fraction hydrocarbonée. Ainsi, après avoir réalisé une seconde chromatographie sur colonne « flash » de l'huile essentielle (C2, 4 g), nous avons chromatographié une partie de la fraction hydrocarbonée obtenue (1,7 g) avec de la silice plus fine imprégnée de nitrate d'argent (Figure 47). Cela nous a permis d'obtenir 13 fractions (Figure 47 et Tableau XVI). Les différentes fractions ont été analysées par CPG/IK, CPG/SM et 8 l'ont été par RMN du carbone-13.

Ces analyses nous ont permis d'identifier 34 oléfines dont quatre nouveaux constituants par rapport à la chromatographie « flash » : le β -cédrène, le trans- β -farnésène, le (E)- α -bisabolène et le γ -himachalène.

| Composés | Masse (mg) | | F1.1 | F1.2 | F1.3 | F1.4 | F1.5 | F1.6 | F1.7 | F1.8 | F1.9 | F1.10 | F1.11 | F1.12 | F1.13 |
|------------------------------|------------|---------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|------|------|-------|-------------|-------------|------------|
| | IK | | 50 | 177 | 152 | 95 | 56 | 41 | 56 | 54 | 56 | 66 | 99 | 309 | 125 |
| | Apolaire | Polaire | | | | | | | | | | | | | |
| α -pinène | 931 | 1028 | 6,9 | 3,7 | 3,1 | 2,1 | 0,8 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - |
| α -fenchène | 944 | 1067 | 28,6 | 76,3 | 75,5 | 71,6 | 52,9 | 18,4 | 2,3 | 0,7 | 0,3 | - | - | - | - |
| camphène | 946 | 1074 | - | 0,8 | 1,3 | 1,3 | 0,8 | 0,6 | 0,1 | - | - | - | - | - | - |
| β -pinène | 971 | 1115 | - | 1,4 | 2,9 | 2,9 | 2,8 | 1,6 | 0,7 | - | - | - | - | - | - |
| myrcène | 982 | 1164 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,2 | 0,3 | 0,7 | 0,6 | - |
| α -phellandrène | 997 | 1168 | - | - | - | 0,3 | 1,1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| p-cymène | 1013 | 1275 | - | - | - | - | - | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,0 | 1,1 | 2,0 | 1,1 | - |
| limonène* | 1020 | 1204 | - | - | - | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 4,2 | 6,7 | 7,3 | 10,4 | 3,4 | - |
| β -phellandrène* | 1020 | 1213 | - | - | - | 0,4 | 1,6 | 0,5 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | - | - | - | - |
| (E)- β -ocimène | 1036 | 1251 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,4 | - |
| terpinolène | 1079 | 1285 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,2 | 0,8 | - |
| α -copaène* | 1379 | 1496 | 25,1 | 3,7 | 3,4 | 3,7 | 2,7 | 0,7 | 0,2 | - | - | - | - | - | - |
| isoitalicène* | 1379 | 1501 | 4,5 | 1,3 | 1,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| italicène | 1405 | 1543 | 1,3 | 5,4 | 5,5 | 7,3 | 10,0 | 3,9 | 1,0 | 0,7 | - | - | - | - | - |
| α -cédrène | 1414 | 1566 | 2,9 | 0,7 | 0,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (E)-caryophyllène | 1422 | 1601 | - | - | - | - | - | 26,5 | 52,2 | 60,5 | 52,3 | 55,5 | 61,3 | 17,0 | - |
| β -cédrène | 1428 | 1593 | - | - | - | - | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| trans- α -bergamotène | 1433 | 1582 | - | - | - | - | 2,4 | 6,8 | 3,1 | 2,6 | 2,0 | 2,1 | 1,3 | - | - |
| α -guaiène | 1436 | 1587 | - | - | - | - | 2,0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -himachalène | 1447 | 1637 | - | - | 0,5 | 2,1 | 3,6 | 0,7 | 1,2 | 1,1 | 0,8 | - | - | - | - |
| (E)- β -farnésène | 1447 | 1666 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,7 | 1,2 |
| α -humulène | 1452 | 1669 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,0 | 3,2 |
| alloaromadendrène | 1458 | 1640 | - | - | 0,1 | 0,9 | 1,7 | 1,0 | 0,6 | 0,7 | 0,3 | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------|------|---|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-------------|-------------|
| γ -muurolène | 1476 | 1687 | - | - | - | - | - | - | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | - | - |
| γ -curcumène* | 1477 | 1693 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 36,0 | 39,8 |
| α -curcumène* | 1477 | 1778 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 20,5 | 32,0 |
| <i>γ-himachalène</i> | 1479 | 1693 | - | - | - | - | - | 0,6 | 0,4 | 0,6 | 0,3 | - | - | - | - |
| β -sélinène* | 1484 | 1718 | - | - | - | - | - | - | 0,4 | 0,7 | 0,9 | 1,0 | 1,0 | - | - |
| β -himachalène | 1497 | 1704 | - | - | - | - | 1,5 | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - |
| β -bisabolène | 1503 | 1728 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,0 | 11,2 |
| γ -cadinène | 1507 | 1759 | - | - | - | - | - | - | - | 0,6 | 1,0 | 1,4 | 1,5 | 1,4 | - |
| calaménène ⁺ | 1510 | 1835 | - | - | - | - | - | 0,6 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | - | - | - |
| δ -cadinène | 1515 | 1757 | - | - | - | - | - | - | 0,8 | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 1,7 | 1,3 | - |
| <i>(E)-α-bisabolène</i> | 1533 | 1778 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,0 | 1,8 |

Total 69,3 93,3 94,4 92,7 84,7 64,3 66,7 76,2 68,6 71,3 81,0 91,2 89,2

Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ^{13}C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement sont en italique.* F1.1 à F1.13 : treize fractions obtenues par chromatographie sur colonne. ⁺ : Isomère non déterminé.

Tableau XVI : composés identifiés dans la fraction hydrocarbonée de l'huile essentielle d'*Helichrysum faradifani* (C2).

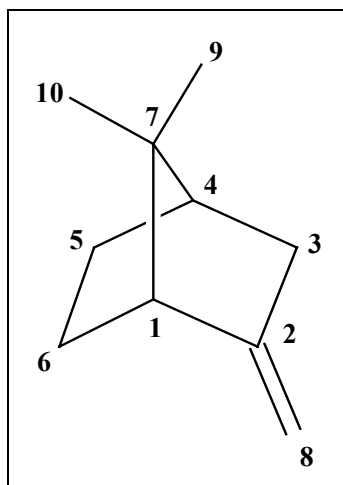
c. Analyses spectrales : identification des constituants de l'huile essentielle d'*Helichrysum faradifani*.

α -fenchène

L'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle, nous a permis après proposition d'une bibliothèque commerciale d'identifier un hydrocarbure monoterpénique de formule brute $C_{10}H_{16}$. L'étude du spectre de RMN du carbone-13 a confirmé ce composé, l' α -fenchène **36**, en comparant les valeurs de ses déplacements chimiques avec les valeurs des déplacements chimiques décrites dans la littérature (395). La structure et l'attribution des déplacements chimiques de cette molécule sont reportées dans la figure 48. Nous avons également réalisé une séquence spin-écho afin de préciser la multiplicité des différents signaux. Nous remarquons cependant que les variations des déplacements chimiques entre notre spectre et les valeurs de la littérature sont plus importantes que celles que nous observons habituellement. Ceci est certainement dû au fait qu'il s'agit d'une référence ancienne (1975) et qu'à cette époque les spectres étaient enregistrés avec des solutions beaucoup plus concentrées qu'aujourd'hui. Cependant, étant donné qu'il s'agit du composé majoritaire il n'y a aucun risque d'erreur sur le composé, ni sur l'attribution des déplacements chimiques des carbones.

exo-2,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol

L'analyse de la fraction oxygénée F4 (68 mg) en CPG/SM, laisse apparaître la présence d'un monoterpène oxygéné dont le spectre de masse est caractérisé par un pic moléculaire à m/z 154 ($C_{10}H_{18}O$), mais aucune proposition valable n'a été apportée après consultation des différentes bibliothèques de spectres que nous possédons au laboratoire.

**36**

| C | δ (395) | δ <u>36</u> (ppm) | |
|----|----------------|---------------------------------|---|
| 1 | 54,0 | 53,76 | d |
| 2 | 156,2 | 156,64 | s |
| 3 | 37,7 | 37,49 | t |
| 4 | 45,2 | 44,89 | d |
| 5 | 29,0* | 28,78* | t |
| 6 | 28,7* | 28,54* | t |
| 7 | 46,2 | 45,99 | s |
| 8 | 103,4 | 102,91 | t |
| 9 | 21,8** | 21,73** | q |
| 10 | 20,8** | 20,71** | q |

Les valeurs * et ** peuvent être interverties.

Figure 48 : structure et déplacements chimiques de l' α -fenchène **36** mesurés dans l'huile essentielle d'*Helichrysum faradifani* (δ **36**) et décrits dans la littérature (395).

Par ailleurs, le spectre de RMN du carbone-13 de la fraction oxygénée, présente une série distincte de 10 raies de résonance non attribuées. Une séquence spin-écho réalisée sur cet échantillon, nous informe de la présence de deux carbones quaternaires, de deux méthynes et de trois méthylènes, ainsi que trois groupements méthyles. Ces observations, associées à la présence d'un signal qui résonne à 79 ppm, confirment bien une structure ayant une formule brute $C_{10}H_{18}O$, en accord avec la SM.

La molécule possède donc deux centres d'insaturation. Cependant, les signaux observés dans le spectre RMN ne traduisent pas la présence de carbones sp^2 . Il s'agit donc d'un monoterpène bicyclique.

L'existence de deux groupements méthyles très proches (résonant chacun à 23,02 et 23,68 ppm), nous permet d'exclure toutes les structures du type pinane, carane, etc... En effet, le squelette de ces molécules présente deux méthyles géminés très différents (environ 4 à 5 ppm d'écart) essentiellement liés aux effets γ -stériques s'exerçant plus particulièrement sur l'un d'entre eux.

La possibilité d'avoir un motif isopropyle peut également être exclue, dans la mesure où nous ne retrouvons pas de méthine résonnant aux environs de 30 ppm. Il en est de même pour un motif isopropanolique (on aurait un carbone quaternaire à 70-75 ppm et des méthyles très déblindés, ce qui n'est pas le cas ici). En effet, le carbone de l'alcool tertiaire de notre molécule résonne à 79 ppm et un seul des trois méthyles observés résonne à 29 ppm. Ceci est caractéristique d'un méthyle substitué sur un carbone portant un hydroxyle (carbone lié à deux autres méthylènes).

Il reste la possibilité que la molécule que nous recherchons possède le squelette bicyclo[2.2.1]heptanique. Nous excluons cependant les squelettes camphanes et fenchanes car les effets β seraient incompatibles avec les valeurs que l'on retrouve. En tenant compte du spectre spin écho, nous nous orientons vers une structure de type triméthyl-2,7,7-bicyclo[2.2.1]heptanique.

De plus, la « similitude » des valeurs des déplacements chimiques observées dans la fraction F4 avec celles de deux stéréoisomères, l'exo- et l'endo-7,7-diméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ols **A** et **B** respectivement, décrites dans la littérature (395), nous laisse penser que la structure du composé recherché correspond à l'une des deux précédentes molécules dont le carbone C-2 aurait été substitué par un groupement méthyle.

L'étude des différents effets électroniques et stériques entre les deux molécules **A** et **B**, et l'ajout des effets α , β et γ du méthyle, nous ont permis d'attribuer la structure de l'exo-2,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol **37** (Figure 49). En effet, la différenciation des isomères exo et endo des deux molécules de référence **A** et **B**, a été faite en tenant compte de l'effet γ -blindant du groupement hydroxyle. Nous constatons pour le composé **B** un effet γ -stérique de $-6,8$ ppm du OH endo sur le carbone C-6 (auquel on peut retrancher un effet γ antipériplanaire du OH exo pour la molécule **A**) et un même effet γ beaucoup moins important ($-1,6$ ppm) du méthyle sur le carbone C-7 de la molécule **A**. A partir de ces valeurs, nous excluons l'isomère endo (**C**) dont le carbone C-6 qui résonnerait à 23,71 ppm est beaucoup trop déblindé pour pouvoir

subir un effet γ du groupement hydroxyle par rapport à la valeur de 18,9 ppm de la molécule **B** même après l'ajout d'un méthyle sur le carbone C-2.

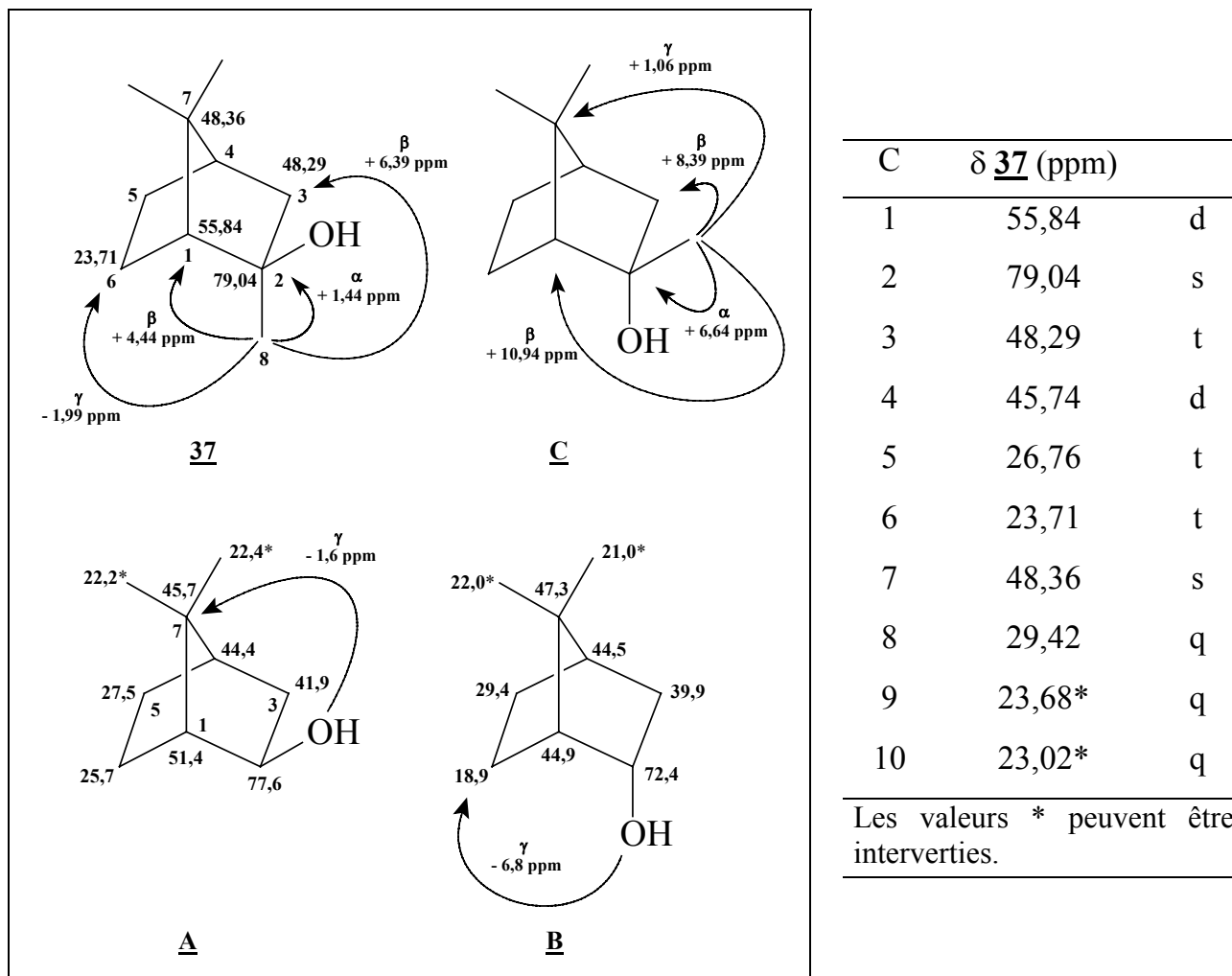


Figure 49 : structures et déplacements chimiques de l'exo-2,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol **37**, de l'exo- et l'endo-7,7-diméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ols (**A** et **B**) mesurés dans l'huile essentielle d'*Helichrysum faradifani* (δ **37**) et décrits dans la littérature (395).

d. Bilan de l'analyse de l'huile essentielle d'*H. faradifani*.

L'analyse de l'huile essentielle commerciale d'*Helichrysum faradifani* (C2) a conduit à l'identification après fractionnement de 54 constituants représentant 93,0% de la composition chimique globale (Tableau XVII). Comme nous avons pu le voir précédemment, l'huile essentielle se caractérise par la présence de l' α -fenchène

(32,3%), du γ -curcumène (19,4%), du (E)-caryophyllène (14,2%), de l' α -curcumène (2,9%) et du limonène (2,8%). On note également la présence de l'exo-2,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, monoterpène inhabituel dans les huiles essentielles et qui correspond en fait à l'hydratation du fenchène, produit majoritaire de cette huile essentielle. On rencontre aussi dans cette huile essentielle des sesquiterpènes irréguliers comme le lavandulol (0,4%) et l'acétate de lavandulyle (2,1%) ou des sesquiterpènes ayant des squelettes très divers : β -bisabolène (1,5%), α -humulène (1,4%) et italicène (1,0%).

| Composés | IK | | C1 | C2 |
|---|------------------|---------|-------------|-------------|
| | Apolaire | Polaire | | |
| | α -pinène | 931 | 1022 | 2,1 |
| α -fenchène | 942 | 1056 | - | 32,3 |
| camphène | 944 | 1065 | 0,5 | 0,3 |
| <i>octèn-3-ol</i> | 961 | 1441 | - | tr |
| <i>octan-2-one</i> | 968 | 1281 | - | tr |
| β -pinène | 973 | 1113 | 0,5 | 1,2 |
| myrcène | 982 | 1159 | 1,5 | 0,4 |
| α -phellandrène | 998 | 1163 | - | 0,3 |
| <i>acétate d'hexyle</i> | 999 | 1269 | - | tr |
| p-cymène | 1014 | 1269 | 0,8 | 0,4 |
| limonène* | 1024 | 1202 | 4,6 | 2,8 |
| 1,8-cinéole* | 1024 | 1213 | 2,9 | 0,7 |
| β -phellandrène* | 1024 | 1214 | - | 0,2 |
| (Z)- β -ocimène | 1025 | 1232 | 0,3 | - |
| (E)- β -ocimène | 1037 | 1247 | 0,6 | 0,2 |
| <i>nonan-2-one</i> | 1070 | 1384 | - | tr |
| terpinolène | 1079 | 1279 | 0,3 | 0,3 |
| linalol | 1085 | 1543 | 16,0 | 1,0 |
| fenchol | 1100 | 1571 | - | 0,2 |
| <i>exo-2,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol</i> | 1109 | 1569 | - | 1,7 |
| lavandulol* | 1148 | 1662 | - | 0,4 |
| bornéol | 1150 | 1693 | 0,8 | 0,5 |
| terpinèn-4-ol | 1162 | 1599 | - | 0,2 |
| α -terpinéol | 1174 | 1697 | 0,9 | 0,5 |
| acétate de fenchyle | 1207 | 1460 | - | 0,2 |
| acétate de bornyle | 1271 | 1575 | - | 0,2 |
| acétate de lavandulyle | 1272 | 1602 | - | 2,1 |
| α -copaène | 1376 | 1482 | 0,7 | 0,6* |

| | | | | |
|---|------|------|-------------|-------------|
| isoitalicène | 1376 | 1498 | - | 0,2* |
| italicène | 1404 | 1543 | - | 1,0 |
| α -cédrène | 1414 | 1566 | - | 0,3 |
| (E)-caryophyllène | 1421 | 1587 | 33,9 | 14,2 |
| <i>β-cédrène</i> | 1428 | 1593 | - | tr |
| trans- α -bergamotène | 1433 | 1585 | - | 0,4 |
| <i>α-guaiène</i> | 1436 | 1591 | - | 0,1 |
| aromadendrène | 1440 | 1604 | 0,3 | - |
| <i>α-himachalène*</i> | 1447 | 1637 | - | 0,2 |
| <i>(E)-β-farnésène*</i> | 1447 | 1666 | - | 0,2 |
| α -humulène | 1454 | 1660 | 5,4 | 1,4 |
| <i>alloaromadendrène</i> | 1458 | 1630 | 0,7 | 0,1 |
| γ -muurolène* | 1472 | 1684 | 0,5 | 0,1 |
| γ -curcumène* | 1472 | 1690 | - | 19,4 |
| α -curcumène* | 1472 | 1762 | 1,3 | 2,9 |
| <i>γ-himachalène</i> | 1479 | 1696 | - | 0,1 |
| β -sélinène | 1483 | 1706 | 1,1 | 0,3 |
| <i>β-himachalène</i> | 1497 | 1704 | - | 0,1 |
| β -bisabolène | 1502 | 1715 | - | 1,5 |
| γ -cadinène | 1507 | 1760 | 2,2 | 0,4 |
| <i>calaménène[†]</i> | 1510 | 1821 | 0,5 | tr |
| δ -cadinène | 1515 | 1758 | 2,8 | 0,6 |
| <i>(E)-α-bisabolène</i> | 1533 | 1778 | - | 0,3 |
| <i>(E)-nérolidol</i> | 1546 | 2029 | - | 0,1 |
| oxyde de caryophyllène | 1572 | 1976 | 4,5 | 0,2 |
| 6,7-époxyde d'humulène | 1601 | 2044 | 0,8 | - |
| <i>τ-cadinol*</i> | 1637 | 2177 | 1,3 | tr |
| β -eudesmol | 1639 | 2232 | 0,3 | - |
| β -bisabolol | 1653 | 2143 | - | 0,2 |
| α -bisabolol | 1668 | 2209 | - | 0,3 |
| Total | | | 88,1 | 93,0 |

C1 : Huile essentielle fournie par le C.N.A.R.P. C2 : Huile essentielle commerciale. Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ^{13}C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). *Les composés identifiés après fractionnement de l'huile essentielle C2 sont en italique.* Les pourcentages des composés identifiés par RMN du carbone-13 après fractionnement sont en gras italique. [†] : Isomère non déterminé. tr : Composés à l'état de trace (<0,1%).

Tableau XVII : composés identifiés dans l'huile essentielle d'*Helichrysum faradifani*.

Les compositions des deux échantillons d'*Helichrysum faradifani* sont donc très différentes. Même si l'un des échantillons a été préparé au laboratoire et l'autre industriellement, il est clair qu'on est en présence de deux compositions chimiques, l'une de type α -fenchène/ γ -curcumène/(E)-caryophyllène, l'autre de type (E)-caryophyllène/linalol/ α -humulène. Il serait donc intéressant de faire un échantillonnage plus poussé pour étudier la variabilité chimique de cette plante.

B. COMPOSITION CHIMIQUE DE QUATRE HUILES ESSENTIELLES : *H. SELAGINIFOLIUM*, *H. CORDIFOLIUM*, *H. HYPNOIDES*, *HELICHRYSUM* SP.

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de quatre *Helichrysum* de Madagascar par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 a permis l'identification de 44 composés : 11 monoterpènes hydrocarbonés, 7 monoterpènes oxygénés, 17 sesquiterpènes hydrocarbonés, 8 sesquiterpènes oxygénés et un ester linéaire (Tableau XVIII). Les deux composés majoritaires de chacun des quatre échantillons étudiés sont le β -pinène et le (E)-caryophyllène. Ce dernier était également le constituant majoritaire d'une des deux huiles essentielles d'*Helichrysum faradifani* décrites précédemment.

Les principaux constituants de l'huile essentielle d'*Helichrysum selaginifolium* (D) sont le β -pinène (38,1%), l' α -pinène (16,1%), le (E)-caryophyllène et son oxyde (respectivement 7,4% et 9,3%), suivis du 1,8-cinéole avec seulement 7,1%. Cette composition chimique est proche de celle publiée dans la littérature (142). Cependant, certains sesquiterpènes [le 6,7-époxyde d'humulène (1,0%), l' α -humulène (0,9%) ou le spathuléol (0,7%)] sont présents dans notre échantillon dans des proportions modérées à la différence de celui décrit dans la littérature (142).

A notre connaissance, les huiles essentielles d'*Helichrysum cordifolium* et d'*Helichrysum hypnoides* n'ont fait l'objet d'aucune étude.

| Composés | IK | | D | E | F | G |
|------------------------------|----------|---------|-------------|------------------|------------------|--------------|
| | Apolaire | Polaire | | | | |
| α -pinène | 931 | 1023 | 16,1 | 1,0 | 4,9 | 7,1 |
| α -fenchène | 942 | 1058 | - | 0,2 | 0,9 | 1,1 |
| camphène | 944 | 1068 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | - |
| sabinène | 967 | 1124 | 1,0 | - | - | - |
| β -pinène | 971 | 1111 | 38,1 | 2,0 | 1,7 | 6,4 |
| myrcène | 981 | 1160 | 0,3 | 0,3 | 2,1 | 2,2 |
| p-cymène | 1013 | 1271 | 2,2 | 0,3 | 2,0 | 0,5 |
| limonène* | 1023 | 1204 | 1,7 | 2,1 | 6,9 | 2,2 |
| 1,8-cinéole* | 1023 | 1215 | 7,1 | 0,2 | 13,4 | 0,6 |
| (Z)- β -ocimène | 1025 | 1232 | - | 0,3 | 0,2 | 0,5 |
| (E)- β -ocimène | 1037 | 1249 | - | 0,9 | 1,3 | 0,4 |
| γ -terpinène | 1049 | 1244 | - | - | 0,3 | - |
| linalol | 1085 | 1547 | 1,4 | 1,0 | 4,5 | - |
| trans-pinocarvéol | 1125 | 1654 | 1,1 | - | - | - |
| bornéol | 1150 | 1705 | - | - | 0,4 | - |
| myrténal | 1171 | 1632 | 0,4 | - | - | - |
| α -terpinéol | 1173 | 1698 | 1,0 | - | 0,9 | - |
| myrténol | 1181 | 1791 | 0,7 | - | - | - |
| α -copaène | 1376 | 1488 | 0,5 | - | 1,8 | 1,2 |
| β -bourbonène | 1385 | 1515 | - | - | - | 1,2 |
| (E)-caryophyllène | 1423 | 1593 | 7,4 | 54,9 | 33,8 | 16,0* |
| trans- α -bergamotène | 1435 | 1584 | - | - | - | 5,0* |
| aromadendrène | 1440 | 1604 | 0,2 | - | - | 0,2 |
| alloaromadendrène | 1448 | 1638 | 0,3 | - | 0,6 | - |
| (E)- β -farnésène | 1449 | 1665 | - | - | - | 5,7 |
| α -humulène | 1453 | 1665 | 0,9 | 12,0 | 4,8 | 12,3 |
| γ -muurolène* | 1470 | 1680 | - | 0,3 | 0,5 | 3,1 |
| α -curcumène* | 1470 | 1767 | - | 1,4 | 0,4 | 0,2 |
| γ -curcumène | 1473 | 1685 | - | 0,5 | - | - |
| D-germacrène | 1479 | 1705 | - | - | - | 0,7 |
| β -sélinène | 1483 | 1713 | 0,3 | - | 0,3* | 0,3 |
| α -muurolène | 1495 | 1720 | - | - | - | 1,3 |
| γ -cadinène | 1507 | 1752 | 0,3 | 0,7 | 1,2 | 1,9 |
| trans-calaménène | 1510 | 1826 | - | 0,2 [†] | 0,3 [†] | 0,8 |
| δ -cadinène | 1515 | 1749 | - | 1,1 | 1,5 | 2,8 |
| spathuléol | 1571 | 2125 | 0,7* | - | - | 0,2 |
| oxyde de caryophyllène* | 1576 | 1984 | 9,3 | 7,1 | 5,3 | 3,7 |
| globulol* | 1576 | 2076 | 0,2 | - | - | - |
| 6,7-époxyde d'humulène | 1601 | 2044 | 1,0 | 1,4* | 0,7* | 2,9* |
| τ -cadinol | 1629 | 2170 | - | 0,5* | - | 1,1 |
| β -eudesmol | 1639 | 2232 | - | 0,2 | - | 1,0 |

| | | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------------|
| α -bisabolol | 1668 | 2215 | - | 0,4 | - | - |
| 2Z,6E-farnésol | 1680 | 2313 | - | - | - | 0,7 |
| acétate de 2Z,6E-farnésyle | 1793 | 2225 | - | - | - | 1,0 |
| Total | | | 92,4 | 89,2 | 91,1 | 84,3 |

D : *H. selaginifolium* ; E : *H. cordifolium* ; F : *H. hypnoides* ; G : *Helichrysum* sp. Les composés en gras ont été identifiés en RMN du ^{13}C en plus de la CPG/IK et de la CPG/SM. L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * (colonne polaire). IK (Apolaire et Polaire) : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (Rtx-1) et polaire (Rtx-Wax). Les pourcentages sur colonne polaire sont proposés en raison d'une coélution sur colonne apolaire avec un autre composé (identifié ou inconnu). † : Isomère non déterminé.

Tableau XVIII : composés identifiés dans l'huile essentielle d'*Helichrysum selaginifolium*, d'*Helichrysum cordifolium*, d'*Helichrysum hypnoides* et d'*Helichrysum* sp.

Helichrysum cordifolium (E) est caractérisé par une huile essentielle riche en (E)-caryophyllène (54,9%). Suivent ensuite l' α -humulène (12,0%), l'oxyde de caryophyllène (7,1%), le limonène (2,1%) et le β -pinène (2,0%). Nous notons également la présence de certains alcools sesquiterpéniques en faible proportion : le τ -cadinol (0,5%), l' α -bisabolol (0,4%) et le β -eudesmol (0,2%).

Le (E)-caryophyllène représente le tiers de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Helichrysum hypnoides* (33,8%). Le second constituant majoritaire est le 1,8-cinéole (13,4%) suivi du limonène (6,9%), de l'oxyde de caryophyllène (5,3%), de l' α -pinène (4,9%) et de l' α -humulène (4,8%). La fraction monoterpénique est plus importante dans cet échantillon par rapport à l'huile essentielle d'*Helichrysum cordifolium* (39,9% contre 8,5%).

En ce qui concerne la dernière espèce (non déterminée), le (E)-caryophyllène est toujours le composé majoritaire mais avec seulement 16%. Le second constituant est un autre sesquiterpène, l' α -humulène avec 12,3%. Nous constatons également la présence d'un certain nombre de molécules sesquiterpéniques qui n'étaient pas présentes dans les autres huiles essentielles étudiées précédemment et que l'on retrouve dans notre échantillon, telles que le β -bourbonène (1,2%), le trans- α -

bergamotène (5,0%) et trois composés possédant le squelette linéaire du farnésane : le (E)- β -farnésène (5,7%), le 2Z,6E-farnésol (0,7%) et l'acétate de 2Z,6E-farnésyle (1,0%). La composition chimique de cet échantillon reste assez originale par rapport aux autres huiles essentielles précédemment décrites.

C. BILAN DE L'ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES D'*HELICHRYSUM* DE MADAGASCAR.

Les huiles essentielles d'*Helichrysum* que nous avons étudiées sont caractérisées par la présence plus ou moins importante de quatre constituants : le 1,8-cinéole, le β -pinène, le (E)-caryophyllène ou l' α -fenchène. A notre connaissance, aucune autre huile essentielle d'*Helichrysum* en dehors de celles de Madagascar, ne présente un pourcentage aussi élevé en 1,8-cinéole, β -pinène ou α -fenchène et même en (E)-caryophyllène.

Ainsi, nos résultats confirment que *H. gymnocephalum* et *H. bracteiferum* produisent des huiles essentielles riches en 1,8-cinéole et que l'huile essentielle d'*Helichrysum selaginifolium* est dominée par le β -pinène. Ces deux composés sont présents dans l'huile essentielle d'autres espèces d'*Helichrysum*, mais avec une teneur moindre, par exemple 8,6% de 1,8-cinéole et 10,2% de β -pinène dans *H. splendidum* (370). De même, si le (E)-caryophyllène, a été récemment identifié comme produit majoritaire (38,5%) dans l'huile essentielle d'*Helichrysum heldreichii* de Grèce (375), dans l'huile essentielle d'*Helichrysum stoechas* ssp. *barrelieri* toujours en Grèce (15,6%, associé au β -élémane, 13,1%) (371) et qu'on le trouve également dans l'huile essentielle d'*Helichrysum odoratissimum* du Cameroun (5,1-13,8%) (362), c'est la première fois qu'il est décrit dans une huile essentielle d'*Helichrysum* avec une teneur aussi importante (55%).

Parallèlement, la présence de l' α -fenchène comme composé majoritaire d'un échantillon d'huile essentielle d'*Helichrysum faradifani* est reportée pour la première fois et met en évidence l'existence d'une variabilité chimique intraspécifique pour

cette espèce.

Enfin, en ce qui concerne l'espèce indéterminée, la connaissance de la composition de son huile essentielle peut apporter une aide à la détermination taxonomique.

CONCLUSION

La flore malgache est l'une des plus riches du monde et possède de nombreuses plantes aromatiques et médicinales. Les huiles essentielles qui en sont extraites constituent des produits à très forte valeur ajoutée qui peuvent contribuer au développement économique de l'île.

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une contribution à la valorisation des ressources naturelles par l'équipe « Chimie des produits naturels » et l'équipe « Chimie et Biomasse » entreprise à l'Université de Corse. L'objectif était d'une part, le développement et l'optimisation des différentes techniques d'analyses utilisées au laboratoire et l'enrichissement de nos bibliothèques de spectres de référence, et d'autre part de les appliquer à la caractérisation de diverses huiles essentielles de Madagascar.

La détermination de la composition chimique d'une huile essentielle, de la mise en évidence d'une éventuelle spécificité ou du contrôle de sa qualité, sont des étapes importantes qui nécessitent l'utilisation de différentes méthodes d'analyses. La première approche pour l'analyse d'une huile essentielle est l'utilisation du couplage « en ligne », tel que la CPG/SM, permettant l'identification des constituants. Les huiles essentielles peuvent être soumises à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte et ainsi faciliter l'identification des composés minoritaires. La seconde approche met en œuvre la résonance magnétique nucléaire du carbone-13. L'identification des constituants est basée sur l'examen du spectre de RMN du carbone-13 du mélange, sans séparation préalable ou après une étape de séparation permettant l'obtention de résultats plus précis et plus fiables si nécessaire.

Dans le premier chapitre, nous avons passé en revue les principales techniques conventionnelles utilisées pour l'analyse des huiles essentielles en mettant en évidence leurs avantages et leurs limites. Nous avons également démontré que la RMN du carbone-13 peut être utilisée comme une véritable méthode d'analyse.

Dans le second chapitre, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de divers échantillons d'huiles essentielles malgaches, huiles essentielles produites localement et commercialisées.

◆ Ainsi, les huiles essentielles de *Cinnamomum camphora* et de *Cupressus lusitanicus* sont caractérisées par la prédominance de composés monoterpéniques : 1,8-cinéole/sabinène/ α -terpinéol pour la première et α -pinène/sabinène/ δ -3-carène pour la seconde.

◆ La composition de l'huile essentielle de *Tagetes bipinata* se caractérise par la présence importante de molécules possédant toutes le même squelette terpénique linéaire : β -ocimène (Z et E), dihydrotagétone, tagétones (Z et E) et ociménones (Z et E). Nous avons également mis en évidence une variation de la teneur de ces constituants dans l'huile essentielle de *T. bipinata*.

◆ Pour les deux échantillons de *Lantana camara*, nous avons constaté une variabilité chimique importante de l'huile essentielle, notamment par la présence à Madagascar, à la fois d'une huile essentielle dominée par la davanone, mais également d'une huile essentielle riche en hydrocarbures sesquiterpéniques ((E)-caryophyllène) et ne contenant pas de davanone. Nous avons aussi montré l'intérêt de la RMN du carbone-13 pour l'identification de molécules ayant des spectres de masse insuffisamment différenciés. Ainsi, le cubébol et l'épi-cubébol ont été identifiés par RMN, dans cette huile essentielle, après une étape rapide de séparation.

◆ Le citronellal est le constituant majoritaire de l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* de Madagascar, suivi d'autres molécules à structure linéaire, tel que le citronellol et l'acétate de citronellyle. La RMN du carbone-13 nous a permis d'identifier efficacement des composés délicats à analyser par les techniques conventionnelles, en particulier des molécules ayant des structures très proches, comme les stéréoisomères de l'isopulégol et les deux hydrates de menthol présents dans cette huile essentielle.

◆ L'identification et la semi-quantification de molécules thermosensibles a également été possible grâce à la RMN du carbone-13. C'est le cas, dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides*, de l'ascaridole, composé majoritaire, qui se transpose thermiquement durant le temps d'analyse en CPG.

Dans le troisième chapitre, nous nous sommes intéressés à l'huile essentielle d'écorce de *Cedrelopsis grevei* qui est endémique de Madagascar. Nous avons analysé six échantillons d'huile essentielle et réalisé un fractionnement poussé de l'un d'entre eux. Ce fractionnement nous a permis d'identifier 115 composés, parmi lesquels nous trouvons un grand nombre de molécules sesquiterpéniques hydrocarbonées et oxygénées. L'identification de ces constituants a été réalisée grâce aux bibliothèques de spectres constituées au laboratoire (SM et RMN ^{13}C), mais également pour certains d'entre eux, à partir des données de la littérature ou par reconstruction du spectre de RMN à partir de molécules de référence. Nous avons identifié par exemple les quatre hydrates de sesquisabinène, le 4-épi-cis-dihydroagarofurane ou le β -curcumène. Nous avons aussi mis en évidence une variation de la teneur des constituants de l'huile essentielle à travers l'analyse des six échantillons, dominés par le (E)-caryophyllène et l'ishwarane. De plus, celle-ci se révèle assez complexe par le nombre très important de constituants sesquiterpéniques.

Enfin, nous avons montré la variabilité interspécifique des huiles essentielles du genre *Helichrysum*. *Helichrysum gymnocephalum* et *H. bracteiferum* sont toutes les deux caractérisées par la prédominance du 1,8-cinéole, dont la teneur représente plus de la moitié de la composition chimique pour la première et seulement le tiers pour la seconde. Un autre monoterpène, le β -pinène, est le constituant majoritaire de l'huile essentielle d'*H. selaginifolium*. Pour l'huile essentielle d'*H. faradifani*, nous avons décrit deux compositions très différentes : une première composition chimique de type α -fenchène/ γ -curcumène/(E)-caryophyllène et une autre de type (E)-caryophyllène/linalol/ α -humulène. Le (E)-caryophyllène, est également le composé majoritaire des huiles essentielles d'*H. hypnoides*, d'*H. cordifolium* et d'*Helichrysum* sp. Pour cette dernière, la connaissance de la composition de son huile essentielle peut éventuellement apporter une aide à la détermination taxonomique. L'étude de ces différents échantillons nous a également permis d'identifier à partir de la CPG/SM et de la RMN du carbone-13, plusieurs composés monoterpéniques, sesquiterpéniques et diterpéniques qui n'étaient pas présents dans nos bibliothèques de spectres, tels que

l' α -fenchène, l'exo-2,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, le β -copaène, l' α - et le β -ylangène et le géranyl- α -terpinène.

Cette étude nous a permis d'une part, de développer notre méthode d'analyse des huiles essentielles qui est basée sur la combinaison du couplage CPG/SM et de la RMN du carbone-13, avec ou sans fractionnement, en utilisant les données de la littérature, en reconstruisant les spectres de molécules absentes de nos bibliothèques et d'autre part, de contribuer à une meilleure connaissance de l'huile essentielle de diverses plantes de Madagascar, endémiques ou introduites, en les caractérisant et en décrivant une éventuelle variabilité chimique.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE

La chromatographie sur colonne de silice « flash », est une technique qui a été utilisée pour séparer les composés hydrocarbonés des composés oxygénés contenus dans les huiles essentielles. Nous avons utilisé comme adsorbant une silice ICN 200-500 μm , 60 A (1 g d'huile essentielle pour 20 g de silice). La séparation des composés hydrocarbonés ou oxygénés a été réalisée en utilisant une silice de faible granulométrie, ICN 63-200 μm , 60 A (1 g pour 50 g de silice). Pour obtenir une meilleure séparation, en jouant sur le nombre d'insaturation porté par les molécules oléfiniques, nous avons utilisé du nitrate d'argent (AgNO_3 , 20%).

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les analyses ont été réalisées grâce à un chromatographe Perkin Elmer Autosystem GC, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composés, d'un injecteur diviseur et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 μm) respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane).

Le gaz vecteur est l'hélium avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mn, puis en un palier de 45 mn à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 μl .

SPECTROMETRIE DE MASSE (CPG/SM)

Les analyses ont été réalisées grâce à un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 μm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Les molécules sont bombardées par

un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 150°C. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

Le gaz vecteur est l'hélium avec une pression en tête de colonne de 43 psi. Le débit dans chaque colonne est de 1 ml/mn. La programmation de la température est identique à celle utilisée précédemment pour la CPG. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 µl.

RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU CARBONE-13

Les spectres RMN ont été effectués sur un appareil Brüker AC 200 opérant à 50,323 MHz pour le carbone-13 (200,132 MHz pour le proton), équipé d'un ordinateur « Aspect 3000 », et d'une sonde proton-carbone de 5 ou 10 mm. Les spectres sont réalisés en solution dans du deutérochloroforme (CDCl₃). Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS (tetraméthylsilane) pris comme référence interne. Une masse de 200 mg (ou 70 mg) de l'huile essentielle ou d'une fraction est diluée dans 2 ml (ou 0,5 ml) de CDCl₃. L'enregistrement des spectres s'effectue toujours dans des conditions rigoureusement identiques pour s'assurer de la bonne reproductibilité des valeurs des déplacements chimiques. Les conditions opératoires sont les suivantes :

- durée de l'impulsion : 5,0 µs (angle d'impulsion 45°) pour la sonde de 10 mm et 2,8 µs pour la sonde de 5 mm (PW) ;
- mémoire d'acquisition : 32 K ;
- temps d'attente entre les impulsions : 3,3 s (RD) ;
- temps d'acquisition : 1,3 s (AQ) ;
- fenêtre spectrale : 12500 Hz (250 ppm) (SW) ;
- spectre enregistré avec un découplage pulsé (« Composite Phase Decoupling » ou CPD) et une résolution digitale de 0,763 Hz/pt. ;

- les données du signal de précession libre (signal de décroissance libre d'induction ou FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle ($LB = 1 \text{ Hz}$).

Les paramètres suivants ont été utilisés pour les expériences de spin-écho (JMODXH Brüker microprogramme) :

- impulsion à 90° : $11 \mu\text{s}$ (sonde de 10 mm), $5,5 \mu\text{s}$ (sonde de 5 mm) ;
- temps de $1/J$ (C,H) : 7 ms [$J(\text{C,H}) = 143 \text{ Hz}$] ;
- SW : 12500 Hz ;
- temps de répétition entre deux expériences : $5,3 \text{ s}$.

BIBLIOGRAPHIE

1. Silverstein R.M., Bassler G.C., Morill T.C., Spectroscopic identification of Organic Compounds, 5th edition, John Wiley & Sons, New York, 1991.
2. Cooper J.W., Spectroscopic Techniques for Chemistry Research, John Wiley & Sons, New York, 1980.
3. Günther H., La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie, Masson, Paris, 1994.
4. Atta-Ur-Rahman, Azra Pervin, The Nuts and Bolts of Modern Two-Dimensional NMR Spectroscopy. A Suggested Protocol For Structure Elucidation, *J. Chem. Soc. Pakistan*, 1991, **13**, 127-152.
5. Freeman R., Molecular Structure by Two-Dimensional NMR Spectroscopy, *J. Mol. Struct.*, 1988, **173**, 17-30.
6. Ernst R., Two-Dimensional NMR Spectroscopy : A Powerful Tool for the Investigation of Molecular Structure and Dynamics, *Chimia*, 1987, **41**, 323-340.
7. Derome A.E., Modern NMR Techniques for Chemistry Research, Pergamon Press, Oxford, 1987.
8. Breitmaier E., Voelter W., Carbon-13 NMR Spectroscopy, High-resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry, 3^{ème} édition, Verlag Chemie International, New York, 1990.
9. Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995.
10. Kováts E., Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System, in *Advances in Chromatography*, Chap. 7, 1965, 229-247.
11. Van Den Dool H., Kratz P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatog.*, 1963, **11**, 463-471.
12. Longevialle P., Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris, 1981, 3-14 et 83-98.
13. Constantin E., Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 1996, 1-14.

14. De Hoffmann E., Charette J., Stroobant V., Spectrométrie de Masse, 2^e édition, Librairie Dunod, Paris, 1999.
15. McLafferty F.W., Turecek F., Interpretation of Mass Spectra, Fourth edition, University Science Books, Sausalito, California, 1993.
16. Vernin G., Lageot C., Couplage CG/SM pour l'analyse des arômes et des huiles essentielles, *Analisis Magazine*, 1992, **20** (7), M34-39.
17. Adams R.P., Weyerstahl P., cis- and trans-Sabinene Hydrate : Comparisons of Quadrupole and Ion Trap Mass Spectra, *J. Essent. Oil Res.*, 1992, **4**, 197-200.
18. National Institute of Standards and Technology, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, The Perkin Elmer Corporation, 1999.
19. McLafferty F.W., Stauffer D.B., Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co., Newfield, 1994.
20. Joulain D., König WA., The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, E. B.-Verlag, Hamburg, 1998.
21. Adams R.P., Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press, Inc., San Diego, 1989.
22. Adams R.P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 1995.
23. McLafferty F.W., Stauffer D.B., The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 1-7, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 1989.
24. Joulain D., Laurent R., Two Closely Related Sesquiterpenols : 1-endo-bourbonanol and 1,6-germacradien-5-ol, *J. Essent. Oil. Res.*, 1989, **1**, 299-301.
25. Schultze W., Lange G., Schmaus G., Isobutane and Ammonia Chemical Ionization Mass Spectrometry of Sesquiterpene Hydrocarbons, *Flavour Fragr. J.*, 1992, **7**, 55-64.
26. Vernin G., Petitjean M., Poite J. C., Metzger J., Fraisse D., Suon K. N., Mass Spectra and Kováts Indices Databank of Volatile Aroma Compounds, Chap.

- VII in *Computer Aids to Chemistry*, Vernin G. and Chanon M. ed., Horwood E., Pub., Chilchester, 1986, 294-333.
27. Vernin G., Metzger J., Suon K.-N., Fraisse D., Ghiglione C., Hamoud A., Párkányi C., GC-MS-SPECMA Bank Analysis of Essential Oils and Aromas. GC-MS (EI-PCI) Data Bank Analysis of Sesquiterpenic Compounds in Juniper Needle Oil – Application of the Mass Fragmentometry SIM Technique, *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, 1990, **23**, 25-33.
 28. Cavaleiro C., Oleos essenciais de *Juniperus* de Portugal, Thèse de doctorat, Univ. Coimbra, Portugal, 2001.
 29. Harrison A.G., Chemical Ionization Mass Spectrometry, 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.
 30. Lange G., Schultze W., Studies on Terpenoid and Non-Terpenoid Esters Using Chemical Ionization Mass Spectrometry in GC/MS Coupling, in *Bioflavour '87*, Schreier P. Ed., de Gruyter W. & Co., Berlin, New York, 1988, 105-114.
 31. Badjah Hadj Ahmed A.Y., Meklati B.Y., Fraisse D., Mass Spectrometry with Positive Chemical Ionization of Some α -Pinene and β -Pinene Derivatives, *Flavour Fragr. J.*, 1988, **3**, 13-18.
 32. Doolittle R.E., Tumlinson J.H., Proveaux A., Determination of Double Bond Position in Conjugated Dienes by Chemical Ionization Mass Spectrometry with Isobutane, *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 1625-1630.
 33. George G., Applications de l'ICN à l'analyse des mélanges aromatiques, thèse de doctorat de l'Université de Nice, 1984.
 34. Zupanc M., Prošek M., Dušan M., Combined CI and EI Mass Spectra in the Analysis of Essential Oils, *J. High Resolution Chromatography*, 1992, **15**, 510-513.
 35. Cambon A., La spectrométrie de masse multidimensionnelle et ses applications à l'analyse des mélanges complexes, *Science, Technique, Technologie*, 1989, **11**, 4-10.
 36. Yost R.A., Enke C.G., Triple Quadrupole Mass Spectrometry for Direct Mixture Analysis and Structure Elucidation, *Anal. Chem.*, 1979, **51**, 1251-1264.

37. Decouzon M., G ribaldi S., Rouillard M., Sturla J.-M., A New Look at the Spectroscopic Properties of Dihydrocarveol Stereoisomers, *Flavour Fragr. J.*, 1990, **5**, 147-152.
38. Le Quéré J. L., Le couplage CPG/IRTF dans l'analyse des arômes, *Analisis*, 1992, **20** (7), M46-49.
39. Wilkins C.L., Multidimensional GC for qualitative IR and MS of mixtures, *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 295-301.
40. Hedges L. M., Wilkins C. L., Component Analysis of *Eucalyptus* Oil by Gas Chromatography-Fourier Transform-Infrared Spectrometry-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.*, 1991, **29**, 345-350.
41. Krock K. A., Rangunathan N., Wilkins C. L., Multidimensional Gas Chromatography Coupled with Infrared and Mass Spectrometry for Analysis of *Eucalyptus* Essential Oils, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 425-430.
42. Cremin P., Donnelly D. M. X., Wolfender J.-L., Hostettmann K., Liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analysis of sesquiterpenes of *Armillaria* (Eumycota : Basidiomycotina) species, *J. Chromatogr. A*, 1995, **710**, 273-285.
43. Wolfender J.-L., Hostettmann K., Importance of LC/MS in plant analysis, *Spectroscopy Europe*, 1996, **8**, 7-12.
44. Mondello L., Dugo P., Bartle K.D., Automated HPLC-HRGC : A Powerful Method for Essential Oil Analysis. Part V. Identification of Terpenes Hydrocarbons of Bergamot, Lemon, Mandarin, Sweet Orange, Bitter Orange, Grapefruit, Clementine and Mexican Lime Oils by Coupled HPLC-HRGC-MS (ITD), *Flavour Fragr. J.*, 1995, **10**, 33-42.
45. Munari F., Dugo G., Cotroneo A., Automated On-line HPLC-HRGC with Gradient Elution and Multiple GC Transfer Applied to the Characterization of *Citrus* Essential Oils, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1990, **13**, 56-61.
46. Korhammer S.A., Bernreuther A., Hyphenation of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Other Chromatographic Techniques (SFC, GPC, GC, CE) with Nuclear Magnetic Resonance (NMR) : A review, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, **354**, 131-135.

47. Sidelmann U. G., Lenz E. M., Spraul M., Hofmann M., Troke J., Sanderson P. N., Lindon J. C., Wilson I. D., Nicholson J. K., *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 106-110.
48. Albert K., Schlotterbeck G., Tseng L.-H., Braumann U., Application of on-line Capillary High-Performance Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry Coupling for the Analysis of Vitamin A Derivatives, *J. Chromatogr. A*, 1996, **750**, 303-309.
49. Spring O., Buschmann H., Vogler B., Schilling E.E., Spraul M., Hofmann M., Sesquiterpene Lactone Chemistry of *Zaluzania grayana* from On-line LC-NMR Measurements, *Phytochemistry*, 1995, **39**, 609-612.
50. Joulain D., Method for Analysing Essential Oil. Modern Analysis Methodologies : Use and Abuse, *Perfum. Flavor.*, 1994, **19**, 5-17.
51. Weyerstahl P., Marschall H., Seelmann I., Rustaiyan A., Constituents of the Essential Oil of *Achillea eriophora* DC, *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 71-78.
52. Weyerstahl P., Schneider S., Marschall H., Rustaiyan A., The Essential Oil of *Artemisia sieberi* Bess., *Flavour Fragr. J.*, 1993, **8**, 139-145.
53. Weyerstahl P., Marschall H., Weirauch M., Thefeld K., Surburg H., Constituents of commercial Labdanum oil, *Flavour Fragr. J.*, 1998, **13**, 295-318.
54. Weyerstahl P., Marschall H., Schröder M., Wahlburg H-C., Kaul V.K., The sesquiterpene fraction of the essential oil of *Artemisia laciniata* Willd., *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 315-325.
55. Weyerstahl P., Marschall H., Eckhardt A., Christiansen C., Constituents of commercial Brazilian lantana oil, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 15-28.
56. Grundschober F., The identification of individual components in flavorings and flavoured foods, *Z. Lebensm Unters Forsch.*, 1991, **192**, 530-534.
57. Formáček V., Kubeczka K.H., Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy, John Wiley & Sons, Chichester, 1982.

58. Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J., L'analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13, *Canadian Journal of Applied Spectroscopy*, Partie 1, 1996, **41**, 15-24 ; Partie 2, 1996, **41**, 41-50.
59. Corticchiato M., Casanova J., Analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13. Application aux huiles essentielles, *Analisis Magazine*, 1992, **20** (1), M51-58.
60. Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J., Computer-Aided Identification of Individual Components of Essentials Oils using Carbon-13 NMR Spectroscopy, *J. Magn. Reson. Anal.*, 1995, **1**, 25-34.
61. Tomi F., Casanova J., Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles, *Annales Fals. & Expertise Chim.*, 2000, **93**, 313-330.
62. Rezzi S., Bighelli A., Castola V., Casanova J., Direct Identification and Quantitative Determination of Acidic and Neutral Diterpenes Using ^{13}C NMR Spectroscopy. Application to the Analysis of Oleoresin of *Pinus nigra*, *Applied Spectroscopy*, 2002, **56**, 312-317.
63. Castola V., Bighelli A., Casanova J., Direct Qualitative and Quantitative Analysis of Triterpenes Using ^{13}C NMR Spectroscopy Exemplified by Dichloromethanic Extracts of Cork, *Applied Spectroscopy*, 1999, **53**, 344-350.
64. Bighelli A., Tomi F., Casanova J., Computer-aided carbon-13 NMR study of phenols contained in liquids produced by pyrolysis of biomass, *Biomass and Bioenergy*, 1994, **6**, 461-464.
65. Castola V., Bighelli A., Conti L., Scano G., Mascia S., Casanova J., Identification and Quantification of Anhydrosugars in Biomass Pyrolytic Oils Using Carbon-13 NMR Spectroscopy, *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 2000, **45**, 102-107.
66. Mazzoni V. Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Direct Qualitative and Quantitative Analysis of Carbohydrates Mixtures Using ^{13}C NMR Spectroscopy : Application to Honeys, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1997, **35**, 81-90.
67. Castola V., Mazzoni V., Corticchiato M., Bighelli A., Casanova J., Hydrogen-Bonding Effect on Carbon-13 NMR Chemical Shifts of Naturally Occurring

- Phenols, *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 1997, **42**, 90-94.
68. Brekke T., Kvalheim O.M., Signal treatment and signal analysis in NMR, Chap. 20, Rutledge D.N. Ed., Elsevier, Amsterdam, 1996.
69. Crouch R.C., Llanos W., Mehr K.G., Hadden C.E., Russell D.J., Martin G.E., Applications of cryogenic NMR probe technology to long-range ^1H - ^{15}N 2D NMR studies at natural abundance, *Magn. Reson. Chem.*, 2001, **39**, 555-558.
70. Lindon J.C., Nicholson J.K., 750 MHz NMR spectroscopy : Preliminary results and future prospects, *Spectroscopy Europe*, 1993, **5**, 10-18.
71. Lin Y.-Y., Ahn S., Murali N., Brey W., Bowers C.R., Warren W.S., High-Resolution, > 1 GHz NMR in Unstable Magnetic Fields, *Physical Review Letters*, 2000, **85**, 3732-3735.
72. Allerhand A., Maple S.R., Ultra-High Resolution NMR. This new technique makes possible use NMR for the nonseparative structural and quantitative analysis of complex mixtures, *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 411A-452A.
73. Allerhand A., Maple S.R., Requirements for Ultrahigh Resolution NMR of Large Molecules on High-Field Instruments, *J. Magn. Reson.*, 1988, **76**, 375-379.
74. Baldovini N., Tomi F., Casanova J., Identification and Quantitative Determination of Furanodiene, a Heat-sensitive Compound, in Essential Oil by ^{13}C -NMR, *Phytochemical Analysis*, 2001, **12**, 58-63.
75. Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A.F., Chemical Composition of Myrtle Leaf Essential Oil from Corsica (France), *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 283-288.
76. Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R., Casanova J., Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Oils from Sardinia and Corsica (α -pinene/verbenone/bornyl acetate chemotype), *Flavour Fragr. J.*, 2002, **17**, 15-19.
77. Mariotti J.P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A.F., Composition of the Essential Oil of *Cistus ladaniferus* L. Cultivated in Corsica (France), *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 147-151.

78. Mariotti J.-P., Costa J., Bianchini A., Bernardini A.-F., Composition of the Essential Oil of *Stachys glutinosa* from Corsica (France), *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 205-209.
79. Baldovini N., Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France), *Flavour Fragr. J.*, 2000, **15**, 50-54.
80. Filippini M.-H., Tomi F., Casanova J., Composition of the leaf oil of *Ferula arrigonii* Bocchieri, *Flavour Fragr. J.*, 2000, **15**, 195-198.
81. Castola V., Bighelli A., Casanova J., Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2000, **28**, 79-88.
82. Rezzi S., Bighelli A., Mouillot D., Casanova J., Chemical variability of the needle essential oil of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from Corsica, *Flavour Fragr. J.*, 2001, **16**, 379-383.
83. Salgueiro L., Vila R., Tomas X., Tomi F., Cañigüeral S., Casanova J., Proença Da Cunha A., Adzet T., Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal, *Phytochemistry*, 1995, **38**, 391-396.
84. Salgueiro L.R., Vila R., Tomi F., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Cañigüeral S., Casanova J., Proença Da Cunha A., Adzet T., Variability of essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal, *Phytochemistry*, 1997, **45**, 307-311.
85. Salgueiro L.R., Vila R., Tomi F., Tomas X., Cañigüeral S., Casanova J., Proença Da Cunha A., Adzet T., Composition and intraspecific variability of essential oil from *Thymus camphoratus*, *Phytochemistry*, 1997, **45**, 1177-1183.
86. Cavaleiro C., Salgueiro L., Barroso J.G., Figueiredo A.C., Pedro L.G., Fontinha S.S., Bighelli A., Casanova J., Composition of the essential oil of *Juniperus cedrus* Webb & Berth. grown on Madeira, *Flavour Fragr. J.*, 2002, **17**, 111-114.
87. Martins A.P., Salgueiro L., Vila R., Tomi F., Cañigüeral S., Casanova J., Proença da Cunha A., Adzet T., Essential Oil Composition of Three *Ocimum* Species Traditionally Used in S. Tomé and Príncipe, *Planta Medica*, 1999, **65**, 187-189.

88. Martins A.P., Salgueiro L., Gonçalves M.J., Proença da Cunha A., Vila R., Cañigüeral S., Mazzoni V., Tomi F., Casanova J., Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S. Tomé and Príncipe, *Planta Medica*, 2001, **67**, 580-584.
89. Martins A.P., Salgueiro L.R., Gonçalves M.J., Vila R., Tomi F., Adzet T., Proença da Cunha A., Cañigüeral S., Casanova J., Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*, an endemic species from S. Tomé and Príncipe, *Planta Medica*, 2000, **66**, 647-650.
90. Kanko C., Koukoua G., N'Guessan Y.T., Lota M.-L., Tomi F., Casanova J., Composition and Intraspecific Variability of the Leaf Oil of *Lippia multiflora* Mold. From the Ivory Coast, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 153-158.
91. Ayédoun M.A., Sohounhloué D.K., Menut C., Lamaty G., Molangui T., Tomi F., Casanova J., Aromatic plants of tropical west Africa. VI. α -Oxobisabolene as main constituent of the leaf essential oil of *Commifora africana* (A. Rich) Engl. From Benin, *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 105-107.
92. Mundina M., Vila R., Tomi F., Ciccio J.F., Ibañez C., Adzet T., Casanova J., Cañigüeral S., Essential oil composition from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica, *Flavour Fragr. J.*, 2000, **15**, 201-205.
93. Mundina M., Vila R., Tomi F., Gupta M.P., Adzet T., Casanova J., Cañigüeral S., Leaf Essential Oils of Three Panamanian Piper Species, *Phytochemistry*, 1998, **47**, 1277-1282.
94. Vila R., Milo B., Tomi F., Casanova J., Ferro E.A., Cañigüeral S., Chemical composition of the essential oil from leaves of *Piper fulvescens*, a plant traditionally used in Paraguay, *J. Ethnopharmacology*, 2001, **76**, 105-107.
95. Muselli A., Hoi T.M., Cu L.D., Moi L.D., Bessière J.-M., Bighelli A., Casanova J., Composition of the Essential Oil of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. (Araliaceae) from Vietnam, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 41-44.
96. Dung N.X., Khiên P.V., Nhuận D.D., Hoi T.M., Ban N.K., Leclercq P.A., Muselli A., Bighelli A., Casanova J., Composition of the Seed Oil of *Hibiscus abelmoschus* L. (Malvaceae) Growing in Vietnam, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 447-452.

97. Muselli A., Bighelli A., Hoi T.M., Thao N.T.P., Thai T.H., Casanova J., Dihydroperryraldehydes from *Enhydra fluctuans* Lour essential oil, *Flavour Fragr. J.*, 2000, **15**, 299-302.
98. Corticchiato M., Tomi F., Bernardini A.-F., Casanova J., Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus herba-barona*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 1998, **26**, 915-932.
99. Cavaleiro C., Rezzi S., Salgueiro L., Bighelli A., Casanova J., Proença da Cunha A., Infraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Portugal, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 1175-1183.
100. Mundina M., Vila R., Tomi F., Tomàs X., Ciccio J.F., Adzet T., Casanova J., Cañigüeral S., Composition and chemical polymorphism of the essential oils from *Piper lanceaefolium*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 739-748.
101. Lota M.-L., De Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J., Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, **28**, 61-78.
102. Lota M.-L., De Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J., Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 77-104.
103. Lota M.-L., De Rocca Serra D., Tomi F., Jacquemond C., Casanova J., Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Limes Species, *J. Agricultural Food Chem.*, 2002, **50**, 796-805.
104. Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Carbon-13 NMR Study of Farnesol, Farnesyl Acetate and Farnesal Stereoisomers: Chemical Shift Assignment Using Lanthanide Induced Shifts, *Canadian Journal of Applied Spectroscopy*, 1995, **40**, 76-81.
105. Coleman III W.M., Gordon B.M., Lawrence B.M., Examinations of the Matrix Isolation Fourier Transform Infrared Spectra of Organic Compounds: Part XII, *Appl. Spectrosc.*, 1989, **43**, 298-304.
106. Tomi F., Bighelli A., Casanova J., Carbon-13 chemical shift assignment of β -cedrene and some derivatives, *Spectroscopy Letters*, 1993, **26**, 1661-1671.

107. Hoi T.M., Moi L.D., Muselli A., Bighelli A., Casanova J., Analyse de l'huile essentielle de *Cupressus funebris* du Vietnam, par RMN du carbone-13, 15èmes Journées Internationales des Huiles Essentielles, Digne-les-bains, 5-7/9/1996, Actes, *Rivista Italiana EPPOS*, 1997, N° spécial, 633-637.
108. Dung N.X., Cu L.D., Khiên P.V., Muselli A., Casanova J., Barthel A., Leclercq P.A., Volatile Constituents of the Stem and Leaf Oils of *Eupatorium coelestinum* L. from Vietnam, *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 478-482.
109. Thanh L., Dung N.X., Bighelli A., Casanova J., Leclercq P.A., Combination of capillary GC, GC/MS and ¹³C-NMR for the characterization of the rhizome oil of *Piper betle* L. (Piperaceae) from Vietnam, *Spectroscopy*, 1996/1997, **13**, 131-136.
110. Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., Enantiomeric differentiation of oxygenated monoterpenes by carbon-13 NMR in the presence of a chiral lanthanide shift reagent, *J. Magn. Reson. Anal.*, 1997, **3**, 40-46.
111. Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., ¹³C-NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*, *Flavour Fragr. J.*, 1998, **13**, 154-158.
112. Baldovini N., Tomi F., Casanova J., Enantiomeric differentiation of terpenic olefins by carbon-13 NMR using chiral binuclear shift reagents, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2001, **39**, 621-624.
113. Mazzoni V., Analyse de mélanges naturels par RMN du carbone-13 : extraits lipidiques, miels et huiles essentielles, Thèse de doctorat, Univ. Corse, France, 1998.
114. Baldovini N., La RMN du carbone-13, outil d'analyse : caractérisation des huiles essentielles et différenciation énantiomérique de terpènes, Thèse de doctorat, Univ. Corse, France, 2000.
115. Mazzoni V., Tomi F., Casanova J., A daucane-type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 268-272.
116. Koechlin J., Guillaumet J.-L., Morat P., Flore et Végétation de Madagascar, A.R.G. Gantner Verlag, 1997, Vaduz.

117. Cabanis Y., Chabouis L., Chabouis F., Végétaux et groupements végétaux de Madagascar et des Mascareignes, Tome I-IV, BDPA, 1969-70, Tananarive.
118. Rasoanaivo P., De La Gorce P., Essential Oils of Economic Value in Madagascar : Present State of Knowledge, *HerbalGram*, 1998, **43**, 31-59.
119. Jouhanneau D.G., La médecine des plantes aromatiques, Phyto-Aromathérapie et Huiles essentielles de l'Océan Indien, Editions du Tramail, Azalées Editions, St Denis de la Réunion, 1991.
120. De Medici D., Pieretti S., Salvatore G., Nicoletti M., Rasoanaivo P., Chemical Analysis of Essential Oils of Malagasy Medicinal Plants by Gas Chromatography and NMR Spectroscopy, *Flavour Fragr. J.*, 1992, **7**, 275-281.
121. Saraswathy A., Rani M.G., Development of high performance thin layer chromatographic method for Maka Elatik Kulikai, *Indian Drugs*, 2000, **37**, 44-50.
122. Rajapakse R., Van Emden H.F., Potential of Four Vegetable Oils and Ten Botanical Powders for Reducing Infestation of Cowpeas by *Callosobruchus maculatus*, *C. chinensis* and *C. rhodesianus*, *J. Stored Prod. Res.*, 1997, **33**, 59-68.
123. Zhou X., Li X.-D., Yuan J.-Z., Tang Z.-H., Liu W.-Y., Toxicity of cinnamomin – a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, **30**, 259-264.
124. Wijesekera R.O.B., Jayewardene A.L., Essential Oils III. Chemical Constituents of the Volatile Oil from the Bark of a Rare Variety of *Cinnamomum*, *J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka*, 1974, **2**, 141-146.
125. Nath S.C., Hazarika A.K., Baruah R.N., Singh R.S., Ghosh A.C., Major Components of the Leaf Oil of *Cinnamomum sulphuratum* Nees., *J. Essent. Oil Res.*, 1994, **6**, 77-78.
126. Nath S.C., Baruah A.K. S., Eugenol as the Major Component of the Leaf Oils of *Cinnamomum impressinervium* Meissn., *J. Essent. Oil Res.*, 1994, **6**, 211-212.

127. Nath S.C., Hazarika A.K., Baruah A., Cinnamaldehyde, the Major Component of Leaf, Stem bark and Root bark Oil of *Cinnamomum pauciflorum* Nees., *J. Essent. Oil Res.*, 1996, **8**, 421-422.
128. Baruah A., Nath S.C., Hazarika A.K., Sarma T.C., Essential Oils of the Leaf, Stem Bark and Panicle of *Cinnamomum bejolghota* (Buch.-Ham.) Sweet., *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 243-245.
129. Ahmed A., Choudhary M.I., Farooq A., Demirci B., Demirci F., Baser K.H.C., Essential oil constituents of the spice *Cinnamomum tamala* (Ham.) Nees & Eberm., *Flavour Fragr. J.*, 2000, **15**, 388-390.
130. Yuangzheng H., Mingzhang W., Shunchang X., Hui Z., Weijian R., A study on the chemical components of the leaf essential oil from *Cinnamomum platyphyllum*, *Acta Botanica Yunnanica*, 1986, **8**, 359-362.
131. Ji X.-D., Pu Q.-L., Garraffo H.M., Pannell L.K., Essential Oils of the Leaf, Bark and Branch of *Cinnamomum buramannii* Blume, *J. Essent. Oil Res.*, 1991, **3**, 373-375.
132. Ding J.D., Yu X., Ding Z., Cheng B., Yi Y., Yu W., Hayashi N., Komae H., Essential Oils of Some *Lauraceae* Species from the Southwestern Parts of China, *J. Essent. Oil Res.*, 1994, **6**, 577-585.
133. Fang J.-M., Chen S.-A., Cheng Y.-S., Quantitative Analysis of the Essential Oil of *Cinnamomum osmophloeum*, *J. Agric. Food Chem.*, 1989, **37**, 744-746.
134. Dung N.X., Sothy N., Lô V.N., Leclercq P.A., Chemical Composition of the Essential Oil of *Cinnamomum cambodianum* H. Lec., *J. Essent. Oil Res.*, 1993, **5**, 667-668.
135. Dung N.X., Sothy N., Lô V.N., Leclercq P.A., Chemical Composition of the Wood Oil of *Cinnamomum albiflorum* Nees from Kampuchea, *J. Essent. Oil Res.*, 1994, **6**, 201-202.
136. Dung N.X., Mõi L.D., Hung N.D., Leclercq P.A., Constituents of the Essential Oils of *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Nees from Vietnam, *J. Essent. Oil Res.*, 1995, **7**, 53-56.
137. Dung N.X., Khiên P.V., Vinh N.T.Q., Lê H.T., Van de Ven L.J.M., Leclercq P.A., 2-Methylene-3-buten-1-yl Benzoate : the Major Constituent of the Leaf,

- Stem and Wood Oils from « Re Gung », a Vietnamese *Cinnamomum* sp. Tree, *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 57-61.
138. Adhikary S.R., Tuladhar B.S., Sheak A., Van Beek T.A., Posthumus M.A., Lelyveld G.P., Investigation of Nepalese Essential oils. I. The Oil of *Cinnamomum glaucescens* (Sugandha Kokila), *J. Essent. Oil Res.*, 1992, **4**, 151-159.
139. Jantan I.B., Goh S.H., Essential Oils of *Cinnamomum* Species from Peninsular Malaysia, *J. Essent. Oil Res.*, 1992, **4**, 161-171.
140. Jantan I.B., Ayop N., Hiong A.B., Ahmad A.S., Chemical composition of the essential oils of *Cinnamomum cordatum* Kosterm., *Flavour Fragr. J.*, 2002, **17**, 212-214.
141. Brophy J.J., Goldsack R.J., Forster P., The Leaf Oils of the Australian Species of *Cinnamomum* (Lauraceae), *J. Essent. Oil Res.*, 2001, **13**, 332-335.
142. Möllenbeck S., König T., Schreier P., Schwab W., Rajaonarivony J., Ranarivelo L., Chemical Composition and Analyses of Enantiomers of Essential Oils from Madagascar, *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 63-69.
143. Chalchat J.-C., Valade I., Chemical Composition of Leaf Oils of *Cinnamomum* from Madagascar : *C. zeylanicum* Blume, *C. camphora* L., *C. fragrans* Baillon and *C. angustifolium*, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 537-540.
144. Lawrence B.M., Cinnamon Oil, In : Progress in Essential Oils, *Perfum. Flavor.*, 1994, **19**, 59-60.
145. Lawrence B.M., Cinnamon Leaf Oil, In : Progress in Essential Oils, *Perfum. Flavor.*, 1994, **19**, 69-70.
146. Lawrence B.M., Cinnamon Leaf Oil, In : Progress in Essential Oils, *Perfum. Flavor.*, 1997, **22**, 82-83.
147. Lawrence B.M., Cinnamon Oil, In : Progress in Essential Oils, *Perfum. Flavor.*, 1998, **23**, 47-48.
148. Jirovetz L., Buchbauer G., Ruzicka J., Shafi M.P., Rosamma M.K., Analysis of *Cinnamomum zeylanicum* Blume Leaf Oil from South India, *J. Essent. Oil Res.*, 2001, **13**, 442-443.

149. Mallavarapu G.R., Ramesh S., Essential Oil of the Fruits of *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 628-630.
150. Kaul P.N., Bhattacharya A.K., Rao B.R.R., Chemical composition of the essential oil of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) leaves affected by leaf spot disease, *Indian Perfumer*, 1998, **42**, 33-35.
151. Jayaprakasha G.K., Rao L.J., Sakariah K.K., Chemical Composition of the Volatile Oil from the Fruits of *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 331-333.
152. Nath S.C., Pathak M.G., Baruah A., Benzyl Benzoate, the Major Component of the Leaf and Stem Bark Oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *J. Essent. Oil Res.*, 1996, **8**, 327-328.
153. Wan-yang S., Wei H., Guang-yu W., De-xuan G., Guang-yuan L., Yin-gou L., Study on chemical constituents of the essential oil and classification of types from *Cinnamomum camphora*, *Acta Botanica Sinica*, 1989, **31**, 209-214.
154. Stubbs B.J., Brushett D., Leaf Oil of *Cinnamomum camphora* (L.) Nees and Eberm. from Eastern Australia, *J. Essent. Oil Res.*, 2001, **13**, 51-54.
155. Zhu L., Ding D., Lawrence B.M., Salem W., The *Cinnamomum* Species in China : Resources for the Present and Future, *Perfum. Flavor.*, 1994, **19**, 17-22.
156. Fujita Y., Fujita S.-I., Akama Y., Biogenesis of the Essential Oils in Camphor Trees. Part XXIX. Comparison of the Essential Oils of the seedlings of *Cinnamomum camphora* Sieb. Cultivated under the Different Daylight, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 1972, **46**, 17-20.
157. Sattar A., Gilani A.M., Saeed M.A., Gas chromatographic examination of the essential oil of *Cinnamomum camphora*, *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, 1991, **34**, 135-136.
158. Pélissier Y., Marion C., Prunac S., Bessière J.-M., Volatile Components of Leaves, Stems and Bark of *Cinnamomum camphora* Nees et Ebermaier, *J. Essent. Oil Res.*, 1995, **7**, 313-315.
159. Pino J.A., Fuentes V., Leaf Oil of *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. from Cuba, *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 531-532.

160. Hirota N., Hiroi M., The Later Studies on the Camphor Tree, on the Leaf Oil of each Practical Form and its Utilisation, *Perfumery and Essential Oil Record*, 1967, **58**, 364-367.
161. Baruah A.K.S., Bhagat S.D., Hazarika J.N., Saikia B.K., Examination of Volatile Oil of *Cinnamomum camphora* Grown at Jorhat, Assam, *The Indian Journal of Pharmacy*, 1975, **37**, 39-41.
162. Muselli A., Contribution de la RMN du Carbone 13 à l'analyse d'huiles essentielles de Corse et du Viêt-Nam, Thèse de doctorat, Univ. Corse, France, 1999.
163. Dung N.X., Khiên P.V., Chiên H.T., Leclercq P.A., The Essential Oil of *Cinnamomum camphora* (L.) Sieb. var. *linaloolifera* from Vietnam, *J. Essent. Oil Res.*, 1993, **5**, 451-453.
164. Andriantsiferana M.H., Razanamahefa B.V., Andriamanantoanina H.C., Andriamaharavo N.R., Rabemanantsoa A., Rasendra P.H., Ravokatra S., Ramilijaona N.H., Composition Chimique de l'Huile Essentielle des Parties Aériennes de *Tagetes bipinata* L. (Compositae) de Madagascar, 15èmes Journées Internationales Huiles Essentielles, Digne-les-Bains 5-7/09/96. Actes. Rivista Italiana EPPOS, 1997, N° Spécial, 722-737.
165. Troupin C., Flore du Rwanda, Spermaphytes, I.N.R.S., Butare, Rwanda, 1985, 640-643.
166. Amat A.G., Taxones de *Compuestas* Bonaerenses críticos para la Investigación Farmacológica, *Acta Farm. Bonaerense*, 1983, **2**, 23-36.
167. Zardini E.M., Etnobotánica de *Compuestas* Argentinas con Especial Referencia a su Uso Farmacológico (Segunda Parte), *Acta Farm. Bonaerense*, 1984, **3**, 169-194.
168. Marín R.H., García D.A., Martijena I.D., Zygadlo J.A., Arce A., Perillo M.A., Anxiogenic-like effects of *Tagetes minuta* L. essential oil on T-maze and tonic immobility behaviour in domestic chicks, *Fudam. Clin. Pharmacol.*, 1998, **12**, 426-432.

169. Martijena I.D., García D.A., Marín R.H., Perillo M.A., Zygadlo J.P., Anxiogenic-like and antidepressant-like effects of the essential oil from *Tagetes minuta*, *Fitoterapia*, 1998, **69**, 155-160.
170. Camm E.L., Towers G.H.N., Mitchell J.C., UV-Mediated antibiotic activity of some compositae species, *Phytochemistry*, 1975, **14**, 2007-2011.
171. Héthélyi E., Tétényi P., Kaposi P., Dános B., Kernóczi Z., Büki G., Koczka I., GC/MS Investigation of antimicrobial and repellent compounds, *Herba Hungarica*, 1988, **27**, 89-94.
172. Kishore N, Dwivedi R.S., Fungitoxicity of the Essential oil of *Tagetes erecta* L. against *Pythium aphanidermatum* Fitz. The Damping-off Pathogen, *Flavour Fragr. J.*, 1991, **6**, 291-294.
173. Penna C.A., Radice M., Gutkind G.O., Van Baren C., Broussalis A., Muschietti L., Martino V., Ferraro G., Antibacterial and antifungal activities of some Argentinean plants, *Fitoterapia*, 1994, **65**, 172-174.
174. Tereschuk M.L., Riera M.V.Q., Castro G.R., Abdala L.R., Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*, *J. of Ethnopharmacology*, 1997, **56**, 227-232.
175. Uhlenbroek J.H, Bijloo J.D., Investigations on Nematicides. I. Isolation and structure of a nematocidal principle occurring in *Tagetes* roots, *Rec. Trav. Chim.*, 1958, **77**, 1004-1009.
176. Uhlenbroek J.H, Bijloo J.D., Investigations on Nematicides. II. Structure of a second nematocidal principle isolated from *Tagetes* roots, *Rec. Trav. Chim.*, 1959, **78**, 382-390.
177. Horn D.H.S., Lamberton J.A., The nematocidal principles of *Tagetes* roots, *Aust. J. Chem.*, 1963, **16**, 475-479.
178. Maradufu A., Lubega R., Dorn F., Isolation of (5E)-Ocimenone, A Mosquito Larvicide From *Tagetes minuta*, *J. Nat. Prod.*, 1978, **41**, 181-183.
179. Morallo-Rejesus B., Decena A., The Activity, Isolation, Purification and Identification of the Insecticidal Principles from *Tagetes*, *Philipp. J. Crop Sci.*, 1982, **7**, 31-36.

180. Singer J.M., Investigation of the mosquito larvicidal activity of the oil of marigolds, *Dissertation Abstracts International*, 1987, **47**, 4886.
181. Wells C., Mongin A, Bertsch W., A Study of Photosensitive Insecticidal Volatile Compounds in Marigold (*Tagetes minuta*), *J. High Resol. Chromatogr.*, 1993, **16**, 53-55.
182. Weaver D.K., Wells C.D., Dunkel F.V., Bertsch W., Sing S.E, Sriharan S., Insecticidal Activity of Floral, Foliar, and Root Extracts of *Tagetes minuta* (Asterales : Asteraceae) Against Adult Mexican Bean Weevils (Coleoptera : Bruchidae), *Journal of Economic Entomology*, 1994, **87**, 1718-1725.
183. Vasudevan P., Kashyap S, Sharma S., *Tagetes* : a multipurpose plant, *Bioresource Technology*, 1997, **62**, 29-35.
184. Rodriguez E, Mabry T.J., *Tageteae-chemical review*. In : The Biology and Chemistry of the Compositae 2. Heywood V.H., Harborne J.B, Turner B.L., Edits., Academic Press, London-New York-San Francisco, 1977, 785-797.
185. Chopra I.C., Nigam M.C., Kapoor L.D, Handa K.L., Indian *Tagetes* oils, *Soap. Perfum. Cosmet.*, 1963, **36**, 686-689.
186. Lawrence B.M., Essential Oils of the *Tagetes* Genus, *Perfumer & Flavorist*, 1985, **10**, 73-82.
187. Lawrence B.M., Chemical Composition of *Tagetes* Oil, *Perfumer & Flavorist*, 1985/1986, **10**, 56-58.
188. Lawrence B.M., *Tagetes* Oil. In : Progress in Essential Oils, *Perfumer & Flavorist*, 1996, **21**, 64-68.
189. Craveiro A.A., Matos F.J.A., Machado M.I.L., Alencar J.W., Essential Oils Of *Tagetes minuta* From Brazil, *Perfumer & Flavorist*, 1988, **13**, 35-36.
190. Garg S.N, Mehta V.K., Acyclic monoterpenes from the essential oil of *Tagetes minuta* flowers, *Phytochemistry*, 1998, **48**, 395-396.
191. Prakasa Rao E.V.S., Syamasundar K.V., Gopinath C.T, Ramesh S., Agronomical and Chemical Studies on *Tagetes minuta* Grown in a Red Soil of a Semiarid Tropical Region in India, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 259-261.
192. Bansal R.P., Bahl J.R., Garg S.N., Naqvi A.A., Sharma S., Ram M., Kumar S., Variation in Quality of Essential Oil Distilled from Vegetative and

- Reproductive Stages of *Tagetes minuta* Crop Grown in North Indian Plains, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 747-752.
193. Gil A., Ghersa C.M., Leicach S., Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, **28**, 261-274.
 194. Sharma M.L., Nigam M.C., Handa K.L., Chopra I.C., Essential Oil of *Tagetes erecta*, *Perf. Ess. Oil Rec.*, 1961, **52**, 561-562.
 195. Héthélyi E., Dános B., Tétényi P., Koczka I., GC-MS Analysis of the Essential Oils of Four *Tagetes* Species and the Anti-microbial Activity of *Tagetes minuta*, *Flavour Fragr. J.*, 1986, **1**, 169-173.
 196. Machado M.I.L., Silva M.G.V., Matos F.J.A., Craveiro A.A, Alencar J.W., The Presence of Indole as Minor Constituent of *Tagetes erecta* Leaf Oil, *J. Essent. Oil Res.*, 1994, **6**, 203-205.
 197. Garg S.N., Verma S.K., Kumar S., Identification of the Volatile Constituents in the Capitula Oil of *Tagetes patula* L. Grown in the North Indian Plains, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 688-690.
 198. Stojanova A., Primova T., Anastassov C., Effect of Mineral Fertilization on the Essential Oil Composition of *Tagetes patula* L. from Bulgaria, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 609-612.
 199. Zygodlo J.A., Lamarque A.L., Maestri D.M, Guzman C.A., Grosso N.R., Composition of the Inflorescence Oils of Some *Tagetes* Species from Argentina, *J. Essent. Oil Res.*, 1993, **5**, 679-681.
 200. Zygodlo J.A, Guzman C.A., Grosso N.R., Antifungal Properties of the Leaf Oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag., *J. Essent. Oil Res.*, 1994, **6**, 617-621.
 201. Bicchi C., Fresia M., Rubiolo P., Monti D., Franz C., Goehler I., Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* Essential Oil, *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 47-52.
 202. De Feo V., Della Porta G., Sorai E.U., Soria R.U, Senatore F., Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag., *Flavour Fragr. J.*, 1998, **13**, 145-147.
 203. Vila R., Iglesias J., Cañigueral S., Ciccio J.F., Essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. from Costa Rica, *Ing. Cienc. Quím.*, 2000, **19**, 13-14.

204. De Villiers D.J.J., Garbers C.F., Laurie R.N., Synthesis of tagetenones and their occurrence in oil of *Tagetes minuta*, *Phytochemistry*, 1971, **10**, 1359-1361.
205. Garbers C.F., Scott F., Terpenoid synthesis. V. Electrophilic addition reactions in the synthesis of the ocimenones, the rose oxides, and a pheromone of *Ips paraconfusus*, *Tetrahedron Letters*, 1976, **19**, 1625-1628.
206. Thappa R.K, Agarwal S.G., Kalai N.K, Kapoor R., Changes in Chemical Composition of *Tagetes minuta* Oil at Various Stages of Flowering and Fruiting, *J. Essent. Oil Res.*, 1993, **5**, 375-379.
207. Boiteau P., Médecine traditionnelle et pharmacopée : précis de matière médicale malgache, Agence de Coopération Culturelle et Technique, 1986.
208. Forestieri A.M., Monforte M.T., Ragusa S., Trovato A., Iauk L., Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activity in Rodents of Plant Extracts used in African Medicine, *Phytotherapy Research*, 1996, **10**, 100-106.
209. Ghisalberti E.L., Review. *Lantana camara* L. (Verbenaceae), *Fitoterapia*, 2000, **71**, 467-486.
210. Finch H., Pegg N.A., McLaren J., Lowdon A., Bolton R., Coote S.J., Dyer U., Montana J.G., Owen M.R., Dowle M., Buckley D., Ross B.C., Campbell C., Dix C., Mooney C., Man-Tang C., Patel C., 5,5-trans lactone-containing inhibitors of serine proteases : identification of a novel, acylating thrombin inhibitor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1998, **8**, 2955-2960.
211. Mahato S.B., Sahu N.P., Roy S.K., Sharma O.P., Potential Antitumor Agents from *Lantana camara* : Structures of Flavonoid-, and Phenylpropanoid Glycosides, *Tetrahedron*, 1994, **50**, 9439-9446.
212. Da Silva M.H.L., Andrade E.H.A., Zoghbi M.D.G.B., Luz A.I.R., Da Silva J.D., Maia J.G.S., The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 208-210.
213. Ngassoum M.B., Yonkeu S., Jirovetz L., Buchbauer G., Schmaus G., Hammerschmidt F.-J., Chemical composition of essential oils of *Lantana camara* leaves and flowers from Cameroon and Madagascar, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 245-250.

214. Sefidkon F., Essential oil of *Lantana camara* L. occurring in Iran, *Flavour Fragr. J.*, 2002, **17**, 78-80.
215. Vasudevan P., Tandon M., Pathak N., Nuennerich P., Mueller F., Mele A., Lentz H., Fluid CO₂ Extraction and Hydrodistillation of Certain Biocidal Essential Oils and Their Constituents, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 1997, **56**, 662-672.
216. Deena M.J., Thoppil J.E., Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*, *Fitoterapia*, 2000, **71**, 453-455.
217. Khan M., Srivastava S.K., Syamasundar K.V., Singh M., Naqvi A.A., Chemical composition of leaf and flower essential oil of *Lantana camara* from India, *Flavour Fragr. J.*, 2002, **17**, 75-77.
218. Zechmeister L., Herz W., Grisebach H., Kirby G.W., Chang C.W.J., Flament I., Matson J.A., Nishida T., Ohloff G., Wehrli F.W., Weinheimer A.J., Progress in the chemistry of organic natural products, Vol. 36, Springer-Verlag, 1979, New York.
219. Cornwell C.P., Reddy N., Leach D.N., Wyllie S.G., Origin of (+)- δ -cadinene and cubenols in the essential oils of the Myrtaceae, *Flavour Fragr. J.*, 2000, **15**, 352-361.
220. Low D., Rawal B.D., Griffin W.J., Antibacterial action of the essential oils of some Australian Myrtaceae with special references to the activity of chromatographic fractions of oil of *Eucalyptus citriodora*, *Planta Medica*, 1974, **26**, 184-189.
221. Dellacassa E., Menendez P., Moyna P., Cerdeiras P., Antimicrobial activity of *Eucalyptus* essential oils, *Fitoterapia*, 1989, **60**, 544-546.
222. Lawrence B.M., 1,8-Cineole-rich Eucalyptus Oils, In : Progress in Essential Oils, *Perfum. Flavor.*, 1997, **22**, 49-51.
223. Benayache S., Benayache F., Benyahia S., Chalchat J.-C., Garry R.-P., Leaf Oils of some *Eucalyptus* Species Growing in Algeria, *J. Essent. Oil Res.*, 2001, **13**, 210-213.
224. Chalchat J.-C., Garry R.-P., Sidibé L., Aromatic Plants of Mali (V) : Chemical Composition of Essential Oils of Four Eucalyptus Species Implanted in Mali :

- Eucalyptus camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. torelliana* and *E. tereticornis*, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 695-701.
225. Oyedeji A.O., Ekundayo O., Olawore O.N., Koenig W.A., Essential Oil Composition of Two Varieties of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. from Nigeria, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 102-104.
226. Pagula F.P., Baser K.H.C., Kürkçüoğlu M., Essential Oil Composition of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. From Mozambique, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 333-335.
227. Giamakis A., Kretsi O., Chinou I., Spyropoulos C.G., *Eucalyptus camaldulensis* : volatiles from immature flowers and high production of 1,8-cinéole and β -pinene by in vitro cultures, *Phytochemistry*, 2001, **58**, 351-355.
228. Foudil-Cherif Y., Meklati B.Y., Verzera A., Mondello L., Dugo G., Chemical Examination of Essential Oils from the Leaves of Nine *Eucalyptus* Species Growing in Algeria, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 186-191.
229. Dagne E., Bisrat D., Alemayehu M., Worku T., Essential Oils of Twelve *Eucalyptus* Species from Ethiopia, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 467-470.
230. Bignell C.M., Dunlop P.J., Brophy J.J., Volatile Leaf Oils of some South-western and Southern Australian Species of the Genus *Eucalyptus* (Series 1). Part XIX, *Flavour Fragr. J.*, 1998, **13**, 131-139.
231. Lassak E.V., Southwell I.A., Essential Oil Isolates from the Australian Flora, *Int. Flav. Food Add.*, 1977, 126-132.
232. Southwell I.A., Essential Oil Isolates from the Australian Flora. Part 2, *Flavour Fragr. J.*, 1987, **2**, 21-27.
233. Southwell I.A., Brophy J.J., Essential Oil Isolates from the Australian Flora. Part 3, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 267-278.
234. Lawrence B.M., Essential Oils as Sources of Natural Aroma Chemicals, *Perfum. Flavor.*, 1992, **17**, 15-28.
235. Mwangi J.W., Guantai A.N., Muriuki G., *Eucalyptus citriodora* – Essential oil content and chemical varieties in Kenya, *E. Afr. Agric. For. J.*, 1981, **46**, 89-96.

236. Proença Da Cunha A., Campos Neves M.T., Análise do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* de Angola, *Boll. Fac. Farm. Univ. Coimbra Ed. Cient.*, 1969, **29**, 38-52.
237. Talalaj S., Essential Oil of *Eucalyptus citriodora* Hooker Grown in Ghana, *West African Pharmacist*, 1966, **8**, 117-118.
238. Miranda M., Zayas J.P., Influencia de la época de recolección sobre el rendimiento de aceite esencial y la composición química del *Eucalyptus citriodora* Hook. que crece en Cuba, *Rev. Cub. Farm.*, 1985, **19**, 121-127.
239. Miranda Martínez M., Guimerás J.L.P., Hernández J.R.M., Zayas J.P., Díaz M.J.Q., Montejo L., Estudio preliminar de los aceites esenciales de especie de eucalyptus introducidas en la region de Topes de Collantes, *Rev. Cub. Farm.*, 1986, **20**, 159-168.
240. Sugimoto S., Kato T., Composition of *Eucalyptus* Oils, *Kanzei Chuo Bunsekisho Ho*, 1983, **2**, 31-34.
241. Adames M., Mendoza E., Ospina de Nigrinis L.S., Estudio del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* Bailey, *Rev. Colombian Cienc. Quim. Farm.*, 1983, **4**, 95-113.
242. Argiro A.I., Retamar J.A., Aceites esenciales de la provincia de Tucuman esencia de *Eucalyptus citriodora*, *Arch. Bioquim. Farm.*, 1973, **18**, 29-37.
243. Kapur K.K., Vashist V.N., Atal C.K., Variability and Utilization Studies on *Eucalyptus citriodora* Hook. grown in India, *Perfum. Essent. Oil Rec.*, 1967, **58**, 148-153.
244. Panda R., Panda H., Studies on *Eucalyptus* oil, *Indian For.*, 1987, **113**, 434-440.
245. Baslas K.K., Baslas R.K., Chemical Examination Of Essential Oils From Some Exotic Plants Raised In Kumaon, *Indian Perfum.*, 1967, **11**, 13-17.
246. Manzoor-i-Khuda M., Faruq M.O., Rahman M., Yusuf M., Wahab M.A., Chowdhury J., Studies on the essential oil bearing plants of Bangladesh, *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 1984, **19**, 151-169.
247. Mondello L., Verzera A., Bonaccorsi I., Chowdhury J.U., Yusef M., Begum J., Studies in the Essential Oil Bearing Plants of Bangladesh. Part V. Composition

- of the Leaf Oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. and *E. alba* Reinw. Ex Blume., *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 185-188.
248. Chaudhry F.M., Akbar S., Ahmad R., Waheed A., Rashid M., Chemical constituents of the essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook. (Myrtaceae), grown in Pakistan, *Sci. Int. (Lahore)*, 1994, **6**, 373-375.
249. Small B.E.J., The Australian eucalyptus oil industry – an overview, *Aust. For.*, 1981, **44**, 170-177.
250. Bignell C.M., Dunlop P.J., Brophy J.J., Volatile Leaf Oils of some Queensland and Northern Australian Species of the Genus *Eucalyptus* (Series II) Part II. Subgenera (a) Blakella, (b) Corymbia, (c) Unnamed, (d) Idiogenes, (e) Monocalyptus and (f) Symphyomyrtus, *Flavour Fragr. J.*, 1997, **12**, 277-284.
251. Garner J., Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention, du contrôle et de l'étude de la composition d'une huile essentielle, *Rivista Italiana EPPOS*, 1976, **58**, 105-127.
252. Ferreira M.J.P., Emerenciano V.P., Linia G.A.R., Romoff P., Macari P.A.T., Rodrigues G.V., ¹³C NMR spectroscopy of monoterpenoids, *Progress in Nuclear Resonance Spectroscopy*, 1998, **33**, 153-206.
253. Asakawa Y., Matsuda R., Tori M., Hashimoto T., Preparation of biologically active substances and animal and microbial metabolites from menthols, cineoles and kauranes, *Phytochemistry*, 1988, **27**, 3861-3869.
254. Kim Y.-K., Cool L.G., Zavarin E., cis-Calamenene-related sesquiterpenoids from *Cupressus bakeri* foliage, *Phytochemistry*, 1994, **36**, 961-965.
255. Cool L.G., Kim Y.-K., Zavarin E., Ball G.E., Bakerol : an unusual nor-acorane hemiketal from *Cupressus bakeri* foliage, *Phytochemistry*, 1994, **36**, 1283-1285.
256. Cool L.G., Jiang K., Thujopsene- and cis-muurolane-related sesquiterpenoids from *Cupressus bakeri*, *Phytochemistry*, 1995, **40**, 177-181.
257. Cool L.G., Jiang K., A secoamorphane tri-ether from *Cupressus macnabiana* foliage, *Phytochemistry*, 1995, **40**, 857-859.
258. Cool L.G., ent-Daucane and acorane sesquiterpenes from x *Cupressocyparis leylandii* foliage, *Phytochemistry*, 2001, **58**, 969-972.

259. Ballio A., Morelli M.A.C., Evidente A., Graniti A., Randazzo G., Sparapano L., Seiricardine A, a phytotoxic sesquiterpene from three *Seiridium* species pathogenic for cypress, *Phytochemistry*, 1991, **30**, 131-136.
260. Cowan S., Bartholomew B., Watson A.A., Bright C., Latif Z., Sarker S.D., Nash R.J., Lignans from *Cupressus lusitanica* (Cupressaceae), *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 109-111.
261. Piovetti L., Diara A., Les sesquiterpènes de *Cupressus dupreziana*, *Phytochemistry*, 1977, **16**, 103-106.
262. Piovetti L., Combaut G., Diara A., Monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés de *Cupressus dupreziana*, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 2117-2120.
263. Piovetti L., Gonzalez E., Diara A., Diterpene composition of *Cupressus dupreziana* and *Cupressus sempervirens*, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 2772-2773.
264. Madar Z., Gottlieb H.E., Cojocar M., Riov J., Solel Z., Szejnberg A., Antifungal terpenoids produced by cypress after infection by *Diplodia pinea* f. sp. *cupressi*, *Phytochemistry*, 1995, **38**, 351-354.
265. Gough L.J., Mills J.S., The occurrence of imbricatolic acid in *Cupressus* resins, *Phytochemistry*, 1970, **9**, 1093-1096.
266. Evidente A., Motta A., Sparapano L., Seiricardines B and C, phytotoxic sesquiterpenes from three species of *Seiridium* pathogenic for cypress, *Phytochemistry*, 1993, **33**, 69-78.
267. Evidente A., Sparapano L., Motta A., Giordano F., Fierro O., Frisullo S., A phytotoxic pimarane diterpene of *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi*, the pathogen of a canker disease of cypress, *Phytochemistry*, 1996, **42**, 1541-1546.
268. Evidente A., Sparapano L., Fierro O., Bruno G., Giordano F., Motta A., Sphaeropsidins B and C, phytotoxic pimarane diterpenes from *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi* and *Diplodia mutila*, *Phytochemistry*, 1997, **45**, 705-713.
269. Evidente A., Sparapano L., Fierro O., Bruno G., Giordano F., Motta A., Sphaeropsidone and episphaeropsidone, phytotoxic dimedone methyl ethers produced by *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi* grown in liquid culture, *Phytochemistry*, 1998, **48**, 1139-1143.

270. Zavarin E., Lawrence L., Thomas M.C., Compositional variations of leaf monoterpenes in *Cupressus macrocarpa*, *C. pygmaea*, *C. goveniana*, *C. abramsiana* and *C. sargentii*, *Phytochemistry*, 1971, **10**, 379-393.
271. Floreani S.A., Retamar J.A., Gros E.G., Terpenoids of the essential oils from species of *Cupressus*, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 1982, 663-667.
272. Pauly G., Yani A., Piovetti L., Bernard-Dagan C., Volatile constituents of *Cupressus dupreziana* and *Cupressus sempervirens*, *Phytochemistry*, 1983, **22**, 957-959.
273. Rafii Z., Cool L.G., Zavarin E., Variability of Foliar Mono- and Sesquiterpenoids of *Cupressus bakeri*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 1992, **20**, 123-131.
274. Dodd R.S., Rafii Z.A., Chemical and Ecological Variability of *Cupressus bakeri* on Goosenest Mountain, California, *Biochem. Syst. Ecol.*, 1994, **22**, 393-400.
275. Malizia R.A., Cardell D.A., Molli J.S., González S., Guerra P.E., Grau R.J., Volatile Constituents of Leaf Oils from the Cupressacea Family : Part I. *Cupressus macrocarpa* Hartw., *C. arizonica* Greene and *C. torulosa* Don Species Growing in Argentina, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 59-63.
276. Milos M., Radonic A., Mastelic J., Seasonal Variation in Essential Oil Compositions of *Cupressus sempervirens* L., *J. Essent. Oil Res.*, 2002, **14**, 222-223.
277. Igri M.A., Holeman M., Ildrissi A., Berrada M., Principaux constituants obtenus par hydrodistillation et extraction aux solvants des rameaux et du bois de *Cupressus macrocarpa* Hartweg, *Plantes médicinales et phytothérapie*, 1990, **24**, 44-49.
278. Riaz M., Khalid M.R., Qamar S., Chaudhary F.M., Chemical composition of the *Cupressus sempervirens* L. fruits at different stages of maturity, *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, 1996, **39**, 178-180.
279. Kassem F.F., Harraz F.M., El-Sebakhy N.A., De Pooter H.L., Schamp N.M., Abou-Shleib H., Composition of the Essential Oil of Egyptian *Cupressus sempervirens* L. Cones, *Flavour Fragr. J.*, 1991, **6**, 205-207.

280. Chanegriha N., Baaliouamer A., Meklati B.-Y., Chretien J.R., Keravis G., GC and GC/MS Leaf Oil Analysis of Four Algerian Cypress Species, *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 555-559.
281. Piovetti L., Francisco C., Pauly G., Benchabane O., Bernard-Dagan C., Diara A., Volatile constituents of *Cupressus dupreziana* and the sesquiterpenes of *Cupressus sempervirens*, *Phytochemistry*, 1981, **20**, 1299-1302.
282. Adams R.P., Zanoni T.A., Lara A., Barrero A.F., Cool L.G., Comparisons among *Cupressus arizonica* Greene, *C. benthamii* Endl., *C. lindleyi* Klotz. ex Endl. and *C. lusitanica* Mill. using leaf essential oils and DNA fingerprinting, *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 303-309.
283. Carmo M.M., Frazão S., The Essential Oil of *Cupressus lusitanicus* Mill., *Flavour Fragr. J.*, 1989, **4**, 185-186.
284. Pierre-Leandri C., Etude chimiotaxinomique du genre *Cupressus*, Thèse de doctorat, Univ. Nice Sophia-Antipolis, France, 2000.
285. Piovetti L., Diara A., Relations entre stéréochimie dans le groupe du cédrane et chimiotaxonomie, *Tetrahedron Letters*, 1980, **21**, 1453-1456.
286. Wirth E.H., A study of *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum* and its volatile oil, *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 1920, **9**, 127-141.
287. Noumi E., Yomi A., Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central Province, Cameroon, *Fitoterapia*, 2001, **72**, 246-254.
288. Kishore N., Chansouria J.P.N., Dubey N.K., Antidermatophytic Action of the Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* and an Ointment Prepared from it, *Phytotherapy Research*, 1996, **10**, 453-455.
289. Begum J., Yusuf M., Chowdhury J.U., Wahab M.A., Studies on essential oils for their antibacterial and antifungal properties. Part-I. Preliminary screening of 35 essential oils, *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 1993, **28**, 25-34.
290. Lall N., Meyer J.J.M., In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, **66**, 347-354.
291. Jiménez-Osornio F.M.V.Z.J., Kumamoto J., Wasser C., Allelopathic Activity of *Chenopodium ambrosioides* L., *Biochem. Syst. Ecol.*, 1996, **24**, 195-205.

292. Hmamouchi M., Lahlou M., Agoumi A., Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants, *Fitoterapia*, 2000, **71**, 308-314.
293. Okuyama E., Umeyama K., Saito Y., Yamazaki M., Satake M., Ascaridole as a Pharmacologically Active Principle of "Paico," a Medicinal Peruvian Plant, *Chem. Pharm. Bull.*, 1993, **41**, 1309-1311.
294. Olajide O.A., Awe S.O., Makinde J.M., Pharmacological screening of the methanolic extract of *Chenopodium ambrosioides*, *Fitoterapia*, 1997, **68**, 529-532.
295. Nelson E.K., A chemical investigation of the oil of *Chenopodium*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1911, **33**, 1404-1412.
296. Nelson E.K., The composition of oil of *Chenopodium* from various sources, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1920, **42**, 1204-1208.
297. Henry T.A., Paget H., *Chenopodium* Oil, *J. Chem. Soc.*, 1921, **119**, 1714-1724.
298. Henry T.A., Paget H., *Chenopodium* Oil. Part II. The Hydrocarbon Fraction, *J. Chem. Soc.*, 1925, **127**, 1649-1659.
299. Johnson M.A., Croteau R., Biosynthesis of Ascaridole : Iodide Peroxidase-Catalysed Synthesis of a Monoterpene Endoperoxide in Soluble Extracts of *Chenopodium ambrosioides* Fruit, *Archiv. Biochem. Biophys.*, 1984, **235**, 254-266.
300. Guenther E., The Essential Oils, Vol. 6, R.E. Krieger Publishing Company, Malabar, Floride, 1982, 150-161.
301. Kato S., Bowman D.D., Brown D.L., Efficacy of *Chenopodium ambrosioides* as an Antihelmintic for Treatment of Gastrointestinal Nematodes in Lambs, *J. Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 2000, **7**, 11-25.
302. Gupta G.S., Behari M., Indian *Chenopodium* oil, *Indian Perfum.*, 1976, **18**, 40-43.
303. Betts T.J., Characterisation of volatile oil constituents with relatively long gas chromatographic retention times on two stationary phases, *J. Chromatogr.*, 1988, **449**, 312-316.
304. De Pascual-T. J., Bellido I.S., Torres C., Pérez M.A., Essential oil from *Chenopodium ambrosioides*, *Rivista Ital. EPPOS*, 1980, **62**, 123-125.

305. Lawrence B.M., Wormseed or *Chenopodium* Oil, In : Progress in Essential Oils, *Perfum. Flavor.*, 1999, **24** (6), 45-46.
306. Umemoto K., Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L. Containing (-)-Pinocarveol as a Major Component, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 1978, **52**, 149-153.
307. Jirovetz L., Buchbauer G., Fleischhacker W., Analysis of the Essential Oil of the Leaves of the Medicinal Plant *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum* (L.) A. Gray from India, *Scientia Pharmaceutica*, 2000, **68**, 123-128.
308. Gupta D., Charles R., Mehta V.K., Garg S.N., Kumar S., Chemical Examination of the Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from the Southern Hills of India, *J. Essent. Oil Res.*, 2002, **14**, 93-94.
309. Onocha P.A., Ekundayo O., Eramo T., Laakso I., Essential Oil Constituents of *Chenopodium ambrosioides* L. Leaves from Nigeria, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 220-222.
310. Bourrel C., Vilarem G., Michel G., Gaset A., Etude des propriétés bactériostatiques et fongistatiques en milieu solide de 24 huiles essentielles préalablement analysées, *Rivista Ital. EPPOS*, 1995, N° 16, 3-12.
311. Fester G., Martinuzzi E., Retamar J., Ricciardi A., Estudios sobre esencias volatiles Argentinas, *Rev. Fac. Ing. Quim.*, 1960, **29**, 21-44.
312. Bohlmann F., Zeisberg R., Klein E., ¹³C-NMR-Spektren von Monoterpen, *Organic Magnetic Resonance*, 1975, **7**, 426-432.
313. Kiuchi F., Itano Y., Uchiyama N., Honda G., Tsubouchi A., Nakajima-Shimada J., Aoki T., Monoterpene Hydroperoxides with Trypanocidal Activity from *Chenopodium ambrosioides*, *J. Nat. Prod.*, 2002, **65**, 509-512.
314. Ahmed A.A., Highly Oxygenated Monoterpenes from *Chenopodium ambrosioides*, *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 989-991.
315. Van Der Ham R.W.J.M., Baas P., Bakker M.E., Boesewinkel F.D., Bouman F., Van Heuven B.J., Klaassen R.K.W.M., *Bottegoa* Chiov. transferred to the *Ptaeroxylaceae*, *Kew Bulletin*, 1995, **50**, 243-265.

316. Leroy J.F., Contributions à l'étude des forêts de Madagascar. Sur une petite famille de Sapindales propre à l'Afrique australe et à Madagascar : les *Ptaeroxylaceae*, *Journ. Agric. Trop. Bot. Appl.*, 1959, **6**, 106-108.
317. Leroy J.F., Contributions à l'étude des forêts de Madagascar. Complément à la note V sur les *Ptaeroxylaceae*, *Journ. Agric. Trop. Bot. Appl.*, 1960, **7**, 455-456.
318. Leroy J.F., Lescot M., Flore de Madagascar et des Comores : *Ptaeroxylaceae*, Famille 107 bis, 1991, 87-117.
319. Courchet L., Recherches morphologiques et anatomiques sur le Katafa ou Katrafay de Madagascar (*Cedrelopsis grevei* H. Baillon), *Ann. Inst. Col. Marseille*, 1906, 2^e série, **4**, 29-118.
320. Debray M., Jacquemin H., Razafindrambao R., Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar, Travaux et documents de l'O.R.S.T.O.M. Office de la recherche scientifique et technique, Paris, 1971.
321. Dean F.M., Taylor D.A.H., Extractives from East African Timbers. Part II. *Ptaeroxylon obliquum*, *J. Chem. Soc.*, 1966, 114-116.
322. Mulholland D.A., Mahomed H.A., Isolation of Cneorubin X, an unusual diterpenoid from *Ptaeroxylon obliquum* (*Ptaeroxylaceae*), *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, **28**, 713-716.
323. Dean F.M., Robinson M.L., The heartwood chromones of *Cedrelopsis grevei*, *Phytochemistry*, 1971, **10**, 3221-3227.
324. Schulte K.E., Rücker G., Klewe U., Some Constituents of the Bark of *Cedrelopsis grevei* Baillon, *Arch. Pharmaz.*, 1973, **306**, 857-865.
325. Mulholland D., Mahomed H., Kotsos M., Randrianarivehojosia M., Lavaud C., Massiot G., Nuzillard J-M., Limonoid Derivatives from *Cedrelopsis grevei*, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 11547-11552.
326. Paris R.R., Debray M., Sur les polyphénols (acides-phénols, flavonoïdes) des feuilles de deux Méliacées malgaches : *Cedrelopsis grevei* Baillon et *Neobeguea mahafalensis* Leroy, *Plantes médicinales et phytothérapie*, 1972, **6**, 311-319.

327. Mulholland D.A., Parel B., Coombes P.H., The Chemistry of the Meliaceae and Ptaeroxylaceae of Southern and Eastern Africa and Madagascar, *Current Organic Chemistry*, 2000, **4**, 1011-1054.
328. Menut C., Lamaty G., Bessière J.M., Andrianaivoravelona J.O., Rasolondramanitra J., Huiles Essentielles de Plantes Aromatiques Malgaches, 10èmes Journées Internationales Huiles Essentielles, Digne-les-bains 5-7/9/1991, Actes, *Rivista Italiana EPPOS*, 1992, N° spécial, 640-641.
329. Hayamizu K., Yanagisawa M., Yamamoto O., Wasada N., Someno K., Tanabe K., Tamura T., Hiraishi J., Integrated Spectral Data Base System (SDBS) for Organic Compounds, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Ibaraki, Japon, Adresse internet : <http://aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>.
330. Barrero A.F., Sanchez J.F., Oltra J.E., Altarejos J., Ferrol N., Barragan A., Oxygenated Sesquiterpenes from the Wood of *Juniperus oxycedrus*, *Phytochemistry*, 1991, **30**, 1551-1554.
331. Weyerstahl P., Schneider S., Marschall H., Rustaiyan A., New Bisabolene Derivatives and a Salsolene Ketone from *Artemisia seiberi* Bess., *Liebigs Ann. Chem.*, 1993, 111-116.
332. Weyerstahl P., Marschall H., Thefeld K., Subba G.C., Constituents of the essential oil from the rhizomes of *Hedychium gardnerianum* Roscoe, *Flavour Fragr. J.*, 1998, **13**, 377-388.
333. Fang J-M., Chen Y-C., Wang B-W., Cheng Y-S., Terpenes from Heartwood of *Juniperus chinensis*, *Phytochemistry*, 1996, **41**, 1361-1365.
334. Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., New Sesquiterpene Ethers from Vetiver Oil, *Liebigs Ann.*, 1996, 1195-1199.
335. Elzen G.W., Williams H.J., Vinson S.B., Isolation and identification of Cotton synomones mediating searching behavior by parasitoid *Campoletis sonorensis*, *J. Chem. Ecol.*, 1984, **10**, 1251-1264.
336. Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., Surburg H., Constituents of Haitian vetiver oil, *Flavour Fragr. J.*, 2000, **15**, 395-412.

337. Su W.-C., Fang J.-M., Cheng Y.-S., Sesquiterpenes from leaves of *Cryptomeria japonica*, *Phytochemistry*, 1995, **39**, 603-607.
338. Raharivelomanana P., Bianchini J.-P., Cambon A., Azzaro M., Faure R., Two-Dimensional NMR of Sesquiterpenes. 8 - Complete Assignment of ^1H and ^{13}C NMR Spectra of Seven Sesquiterpene Alcohols from *Neocallitropsis pancheri*, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1995, **33**, 233-235.
339. Kamperdick C., Van N.H., Sung T.V., Adam G., Benzopyrans from *Melicope ptelefolia* leaves, *Phytochemistry*, 1997, **45**, 1049-1056.
340. Itokawa H., Morita H., Watanabe K., Mihashi S., Iitaka Y., Agarofuran-, Eudesmane- and Eremophilane-Type Sesquiterpenoids from *Alpinia japonica* (Thunb.) Miq., *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, **33**, 1148-1153.
341. Thomas A.F., Ozainne M., The stereochemistry of the dihydroagarofurans, *Tetrahedron Letters*, 1976, 1717-1718.
342. Southwell I.A., Tucker D.J., Cis-dihydroagarofurane from *Prostanthera* sp. aff. *ovalifolia*, *Phytochemistry*, 1993, **33**, 857-862.
343. Humbert H., Flore de Madagascar et des Comores. 189e Famille : Composées - Tome II, Museum National d'Histoire Naturelle, 1962, Paris.
344. Ramanoelina A.R.P., Terrom G.P., Bianchini J.P., Coulanges P., Contribution à l'étude de l'action antibactérienne de quelques huiles essentielles de plantes malgaches, *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1987, **53**, 217-226.
345. Barberan F.T., Sanmartin E.I., Lorente F.T., Rumbero A., Antimicrobial phenolic compounds from three spanish *Helichrysum* species, *Phytochemistry*, 1990, **29**, 1093-1095.
346. Rios J.L., Recio M.C., Villar A., Antimicrobial activity of selected plants employed in the spanish mediterranean area, *Journal of Ethnopharmacology*, 1987, **21**, 139-152.
347. Rios J.L., Recio M.C., Villar A., Antimicrobial Activities of *Helichrysum stoechas*, *Planta Med.*, 1990, **56**, 646.
348. Rios J.L., Recio M.C., Villar A., Isolation and identification of the antibacterial compounds from *Helichrysum stoechas*, *Journal of Ethnopharmacology*, 1991, **33**, 51-55.

349. Cosar G., Çubukçu B., Antibacterial activity of *Helichrysum* species growing in Turkey, *Fitoterapia*, 1990, **61**, 161-164.
350. Chinou I. B., Roussis V., Perdetzoglou D., Loukis A., Chemical and Biological Studies on Two *Helichrysum* Species of Greek Origin, *Planta Med.*, 1996, **62**, 377-379.
351. Roussis V., Tsoukatou M., Chinou I.B., Ortiz A., Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Helichrysum rupestre* and *H. ambiguum* Growing in the Balearic Islands (Part III), *Planta Med.*, 1998, **64**, 675-676.
352. Afolayan A.J., Meyer J.J.M., The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*, *Journal of Ethnopharmacology*, 1997, **57**, 177-181.
353. Boiteau P., Allorge-Boiteau L., Plantes médicinales de Madagascar, ACCT-ICSN-KARTHALA, 1993, Paris.
354. Tira S., Di Modica G., Casinovi C.G., Galeffi C., Pela A., New β -diketones from *Helichrysum italicum* G. Don, *Tetrahedron Lett.*, 1967, (2), 143-148.
355. Manitto P., Monti D., Colombo E., Two new β -diketones from *Helichrysum italicum*, *Phytochemistry*, 1972, **11**, 2112-2114.
356. Jakupovic J., Kuhnke J., Schuster A., Metwally M.A., Bohlmann F., Phloroglucinol derivatives and other constituents from South African *Helichrysum* species, *Phytochemistry*, 1986, **25**, 1133-1142.
357. Jakupovic J., Schuster A., Bohlmann F., Ganzer U., King R.M., Robinson H., Diterpenes and other constituents from Australian *Helichrysum* and related species, *Phytochemistry*, 1989, **28**, 543-551.
358. Jakupovic J., Zdero C., Grenz M., Tschritzis F., Lehmann L., Hashemi-Nejad S.M., Bohlmann F., Twenty-one acylphloroglucinol derivatives and further constituents from South African *Helichrysum* species, *Phytochemistry*, 1989, **28**, 1119-1131.
359. De Quesada T.G., Rodriguez B., Valverde S., The constituents of *Helichrysum stoechas*, *Phytochemistry*, 1972, **11**, 446-449.

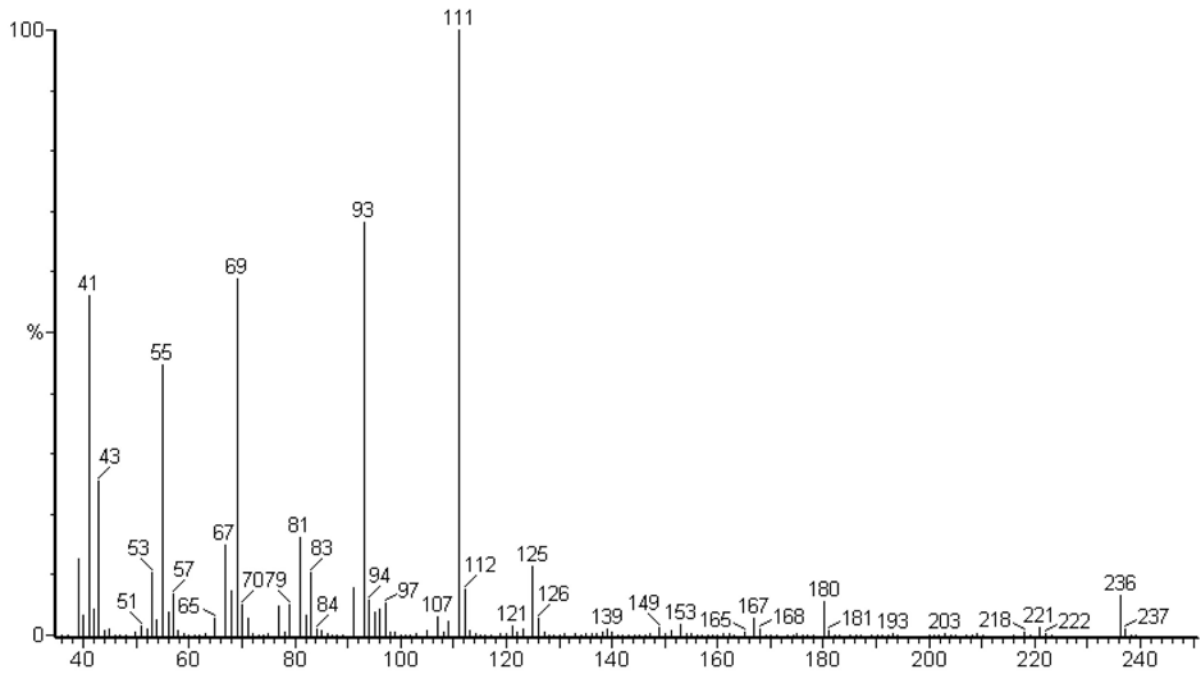
360. Lloyd H.A., Evans S.L., Fales H.M., Terpene Alcohols of *Helichrysum dendroideum* II., *Tetrahedron Lett.*, 1978, **41** (5), 494-496.
361. Proença da Cunha A., Cardoso do Vale J., Contribuição para o estudo da composição química do óleo essencial de *Helichrysum stoechas* (L.) D.C. Var. *α -syncladum* (Jord. et Fourr.) Rouy, *Boletim da Faculdade de Farmácia*, Universidade de Coimbra, 1974, **34**, 5.
362. Kuate J.-R., Zollo P.H.A., Nguéfa E.H., Bessière J.M., Lamaty G., Menut C., Composition of the essential oils from the leaves of *Microglossa pyrifolia* (Lam.) O. Kuntze and *Helichrysum odoratissimum* (L.) Less. growing in Cameroon, *Flavour Fragr. J.*, 1999, **14**, 82-84.
363. Lwande W., Hassanali A., Wanyama O.B., Ngola S., Mwangi J.W., Constituents of the Essential Oil of *Helichrysum odoratissimum* (L.) Less., *J. Essent. Oil Res.*, 1993, **5**, 93-95.
364. Gundidza M.G., Zwaving J. H., The Chemical Composition of the Essential Leaf Oil of *Helichrysum odoratissimum* Sweet from Zimbabwe, *J. Essent. Oil Res.*, 1993, **5**, 341-343.
365. Tsoukatou M., Roussis V., Chinou L., Petrakis P.V., Ortiz A., Chemical Composition of the Essential Oils and Headspace Samples of two *Helichrysum* Species Occuring in Spain, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 511-516.
366. Blazevic N., Petricic J., Stanic G., Males Z., Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss.) essential oil from different locations and vegetation periods along Adriatic coast, *Acta Pharm.*, 1995, **45**, 517-522.
367. Weyerstahl P., Marschall-Weyerstahl H., Weirauch M., Meier N., Manteuffel E., Leimner J., Scholz S., Isolation and synthesis of compounds from the essential oil of *Helichrysum italicum*. In : Progress in Essential Oil Research, E.-J. Brunke, Walter de Gruyter, 1986, Berlin, 177-195.
368. Leimner J., Marschall H., Meier N., Weyerstahl P., Italicene and isoitalicene, novel sesquiterpene hydrocarbons from *Helichrysum* oil, *Chem. Lett.*, 1984, 1769-1772.

369. Puerta R., Garcia M.D., Saenz M.T., Gil A.M., Analysis of the Essential Oil from *Helichrysum picardii*, *Planta Med.*, 1993, **59**, 94-95.
370. Chagonda L.S., Makanda C., Chalchat J.-C., Essential Oils of Four Wild and Semi-Wild Plants from Zimbabwe : *Colospermum mopane* (Kirk ex Benth.) Kirk ex Leonard, *Helichrysum splendidum* (Thunb.) Less, *Myrothamnus flabellifolia* (Welw.) and *Tagetes minuta* L., *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 573-578.
371. Chinou I.B., Roussis V., Perdetzoglou D., Tzakou O., Loukis A., Chemical and Antibacterial Studies of two *Helichrysum* Species of Greek Origin, *Planta Med.*, 1997, **63**, 181-183.
372. Tucker A.O., Maciarelo M.J., Charles D.J., Simon J.E., Volatile Leaf Oil of the Curry Plant [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum*] and Dwarf Curry Plant [subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman] in the North American Herb Trade, *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 583-585.
373. Satta M., Tuberoso C.I.G., Angioni A., Pirisi F.M., Cabras P., Analysis of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym., *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 711-715.
374. Bianchini A., Tomi P., Costa J., Bernardini A.-F., Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France), *Flavour Fragr. J.*, 2001, **16**, 30-34.
375. Roussis V., Tsoukatou M., Petrakis P.V., Chinou I., Skoula M., Harborne J.B., Volatile constituents of four *Helichrysum* species growing in Greece, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, **28**, 163-175.
376. Lawrence B.M., Reynolds R.J., *Helichrysum* Oil and Extract. In : Progress in Essential Oils, *Perfumer & Flavorist*, 1998, **23**, 55-59.
377. Ramanoelina P.A.R., Bianchini J.P., Gaydou E.M., Chemical Composition of Essential Oil of *Helichrysum bracteiferum*, *J. Essent. Oil Res.*, 1992, **4**, 531-532.
378. Theron E., Holeman M., Potin-Guatier M., Pinel R., Etudes du vieillissement d'huiles essentielles malgaches riches en 1,8-cineole. Partie I : *Helichrysum*

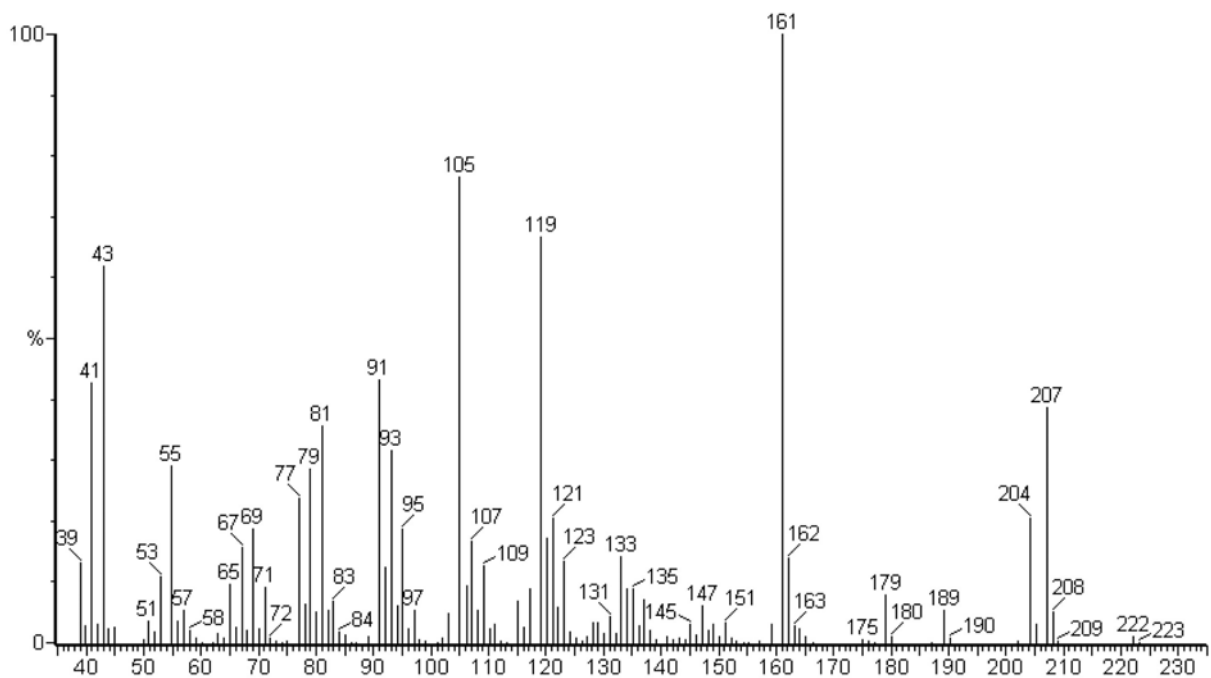
- gymnocephalum* - Partie II : *Ravensara aromatica*, *Rivista Ital. EPPOS*, 1994, **76**, 33-38.
379. Çubukçu B., Damadyan B., Flavonoides d'*Helichrysum graveolens*, *Fitoterapia*, 1986, **57**, 124-127.
380. Maffei Facino R., Carini M., Mariani M., Cipriani C., Anti-erythematous and photoprotective activities in Guinea pigs and in man of topically applied flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don, *Acta Therapeutica*, 1988, **14**, 323-345.
381. Maffei Facino R., Carini M., Franzoi L., Pirola O., Bosisio E., Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae), *Pharmalogical Research*, 1990, **22**, 709-721.
382. Meriçli A.H., Ergezen K., Çubukçu B., Constituents of *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri*, *Fitoterapia*, 1992, **63**, 475.
383. Jakupovic J., Grenz M., Bohlmann F., Mungai G.M., 12 β -hydroxyabiet-7,13-diene and other constituents from East African *Helichrysum* species, *Phytochemistry*, 1990, **29**, 1589-1590.
384. Pinkas M., Torck M., Bézanger-Beauquesne L., Recherches sur les flavonoïdes des fleurs d'*Helichrysum stoechas* DC., *Plantes médicinales et phytothérapie*, 1973, **7**, 332-335.
385. Meriçli A.H., Damadyan B., Çubukçu B., Flavonoids of Turkish *Helichrysum arenarium* (L.) Moench (Asteraceae), *Scientia Pharmaceutica*, 1986, **54**, 363-365.
386. Pietta P., Mauri P., Gardana C., Maffei Facino R., Carini M., High-performance liquid chromatographic determination of flavonoid glucosides from *Helichrysum italicum*, *Journal of Chromatography*, 1991, **537**, 449-452.
387. Pietta P., Mauri P., Maffei Facino R., Carini M., Analysis of flavonoids by MECC with ultraviolet diode array detection, *Journal of Pharmaceutical & Biochemical Analysis*, 1992, **10**, 1041-1045.
388. Sivakumar R., Ramachandran Nair A.G., Madhusudhanan K.P., Polyphenolic components of flowers of *Helichrysum bracteatum*, *Current Science*, 1995, **69**, 23-24.

389. De La Puerta R., Garcia M.D., Saenz M.T., Phenolics from *Helichrysum picardii*, *Fitoterapia*, 1994, **65**, 375.
390. Orzalesi G., Mezzetti T., Bellavita V., Un nuovo lattone triterpenico naturale, α -amirina e uvaolo da « *Helichrysum italicum* » (G. Don), *Boll. Chim. Farm.*, 1969, **108**, 540-545.
391. Çubukçu B., Sur les dérivés flavoniques et coumariniques d'*Helichrysum orientale* (L.) Gaertner, *Plantes médicinales et phytothérapie*, 1976, **10**, 44-53.
392. Jakupovic J., Pathak V.P., Bohlmann F., King R.M., Robinson H., Obliquin derivatives and other constituents from Australian *Helichrysum* species, *Phytochemistry*, 1987, **26**, 803-807.
393. Mariotti J.P., Analyse d'huiles essentielles par chromatographies et RMN du carbone-13 : *Cistus ladaniferus*, *Cistus monspeliensis* et *Stachys glutinosa*, Thèse de doctorat, Univ. Corse, France, 1994.
394. De Buyck L.F., De Pooter H.L., Schamp N.M., De Bruyn A., Zhang W., Budešínský M., Motl O., Terpenes from *Otacanthus coeruleus* Lindl. Identification of β -Copaen-4 α -ol and a New Criterion for Discriminating Between Isomeric Copaene and Ylangene Structures, *Flavour Fragr. J.*, 1989, **4**, 53-57.
395. Whitesell J.K., Minton M.A., Stereochemical Analysis of Alicyclic Compounds by C-13 NMR Spectroscopy, Chapman and Hall, 1987, London, 69.

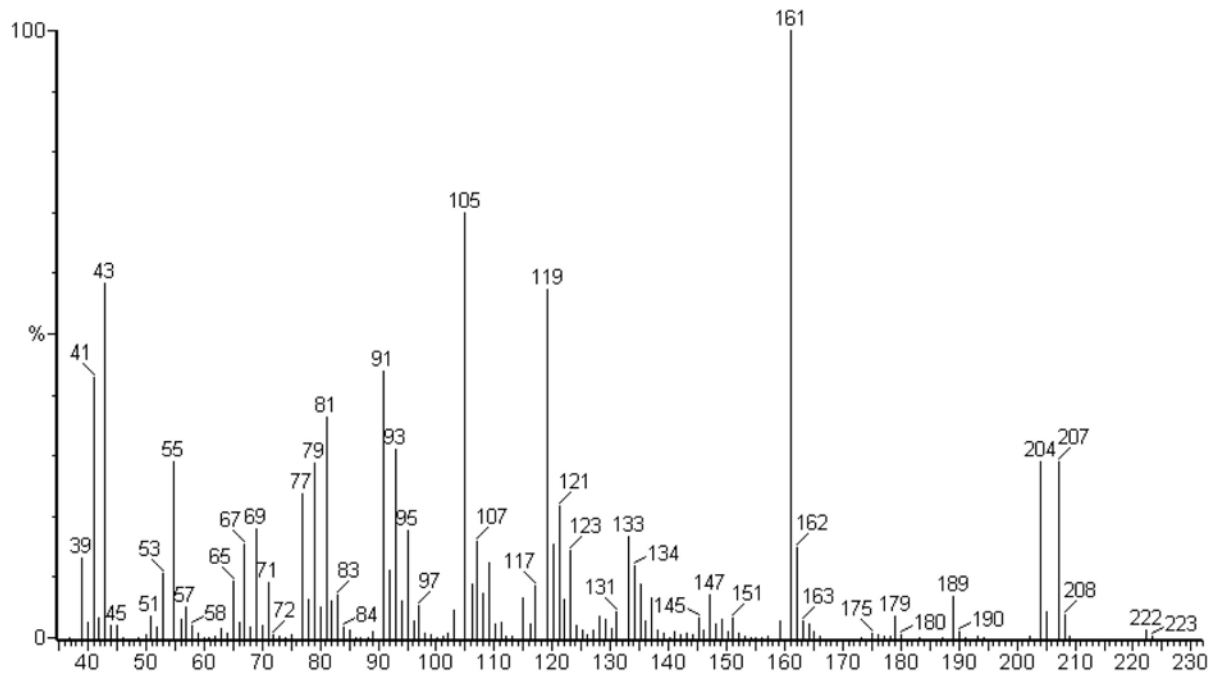
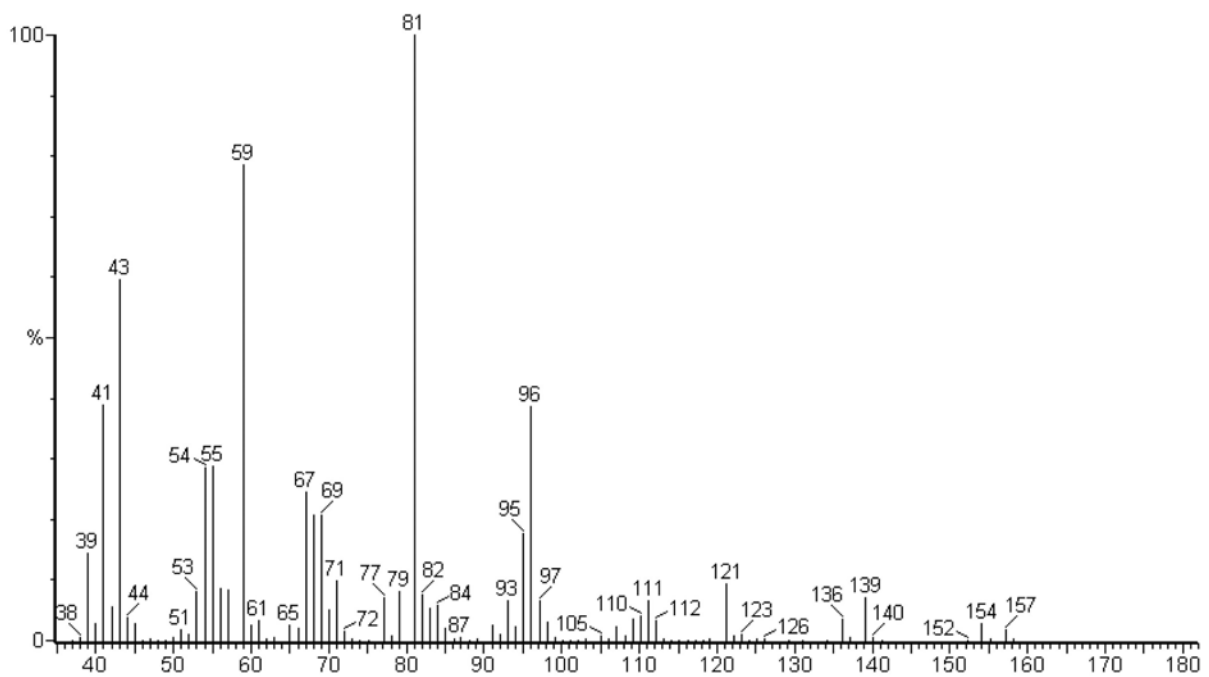
ANNEXES

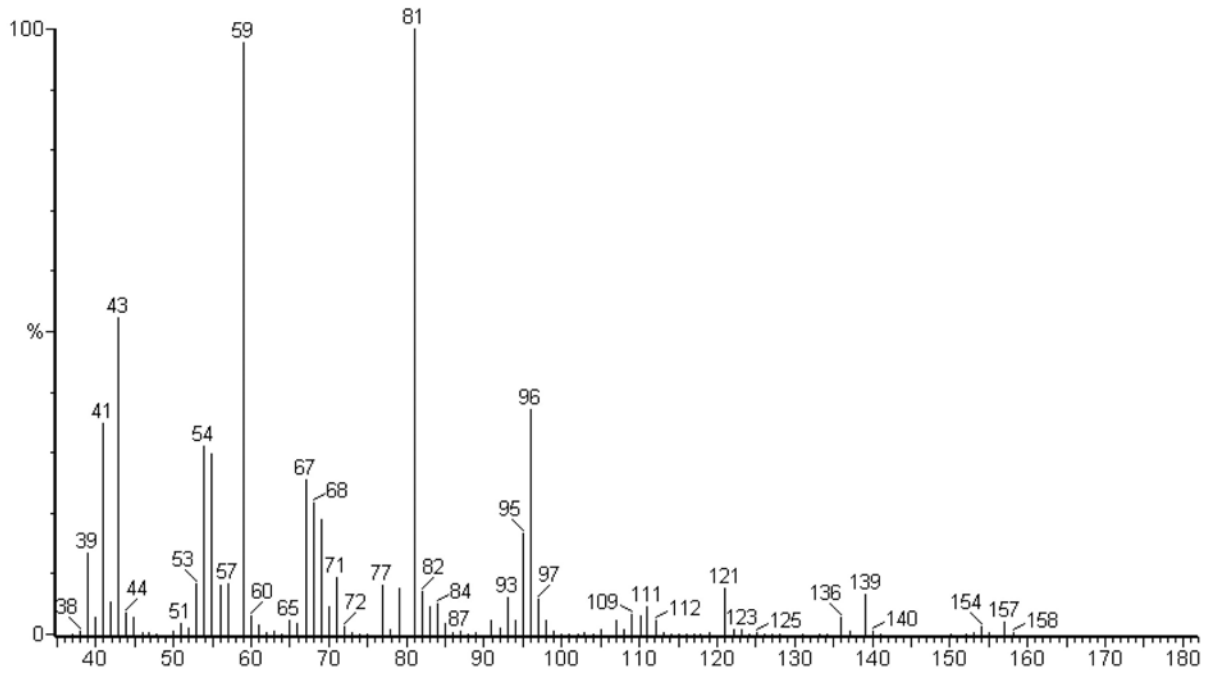
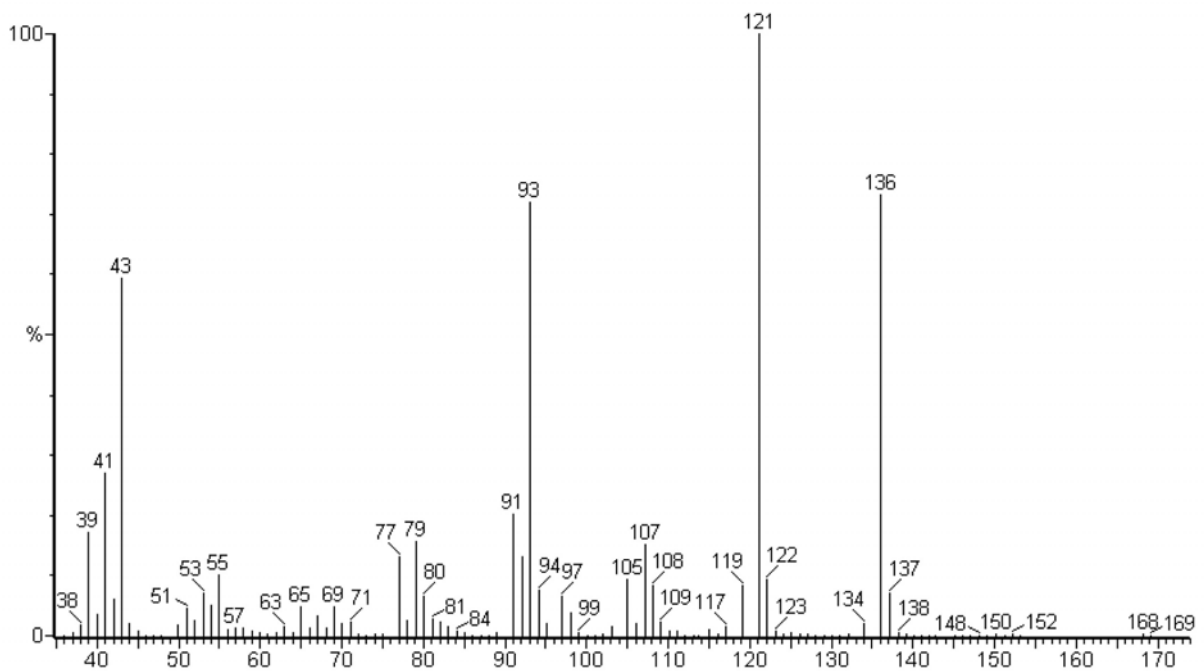


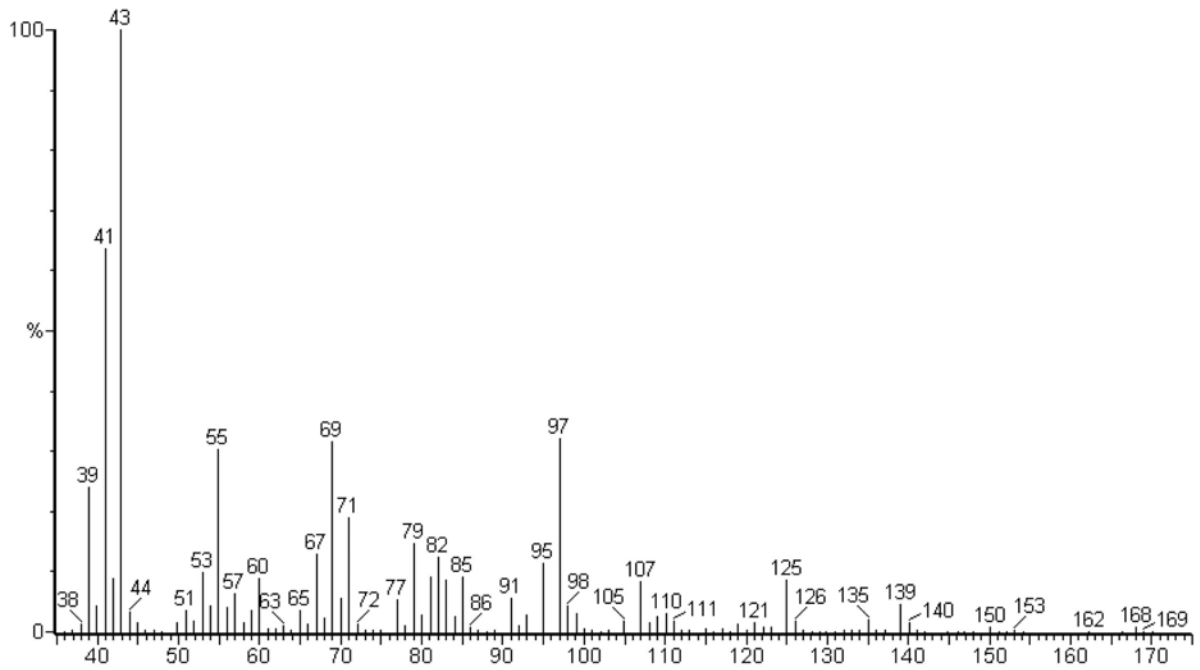
Spectre de masse de la cis-davanone 1



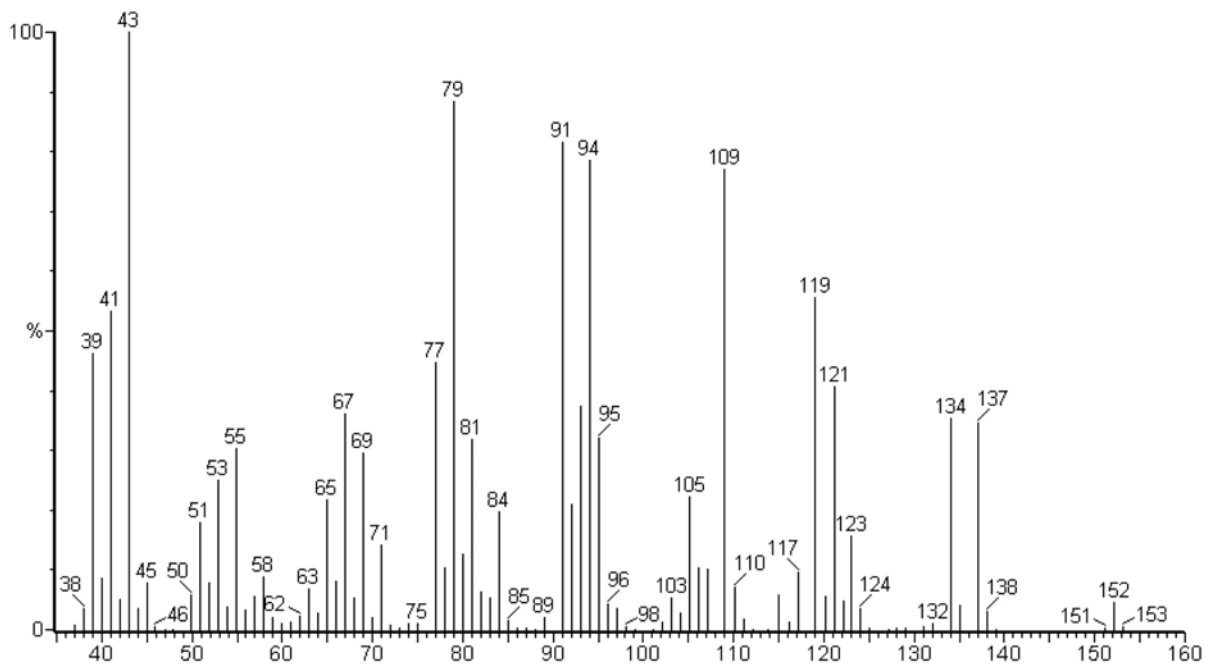
Spectre de masse du cubebol 2

Spectre de masse du 4-épi-cubébol **3**Spectre de masse du 8-hydroxynéomenthol **4**

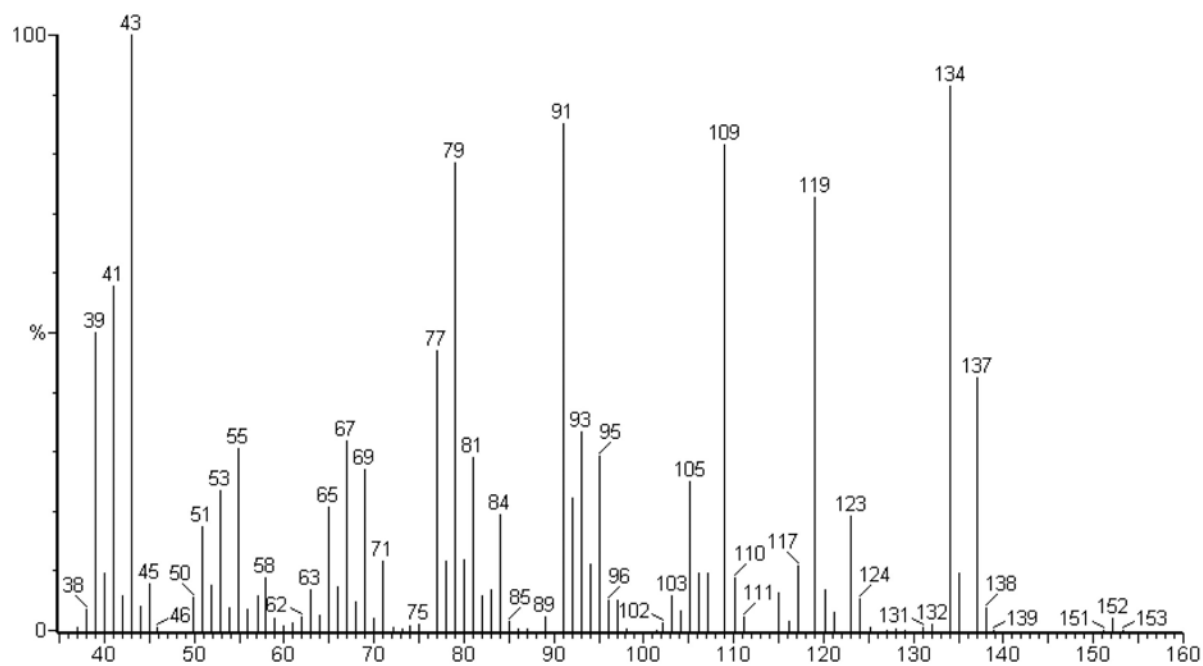
Spectre de masse du 8-hydroxymenthol 5Spectre de masse de l'ascaridole 6



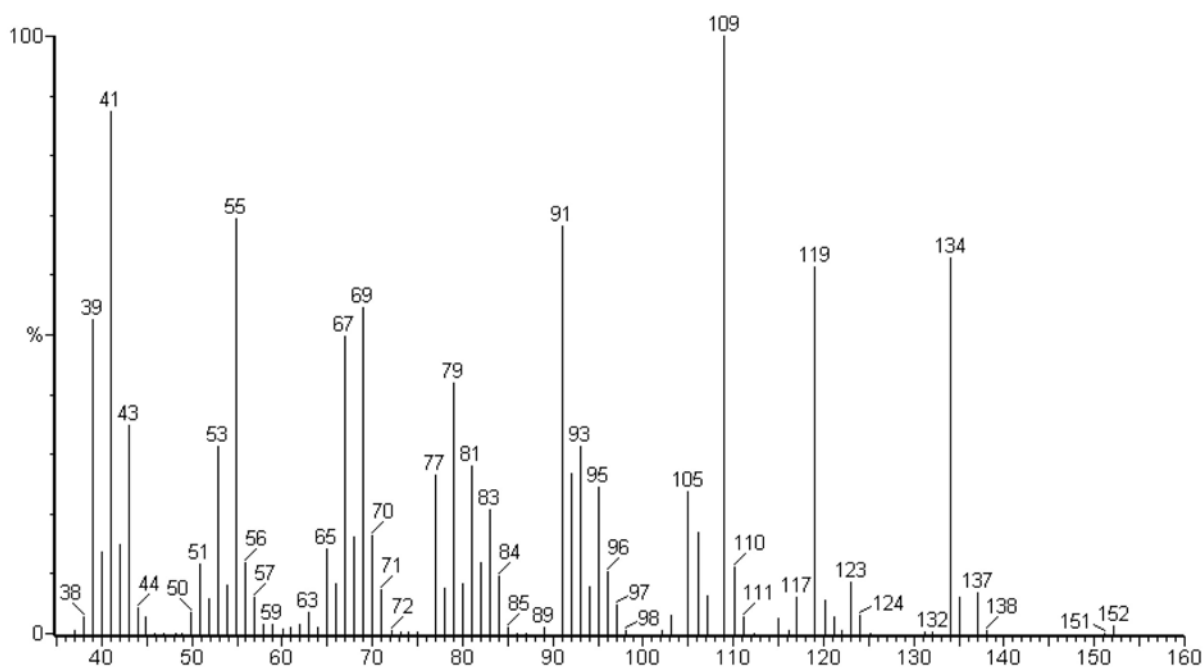
Spectre de masse de l'isoascaridole **7**



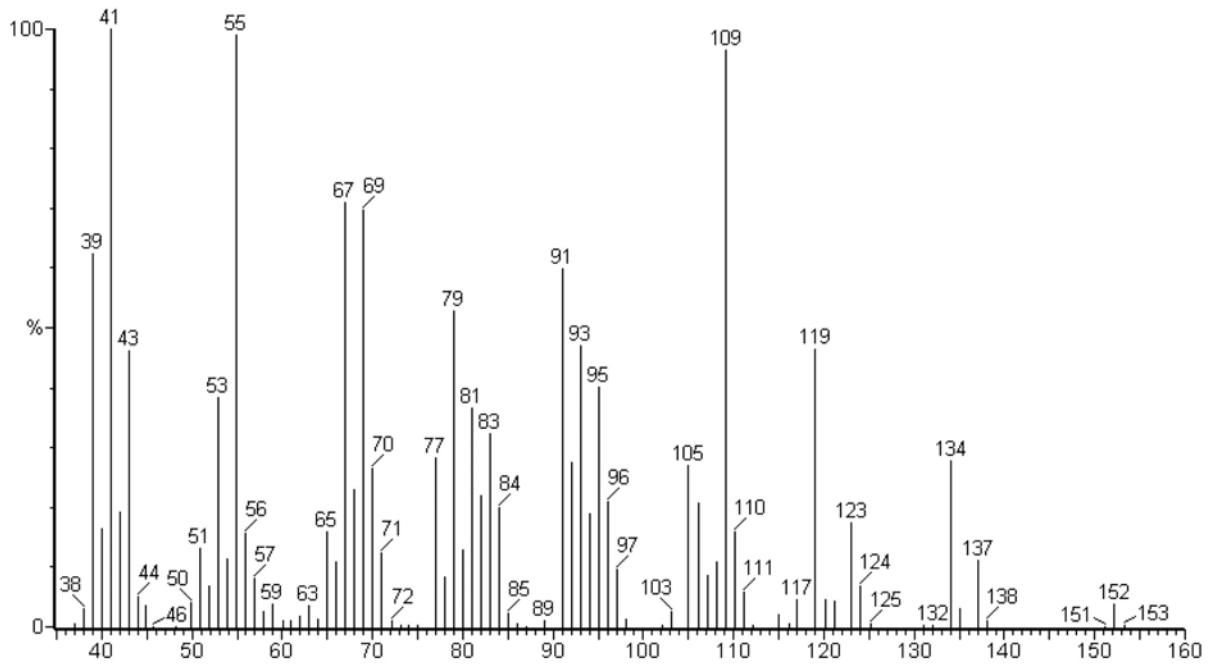
Spectre de masse du trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol **8**



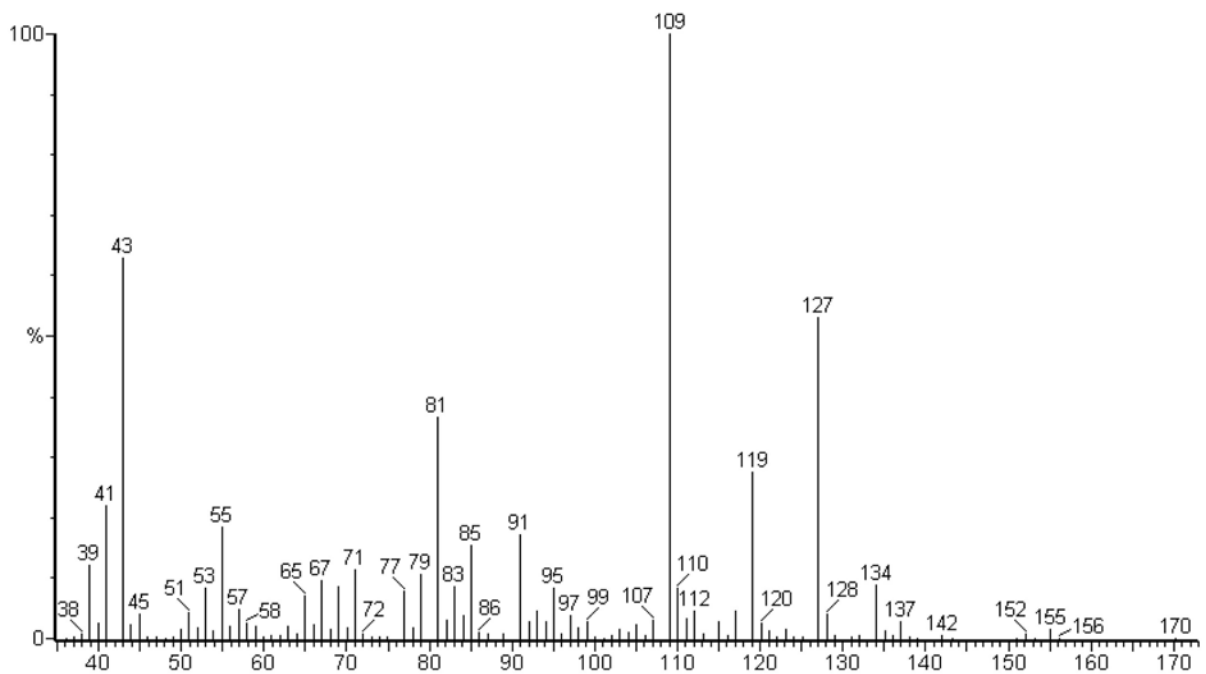
Spectre de masse du cis-p-mentha-2,8-dièn-1-ol **9**



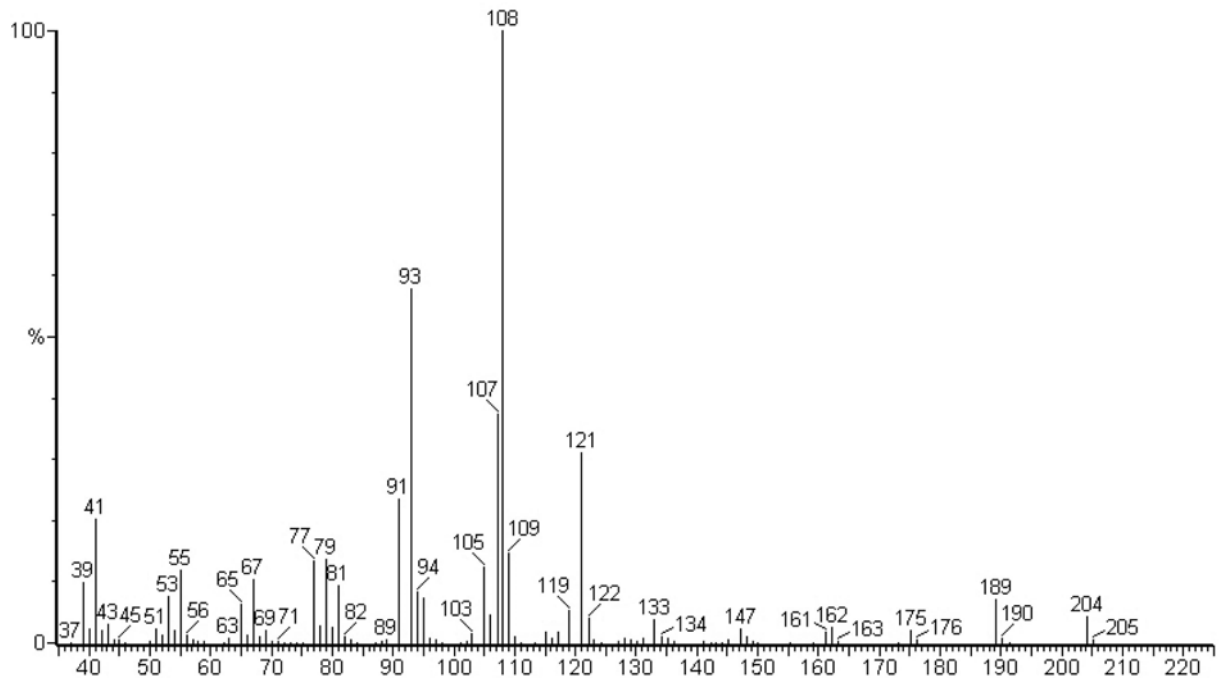
Spectre de masse du trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol **10**



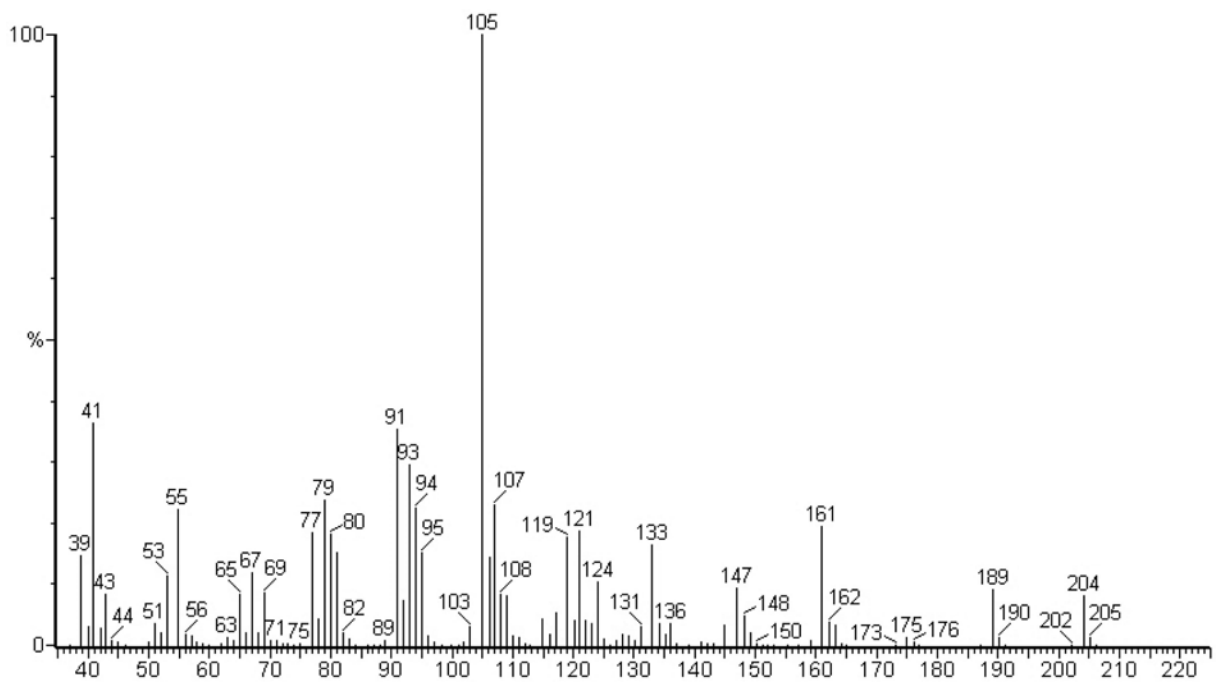
Spectre de masse du cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol **11**



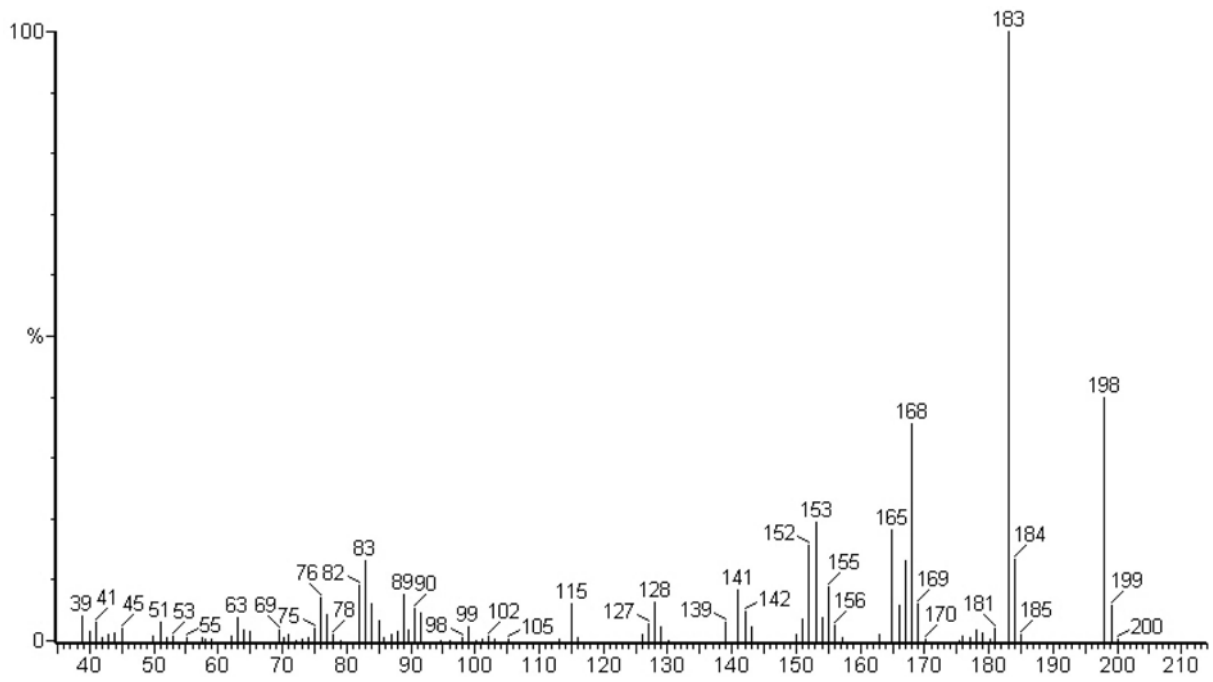
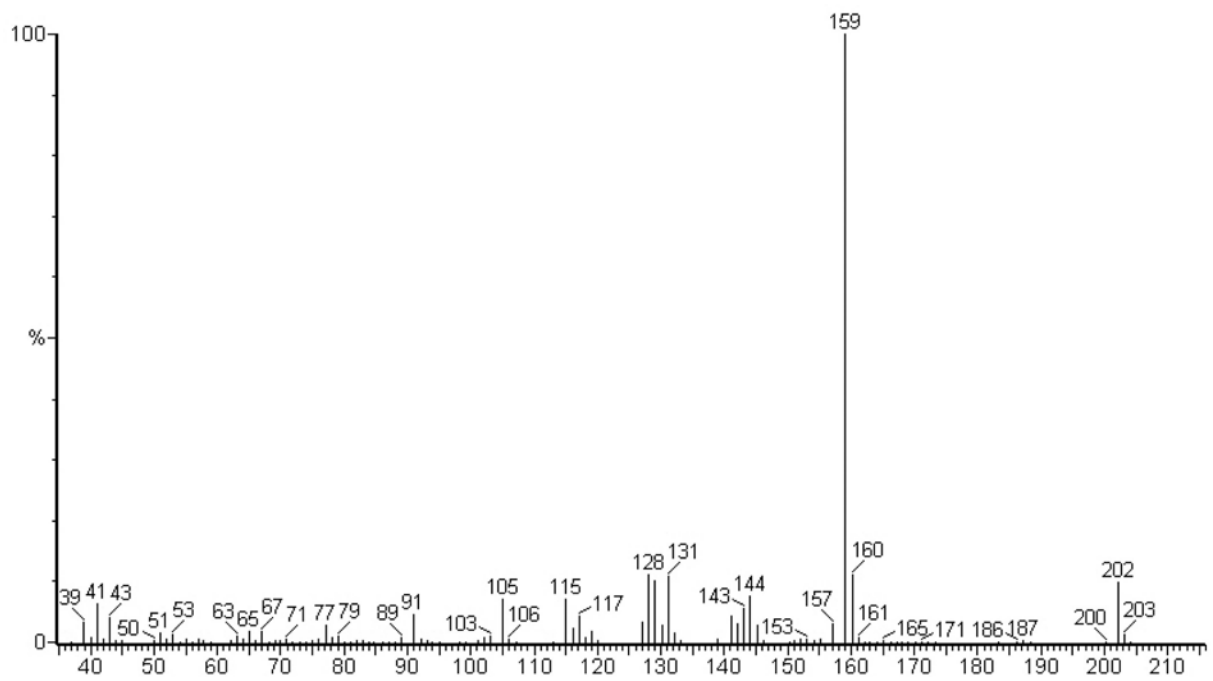
Spectre de masse du 1,4-dihydroxy-p-menth-2-ène **12**

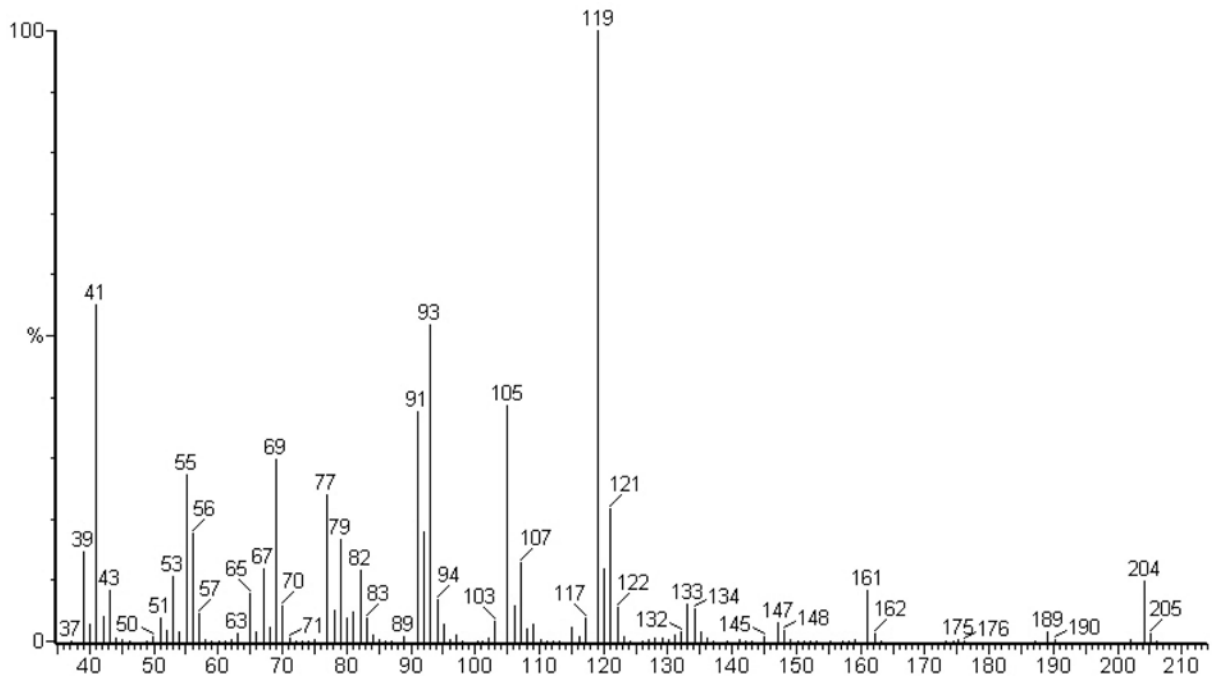
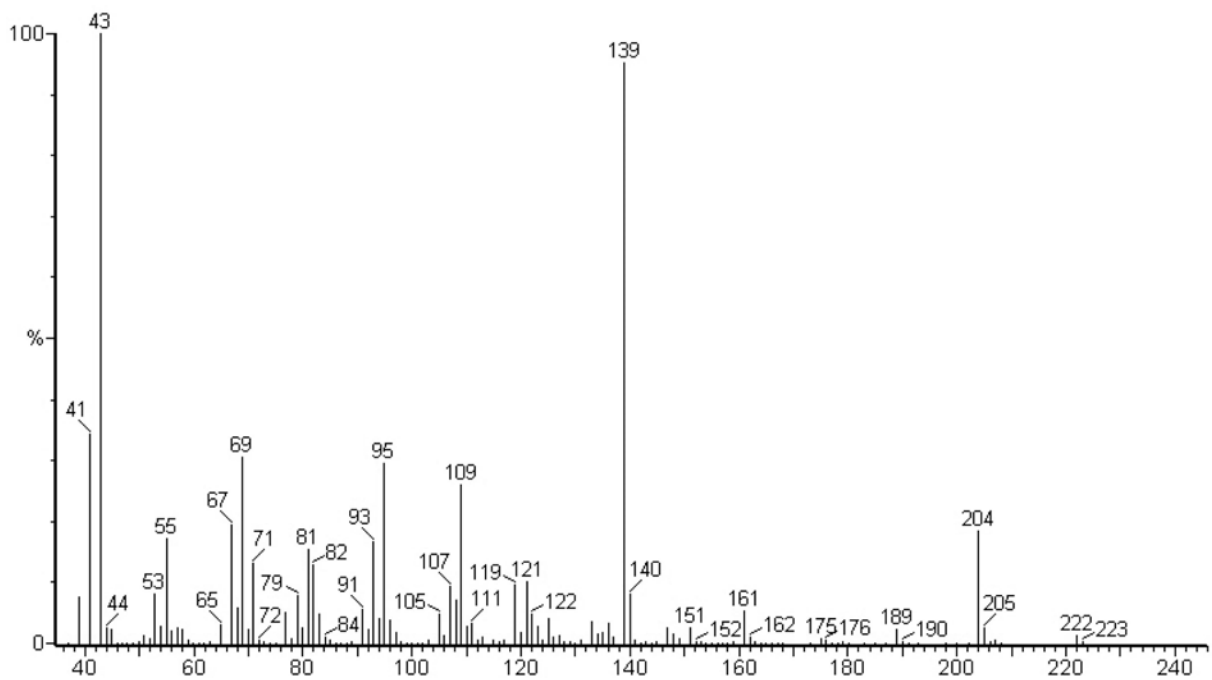


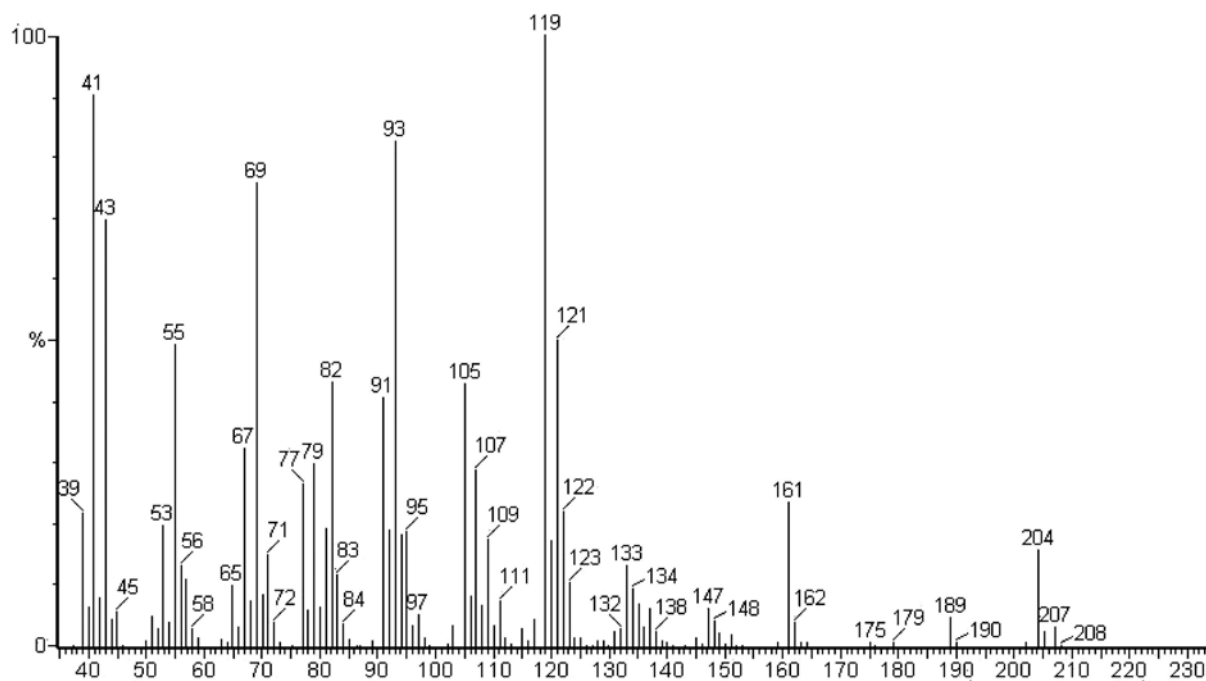
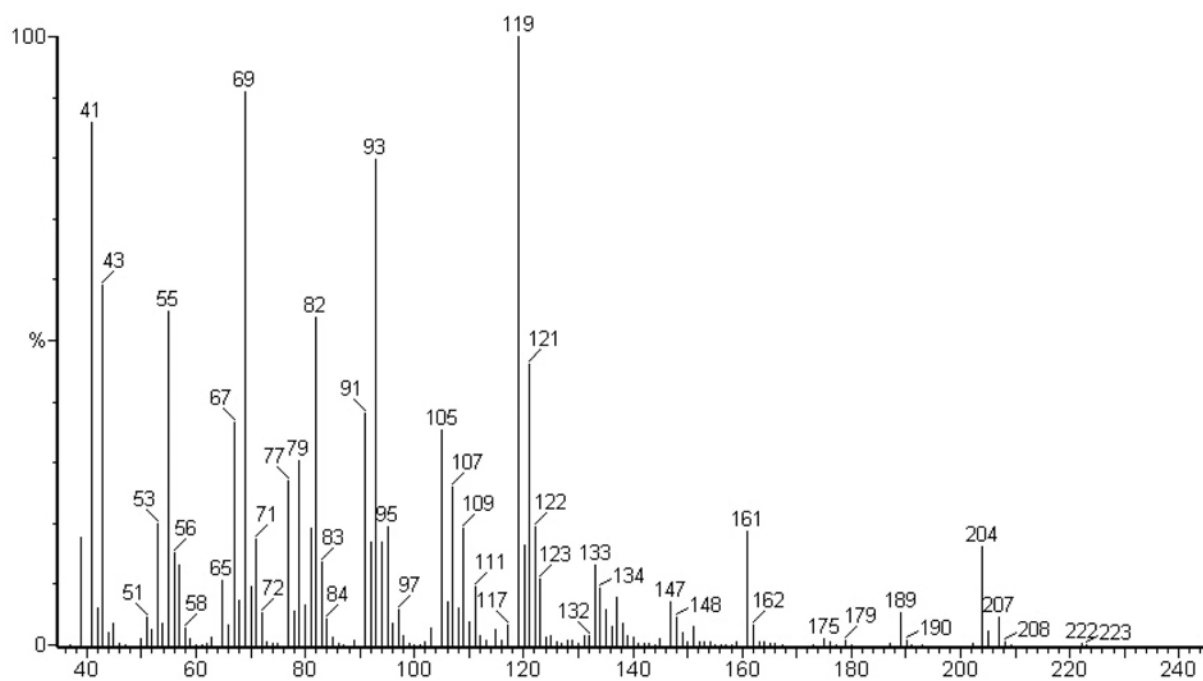
Spectre de masse du rotundène **14**

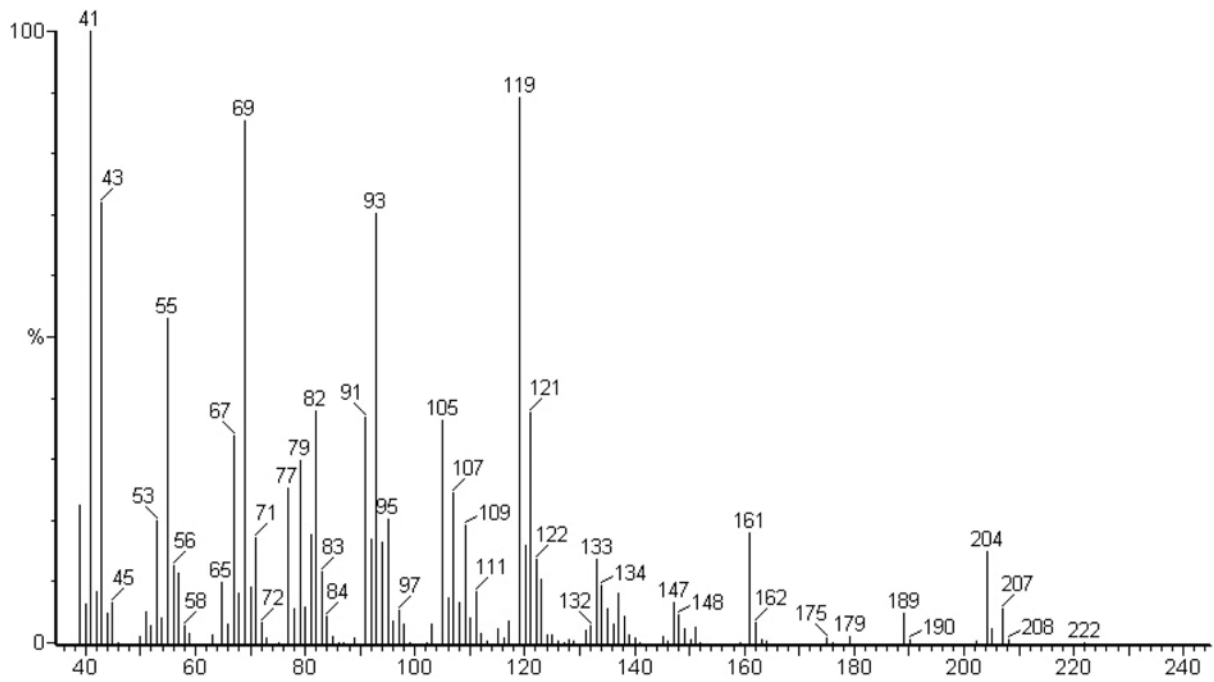


Spectre de masse du 4,5-di-épi-aristolochène **15**

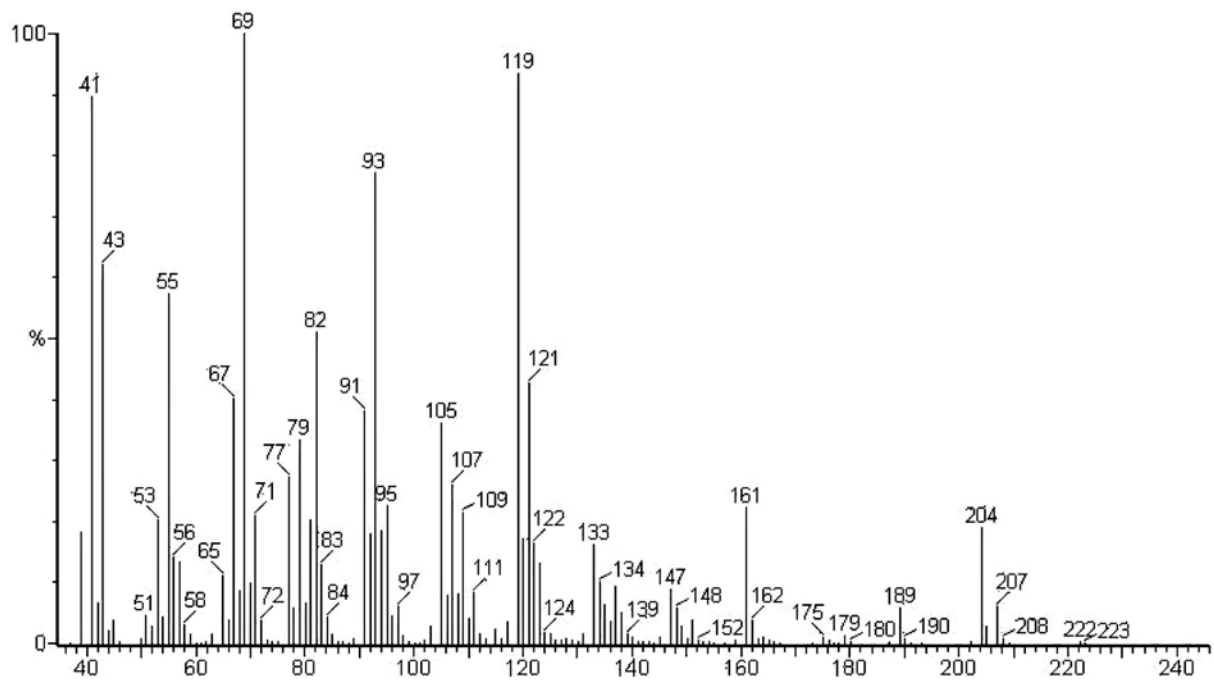
Spectre de masse du cadalène **16**Spectre de masse du trans-calaménène **17**

Spectre de masse du β -curcumène **18**Spectre de masse du sesquicinnole **19**

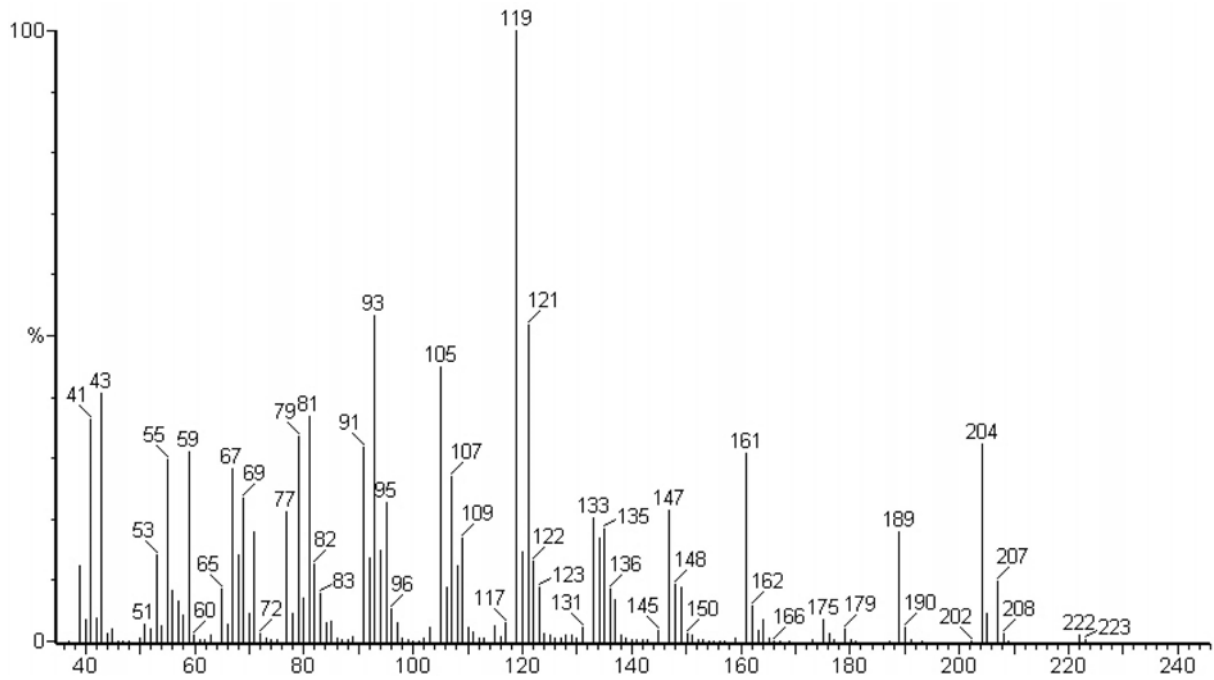
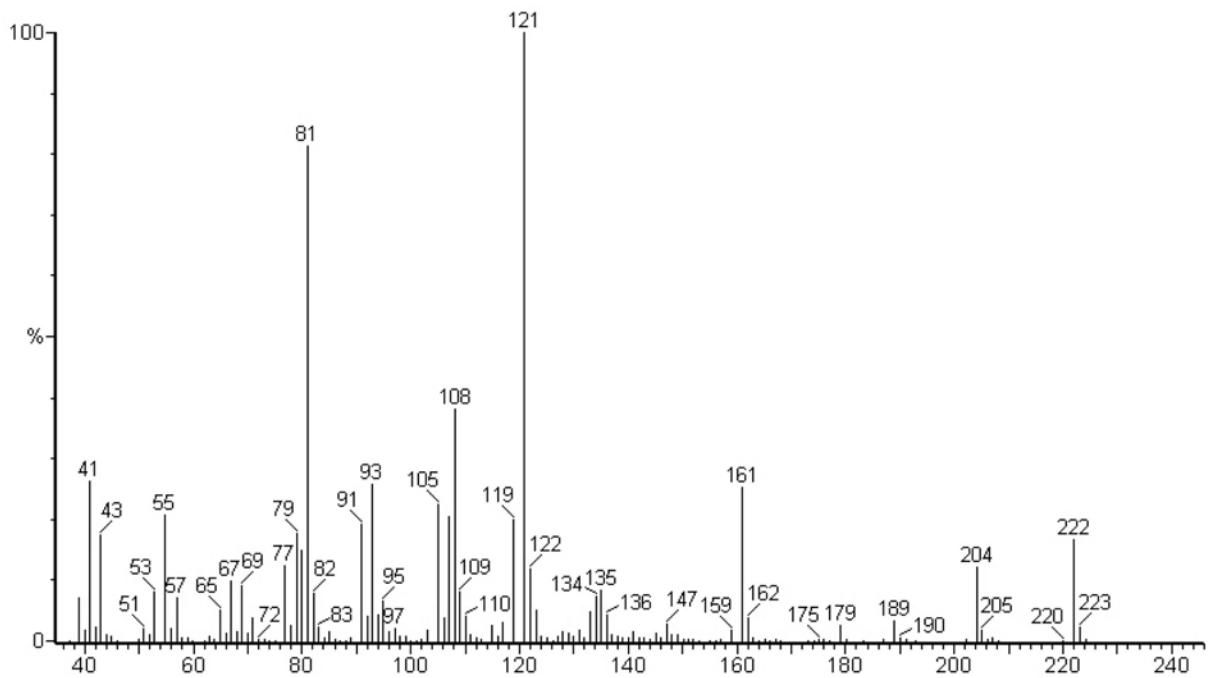
Spectre de masse de l'hydrate de trans-sesquibinène **20**Spectre de masse de l'hydrate de 7-épi-trans-sesquibinène **21**

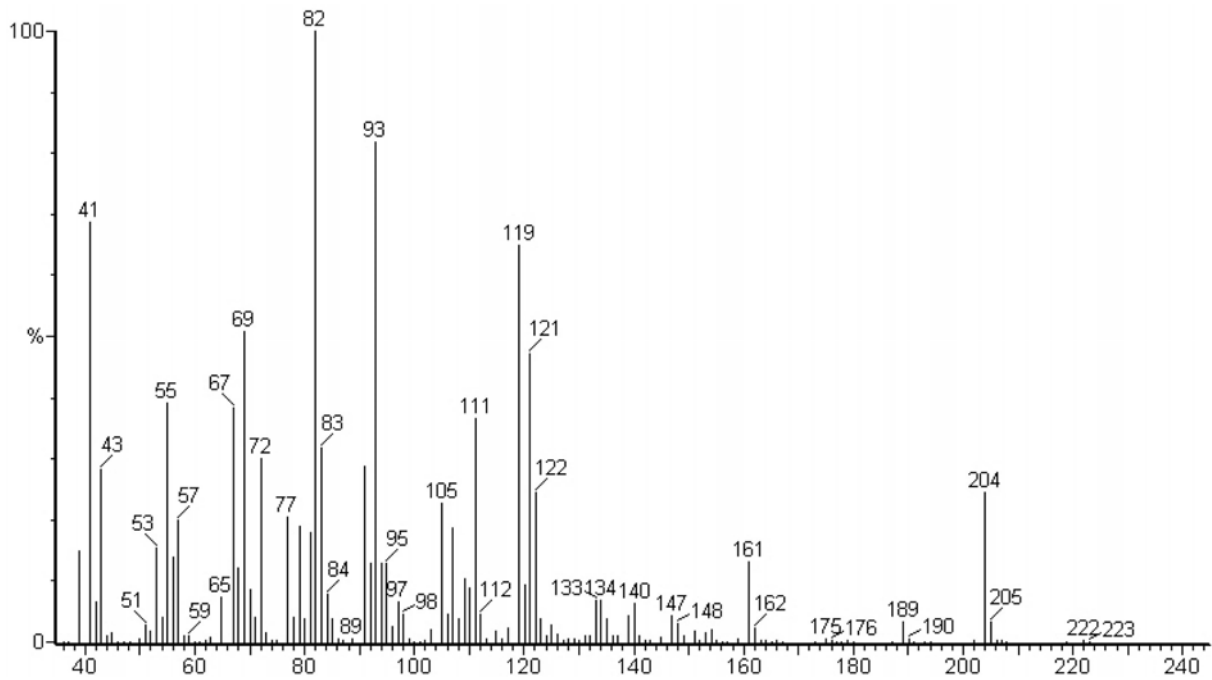


Spectre de masse de l'hydrate de cis-sesquibinène **22**

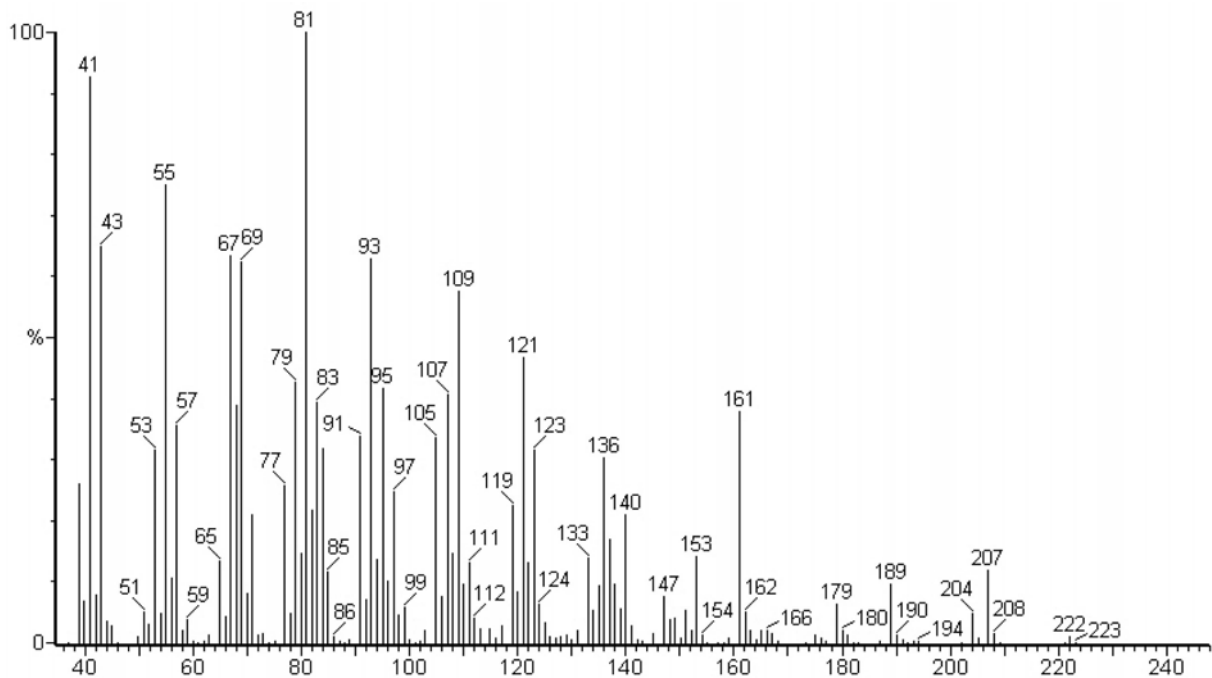


Spectre de masse de l'hydrate de 7-épi-cis-sesquibinène **23**

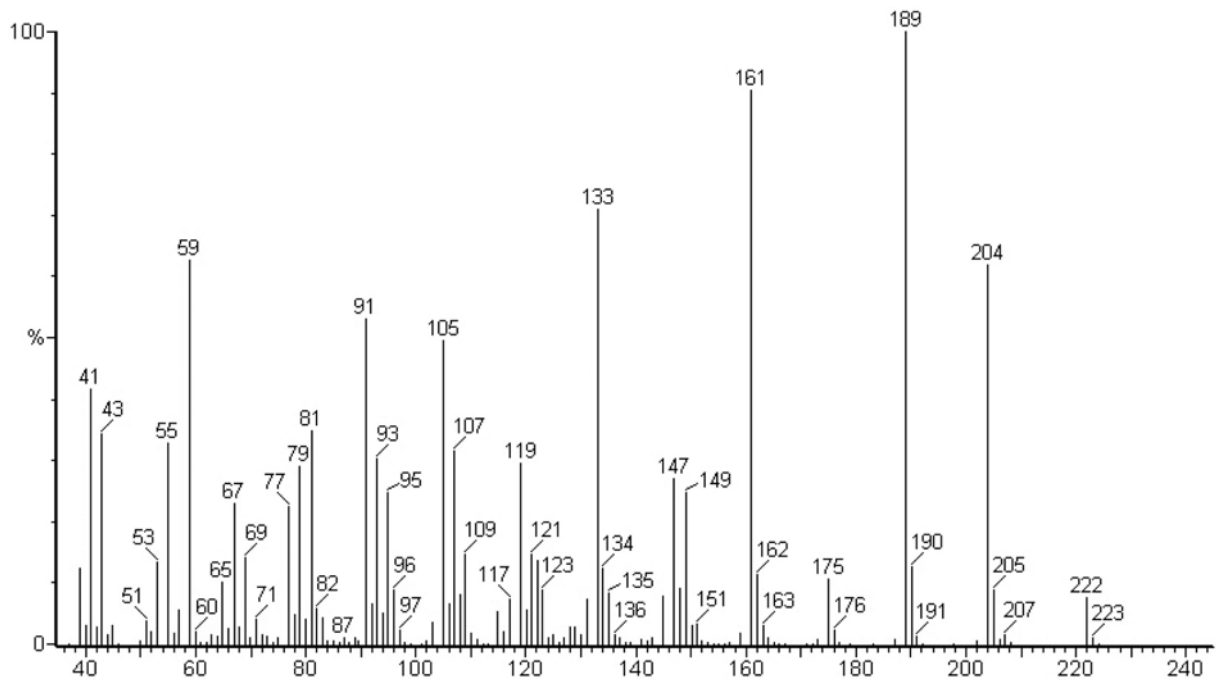
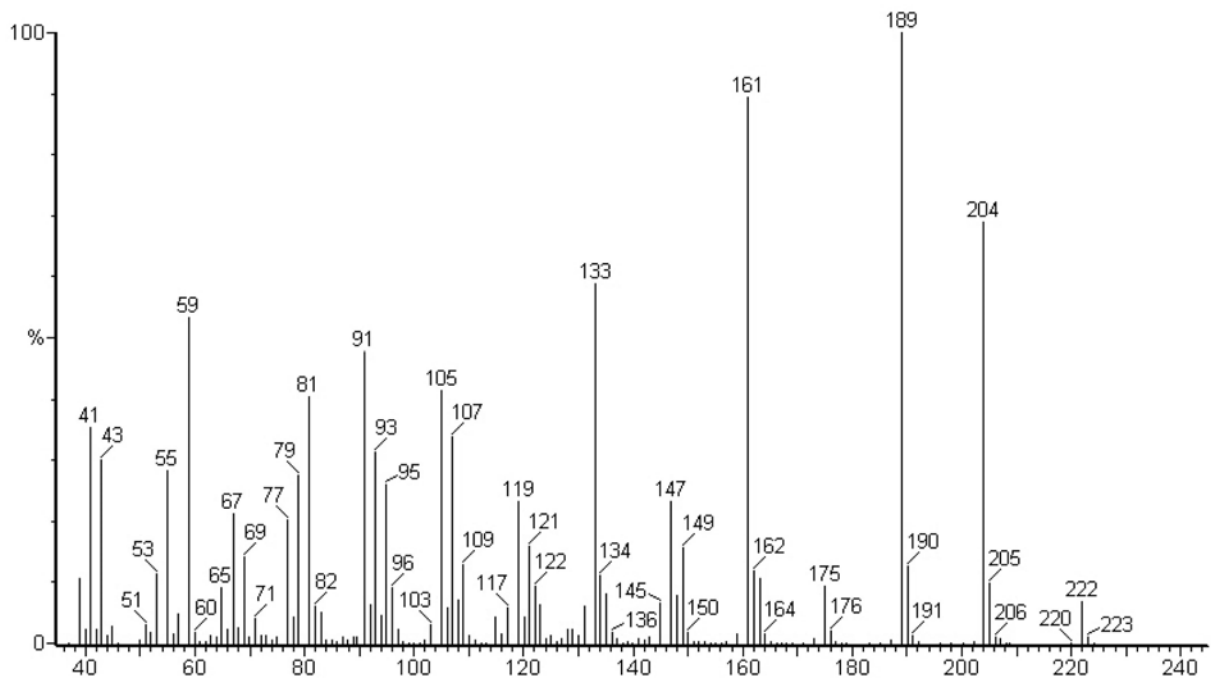
Spectre de masse de l' α -acorénol **24**Spectre de masse du gleenol **25**

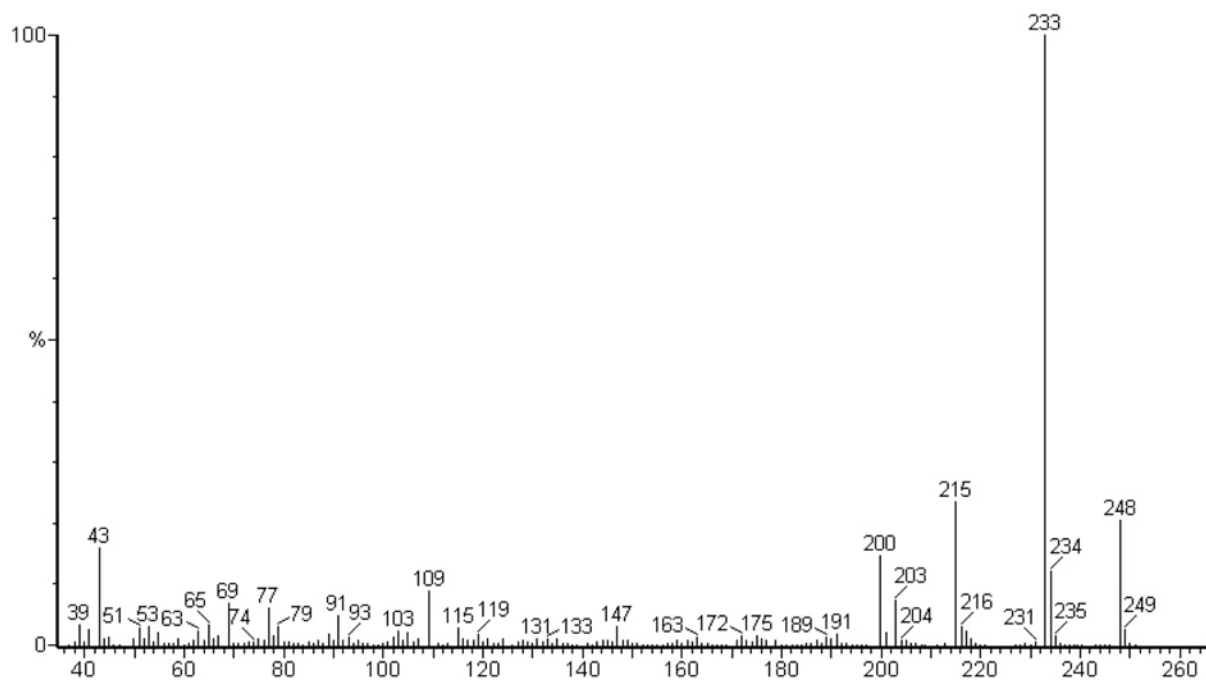
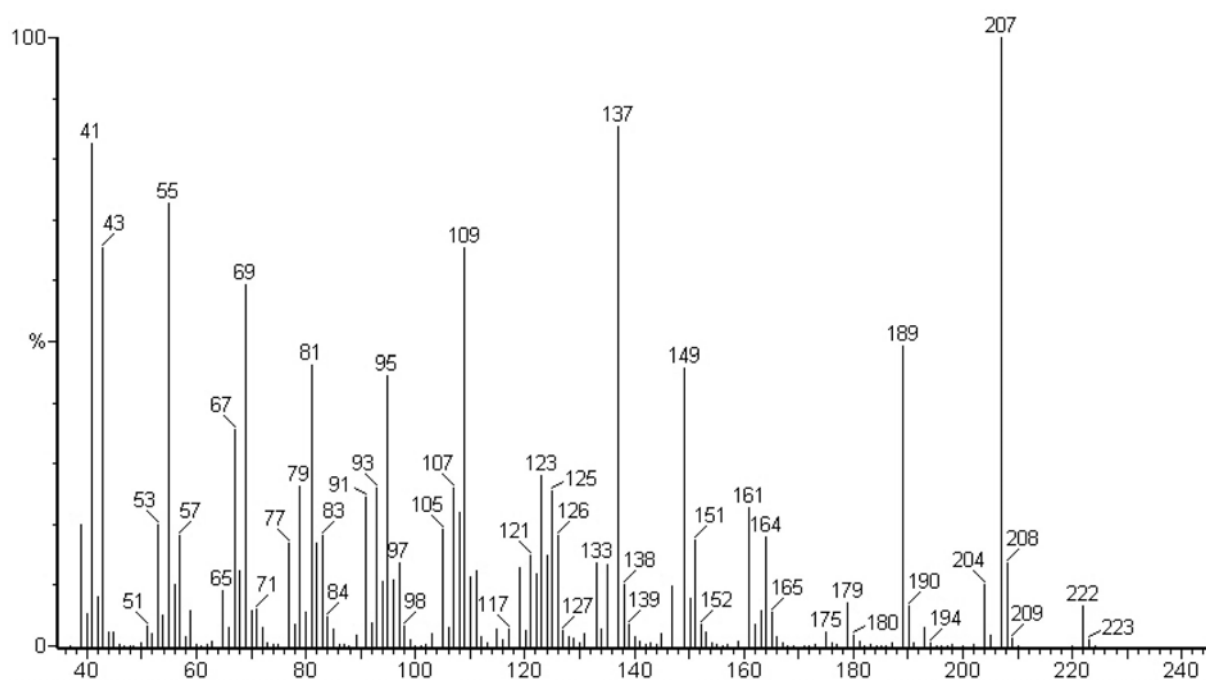


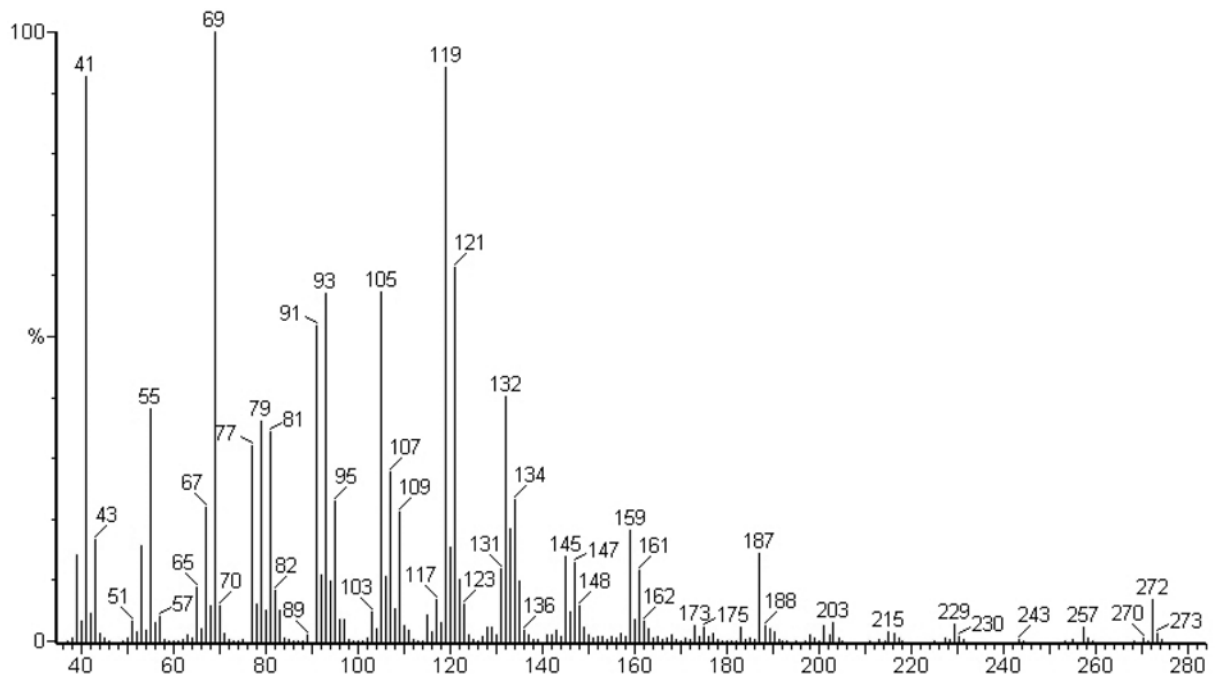
Spectre de masse du β -bisabolol **26**



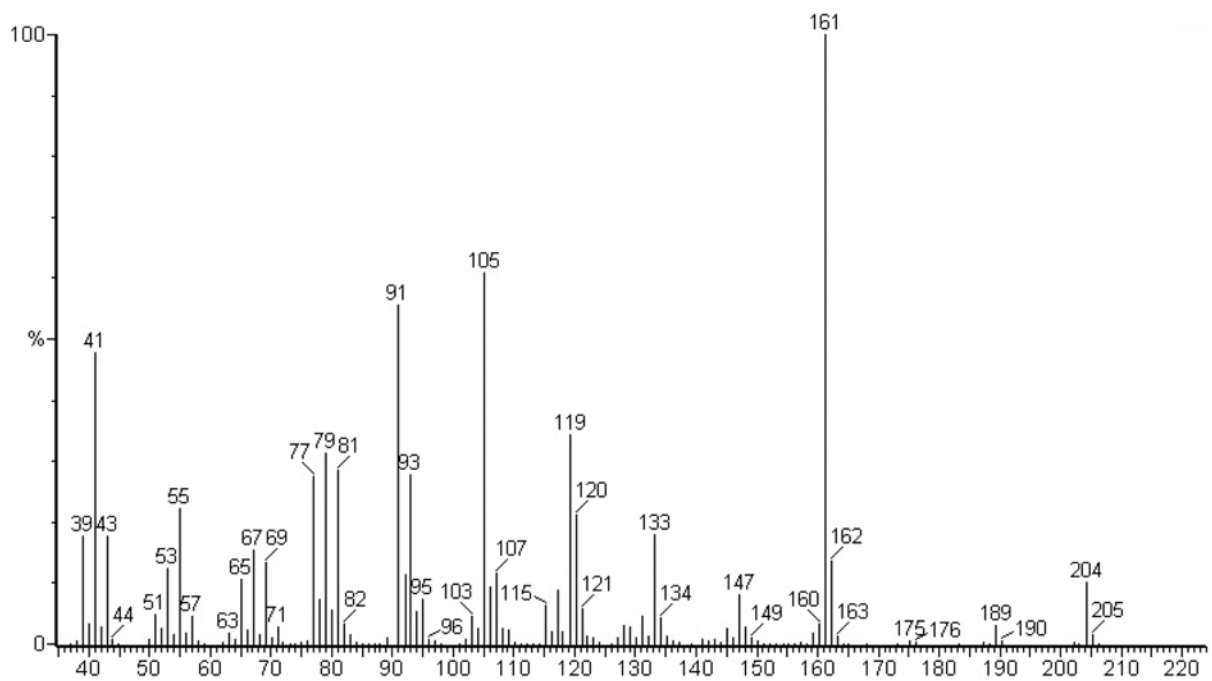
Spectre de masse du 6-épi-shyobunol (éléma-1,3-diène-6 α -ol) **27**

Spectre de masse du 8-épi- γ -eudesmol **28**Spectre de masse du γ -eudesmol **29**

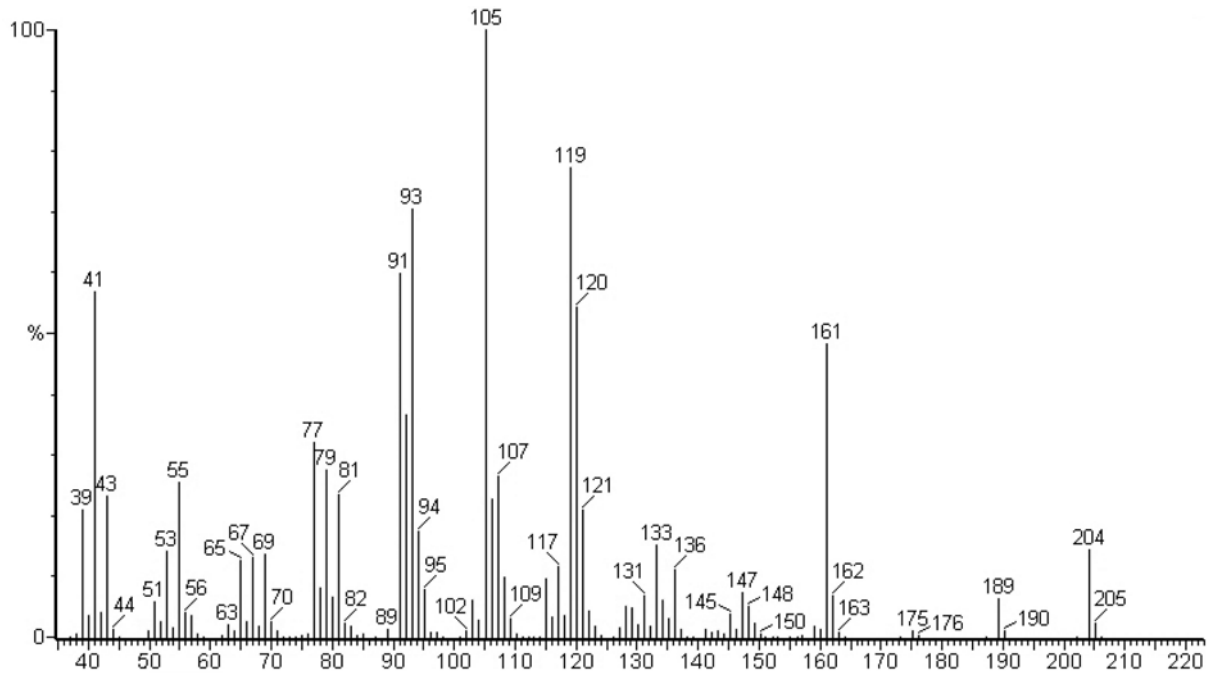
Spectre de masse de l'alloévodionol **30**Spectre de masse du 4-épi-cis-dihydroagarofurane **31**



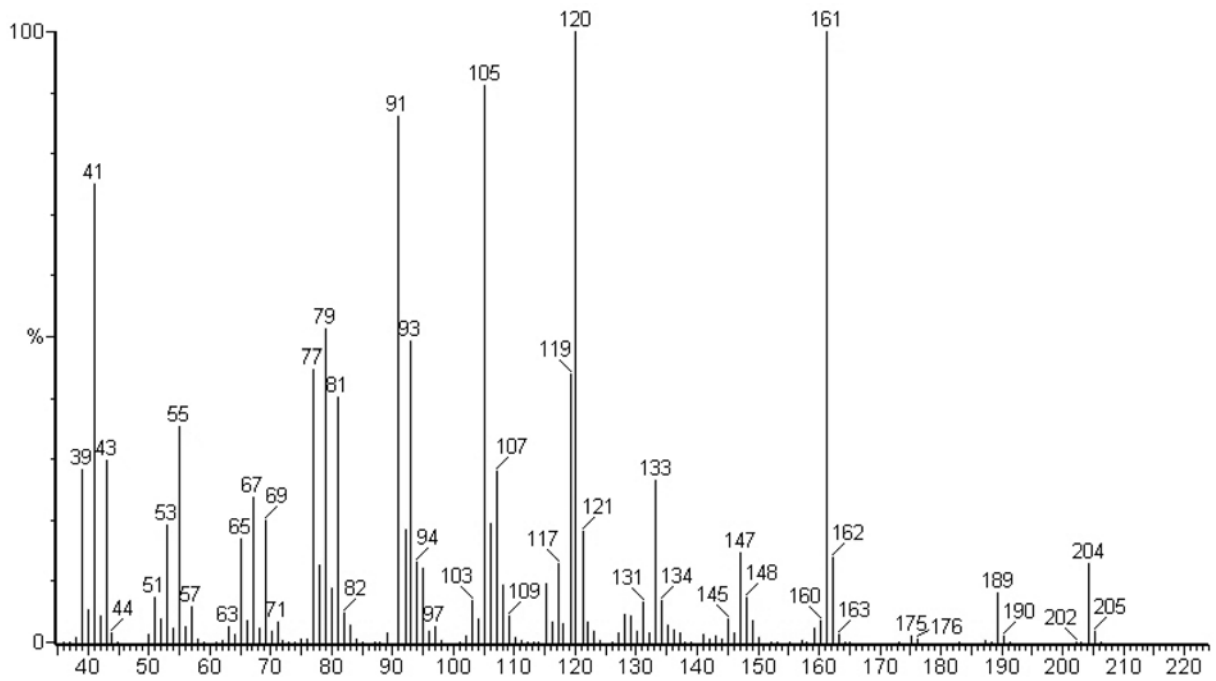
Spectre de masse du géranyl- α -terpinène **32**



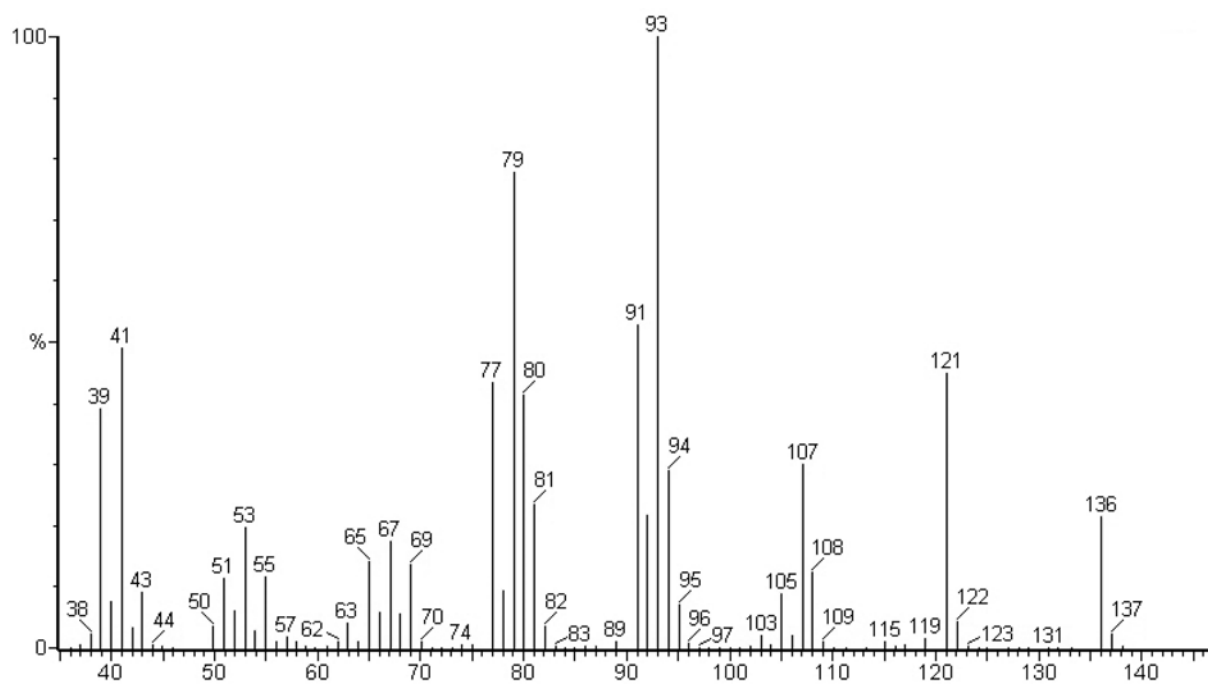
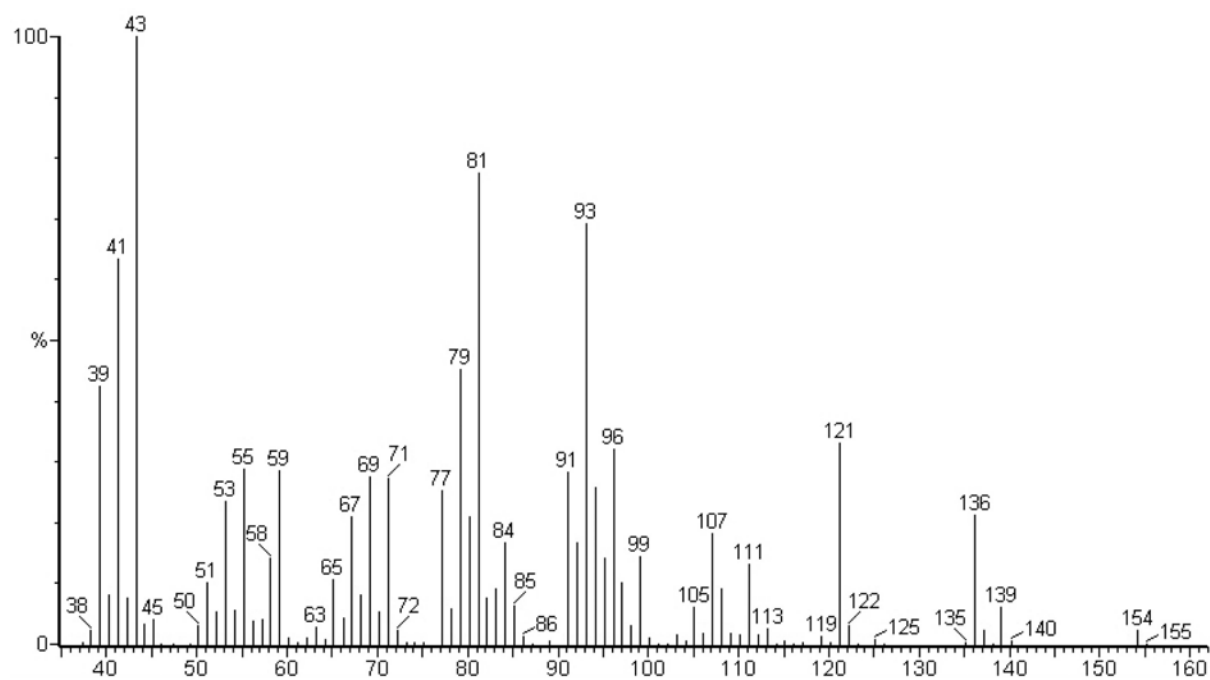
Spectre de masse du β -copaène **33**

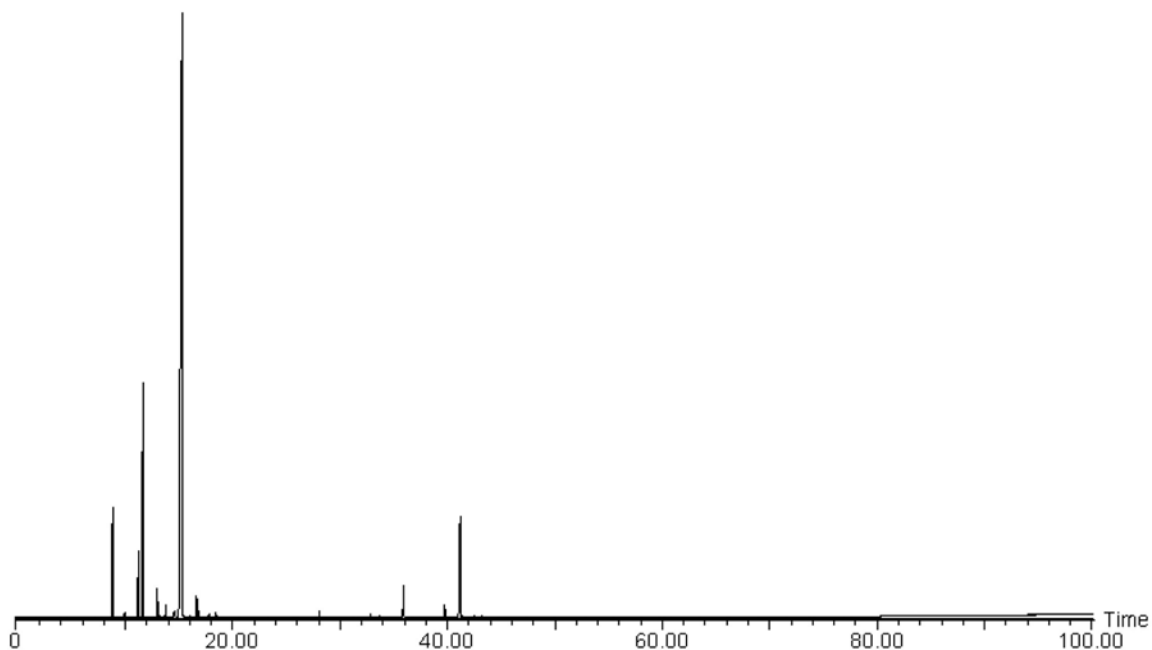


Spectre de masse de l' α -ylangène **34**

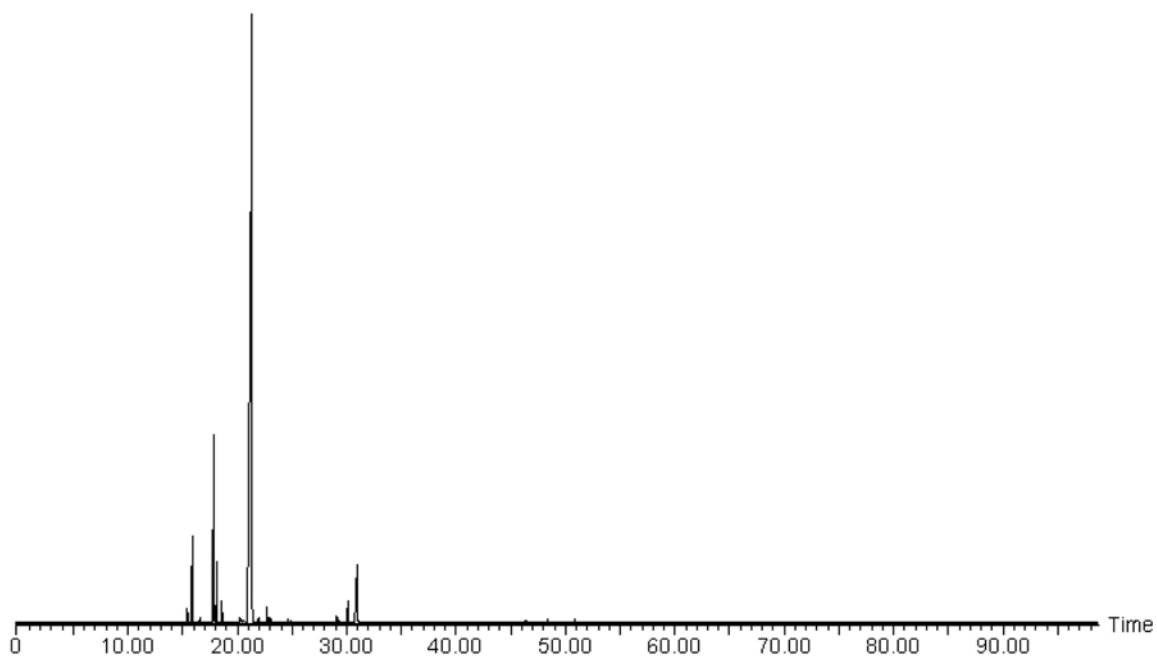


Spectre de masse du β -ylangène **35**

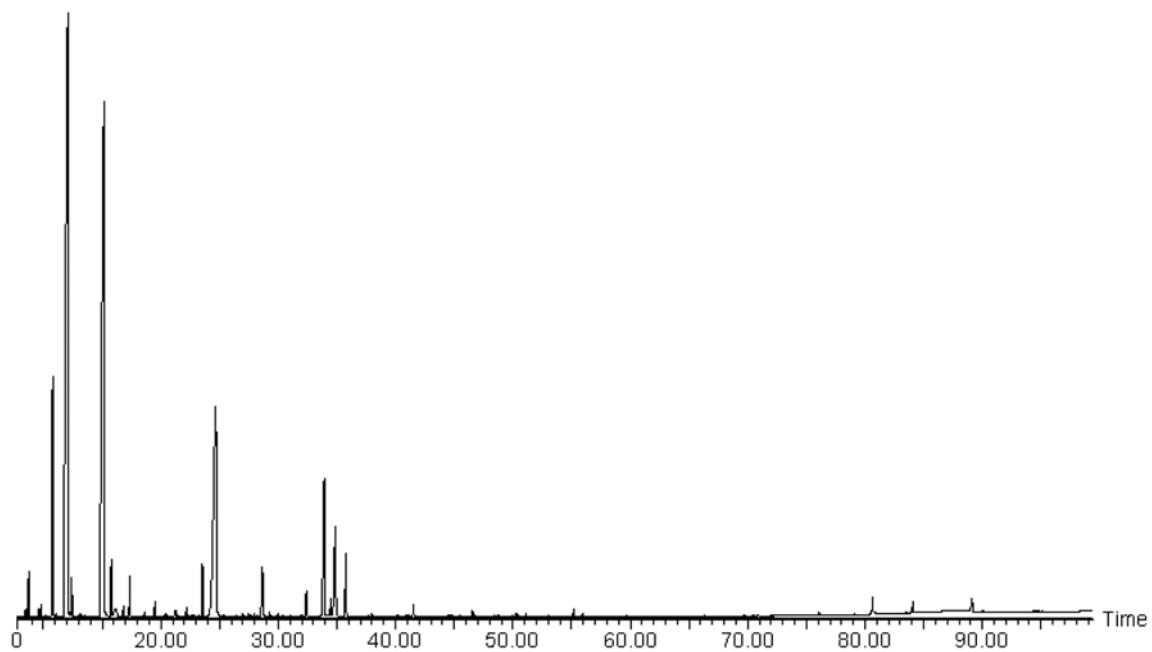
Spectre de masse de l' α -fenchène **36**Spectre de masse de l'exo-2,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol **37**



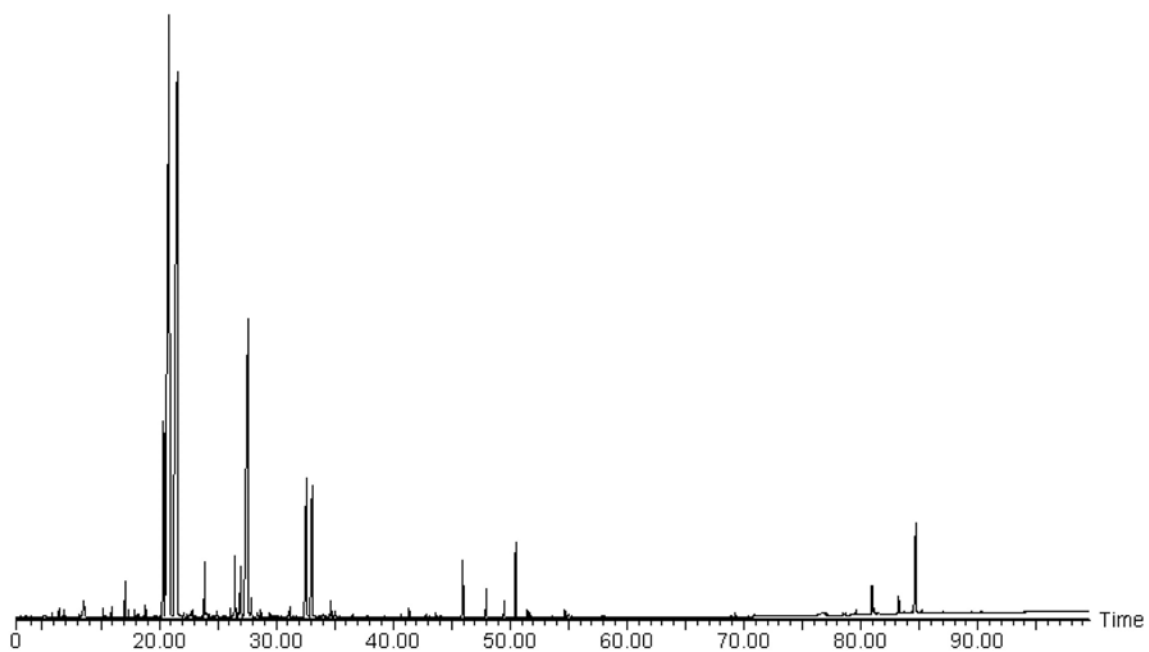
Chromatogramme de l'huile essentielle de *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. sur colonne polaire (Rtx-Wax ; 60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 μ m) ; programmation de température : de 60°C à 230°C, à 2°C/mn.



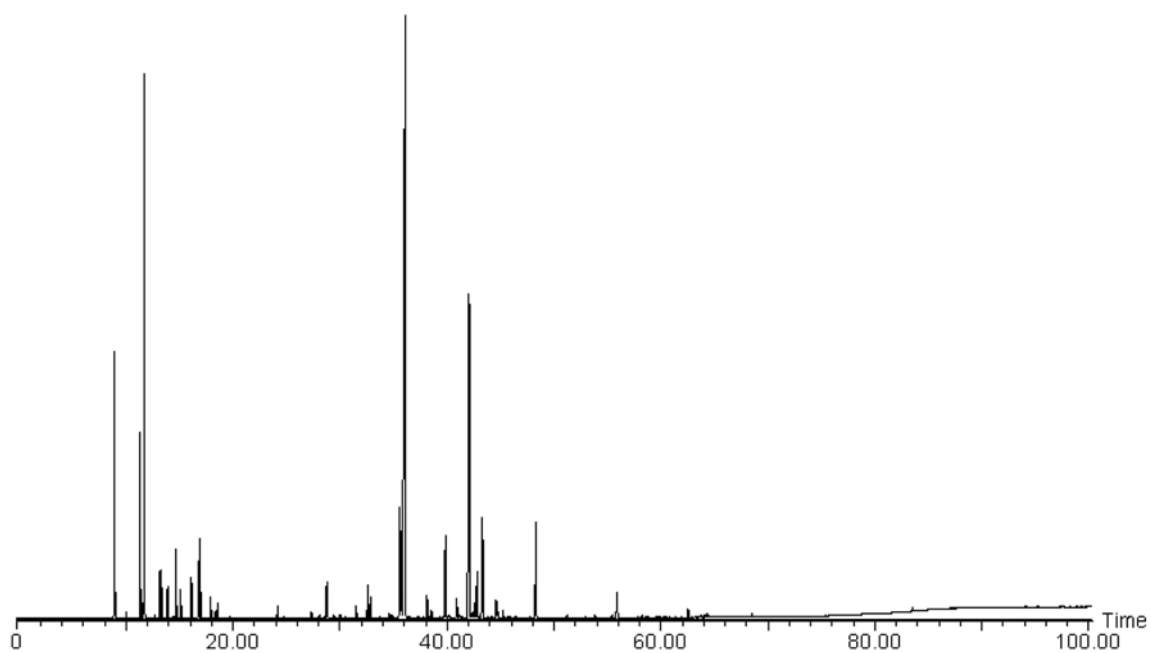
Chromatogramme de l'huile essentielle de *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. sur colonne apolaire (Rtx-1 ; 60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 μ m) ; programmation de température : de 60°C à 230°C, à 2°C/mn.



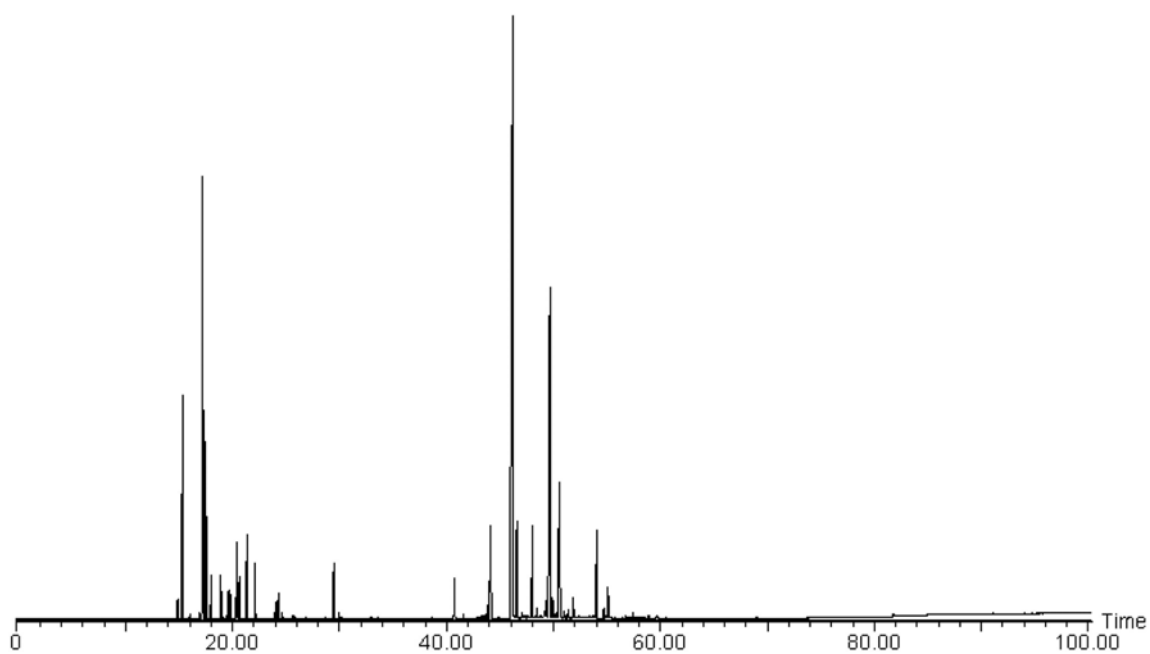
Chromatogramme de l'huile essentielle B de *Tagetes bipinata* L. sur colonne polaire.



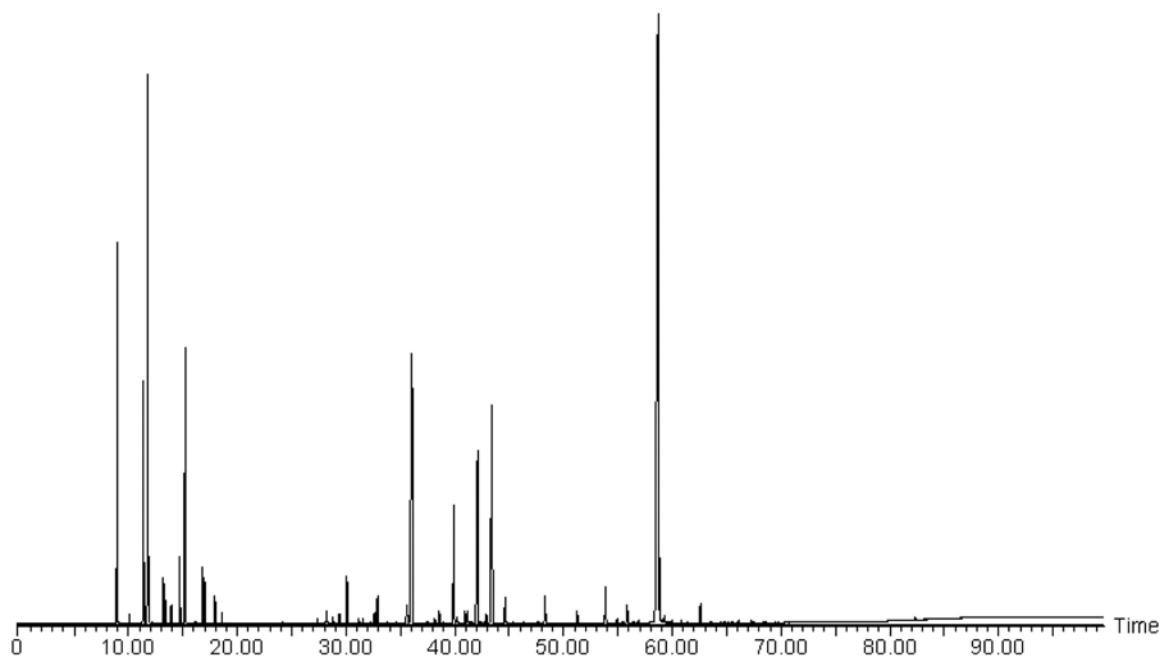
Chromatogramme de l'huile essentielle B de *Tagetes bipinata* L. sur colonne apolaire.



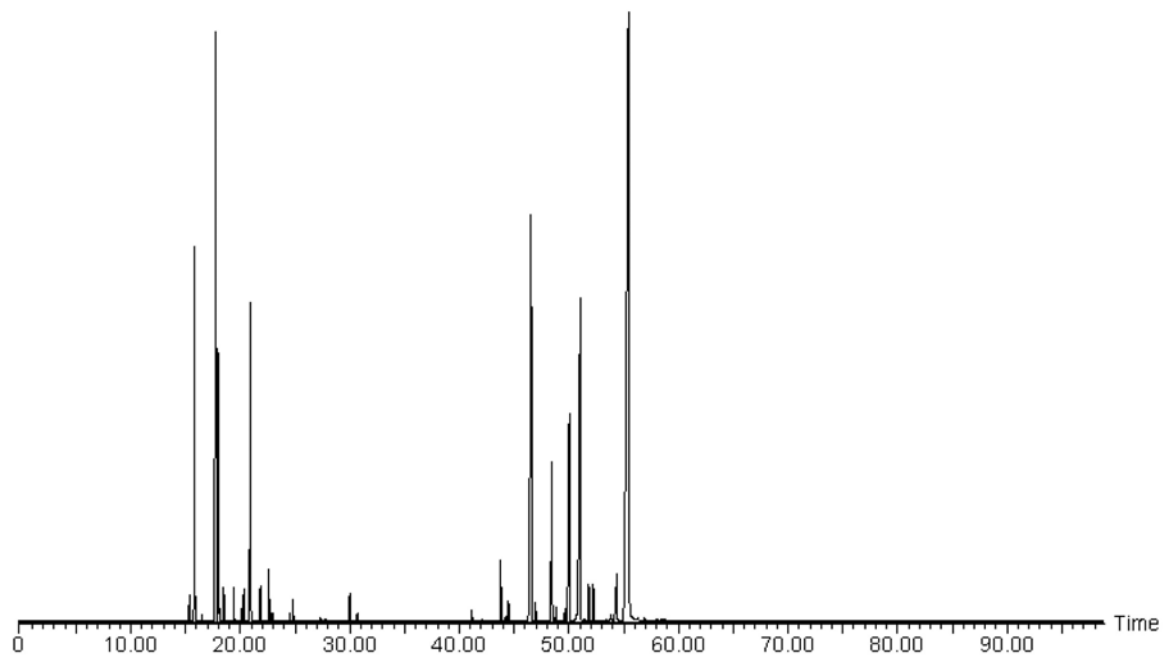
Chromatogramme de l'huile essentielle A de *Lantana camara* L. sur colonne polaire.



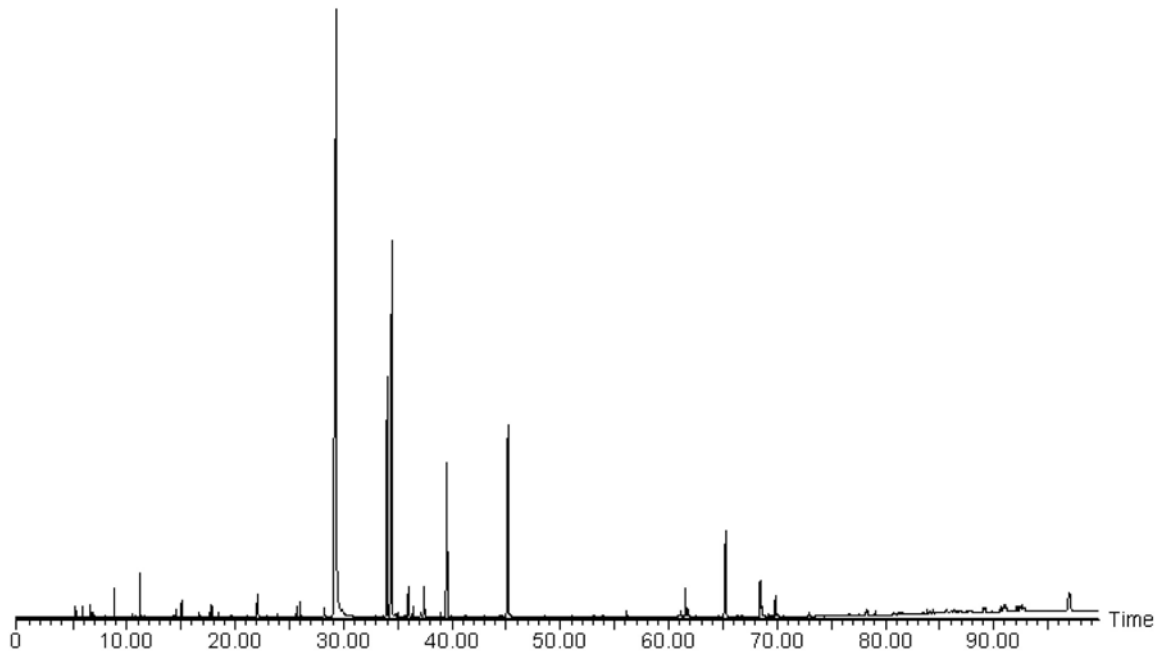
Chromatogramme de l'huile essentielle A de *Lantana camara* L. sur colonne apolaire.



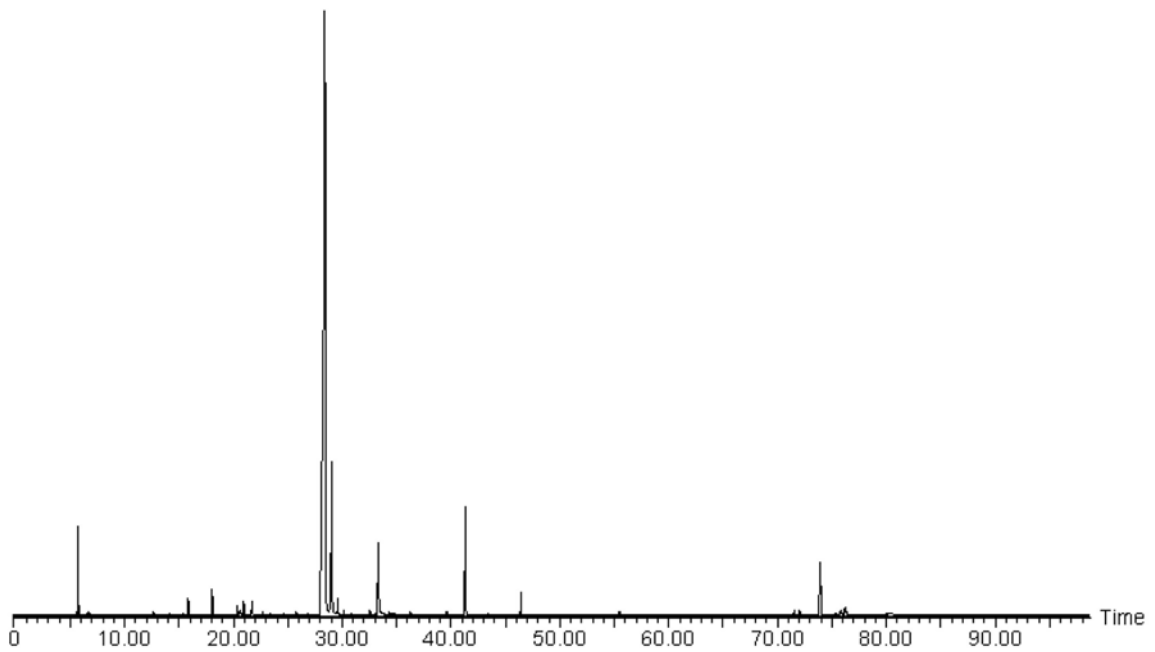
Chromatogramme de l'huile essentielle B de *Lantana camara* L. sur colonne polaire.



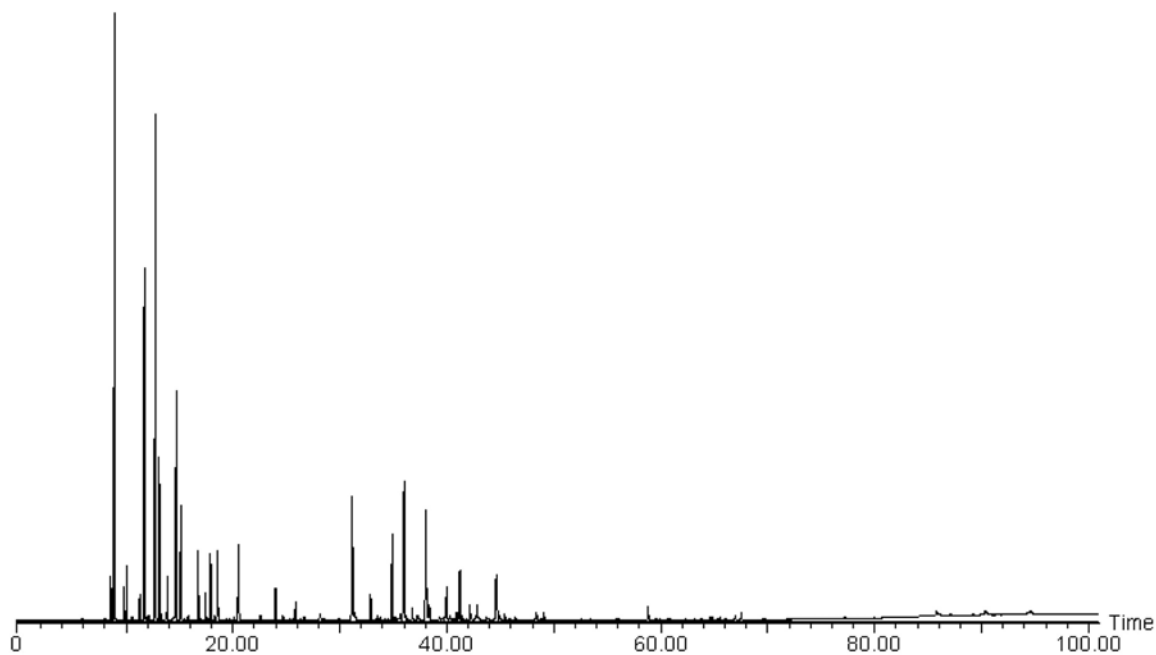
Chromatogramme de l'huile essentielle B de *Lantana camara* L. sur colonne apolaire.



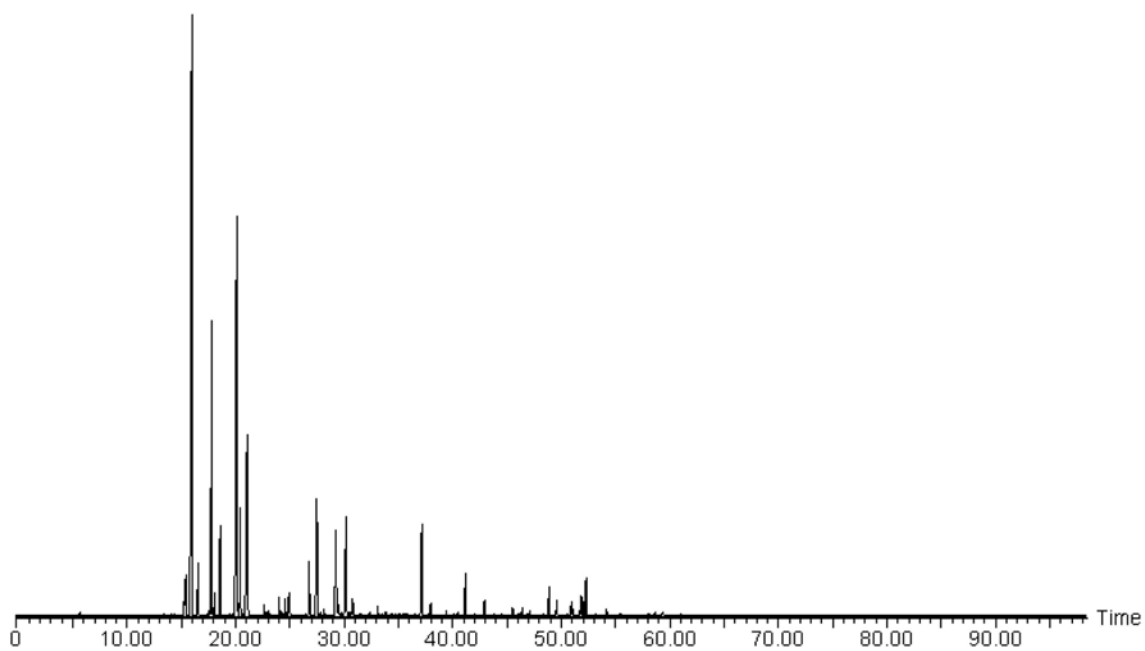
Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* Hooker
sur colonne polaire.



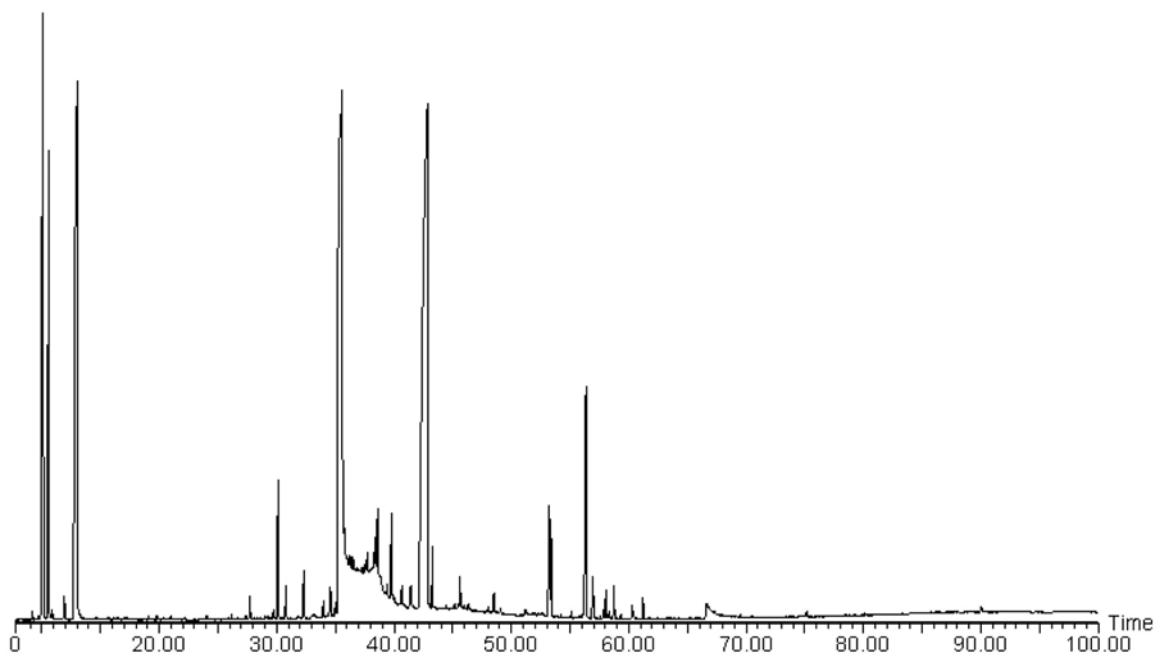
Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* Hooker
sur colonne apolaire.



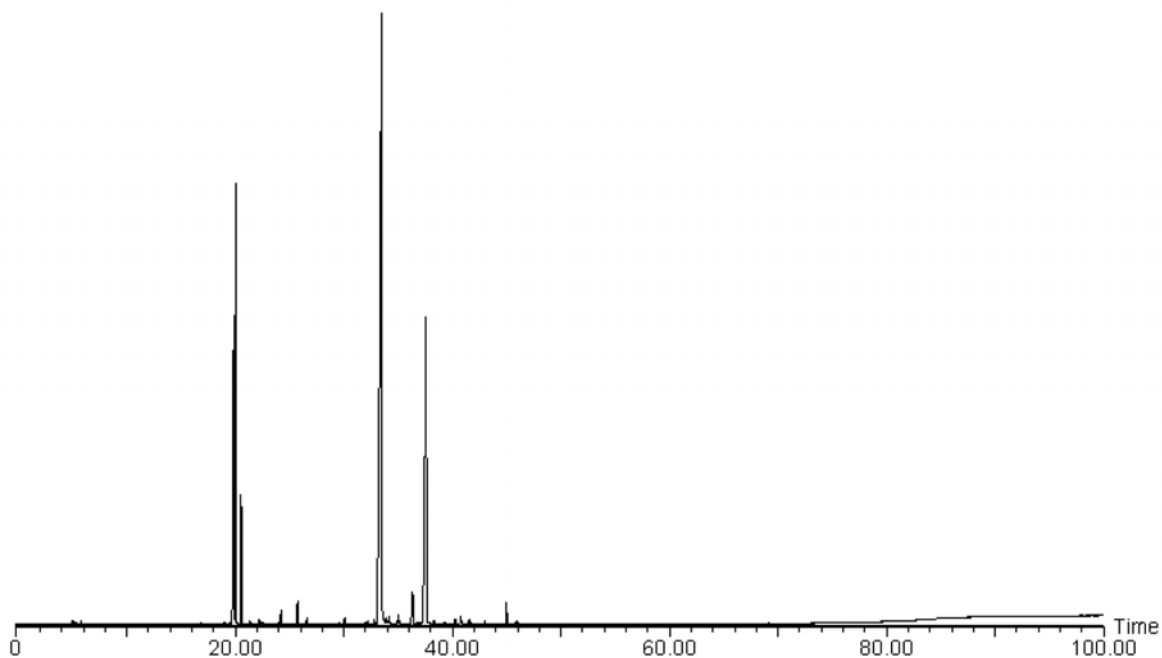
Chromatogramme de l'huile essentielle B de *Cupressus lusitanicus* Miller
sur colonne polaire.



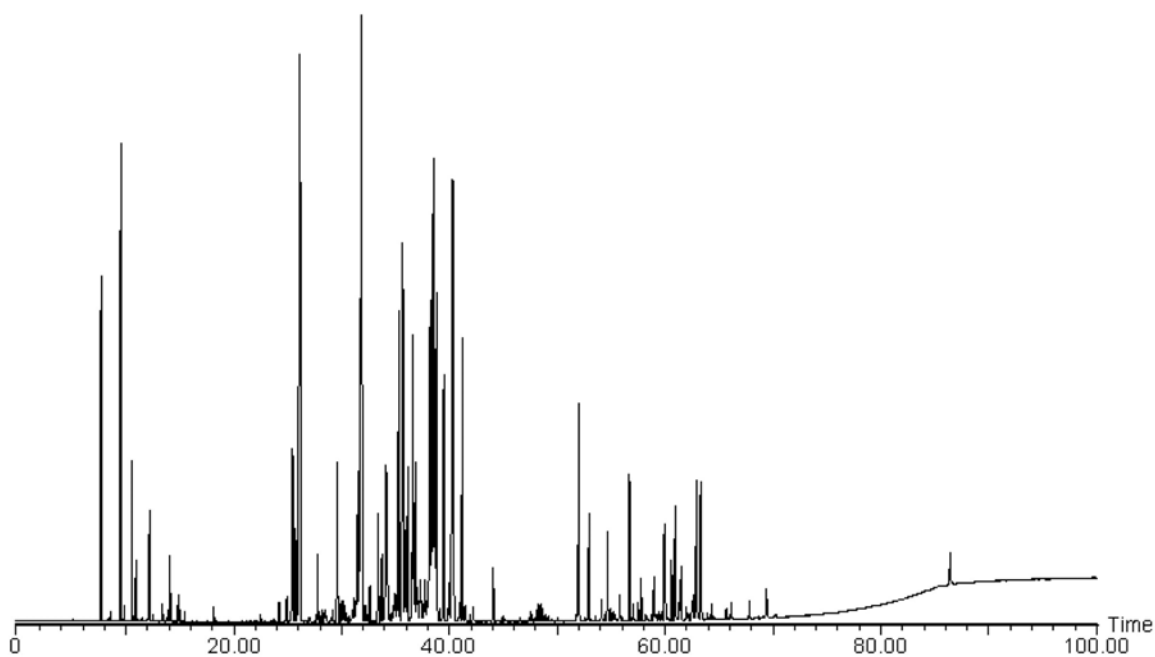
Chromatogramme de l'huile essentielle B de *Cupressus lusitanicus* Miller
sur colonne apolaire.



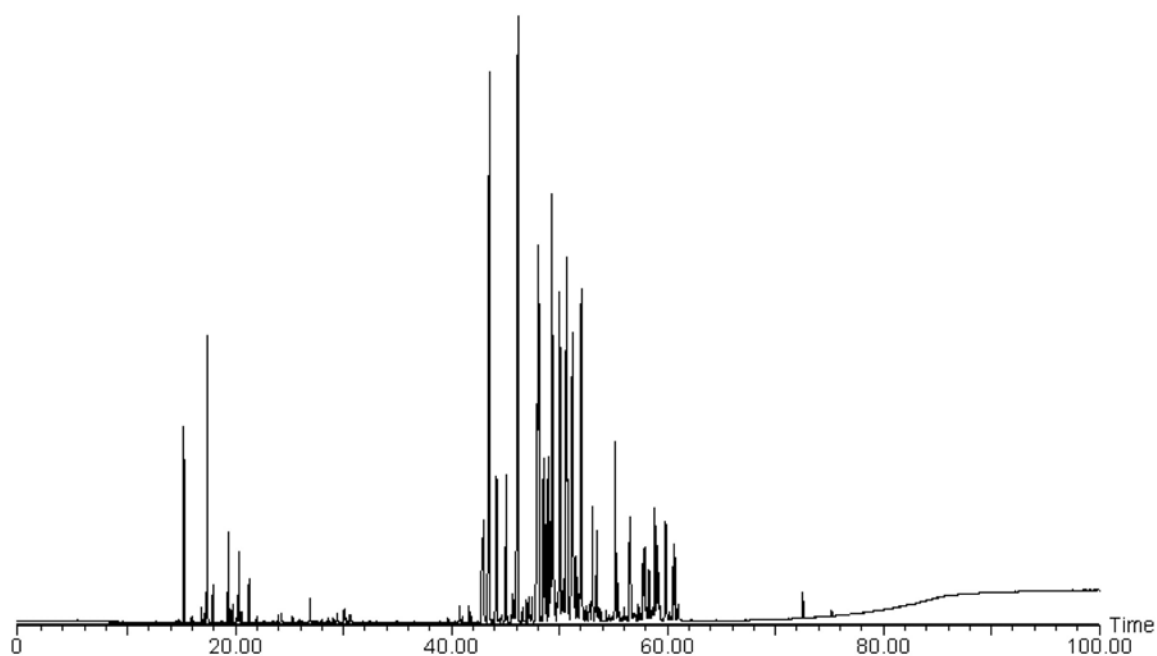
Chromatogramme de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* L.
sur colonne polaire.



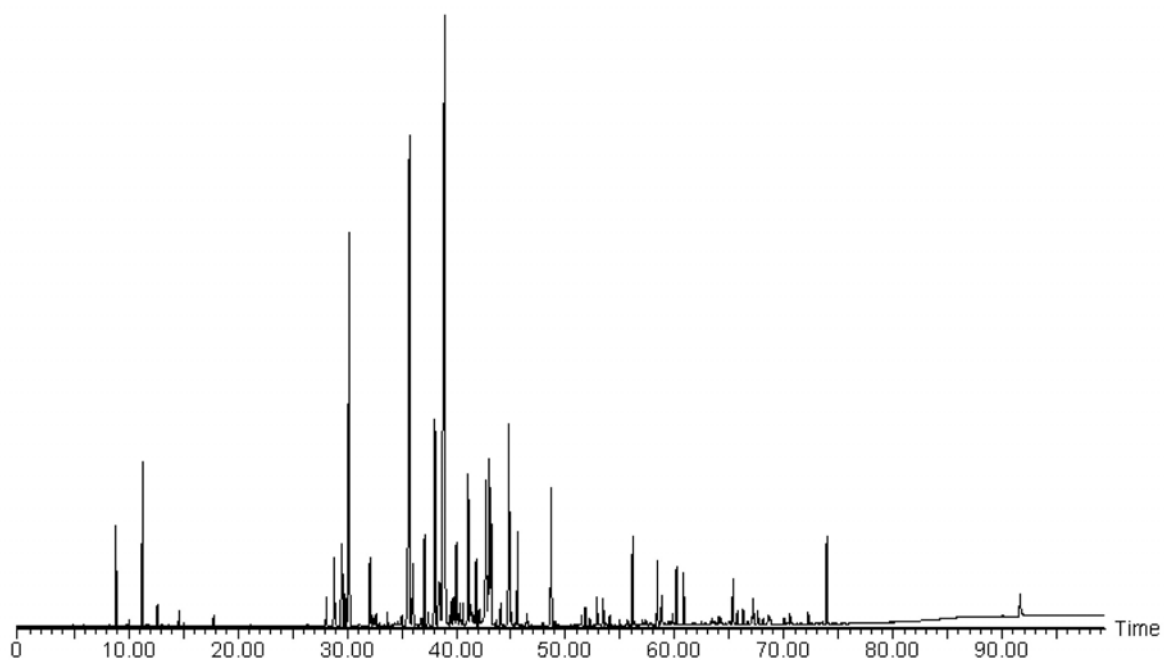
Chromatogramme de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* L.
sur colonne apolaire.



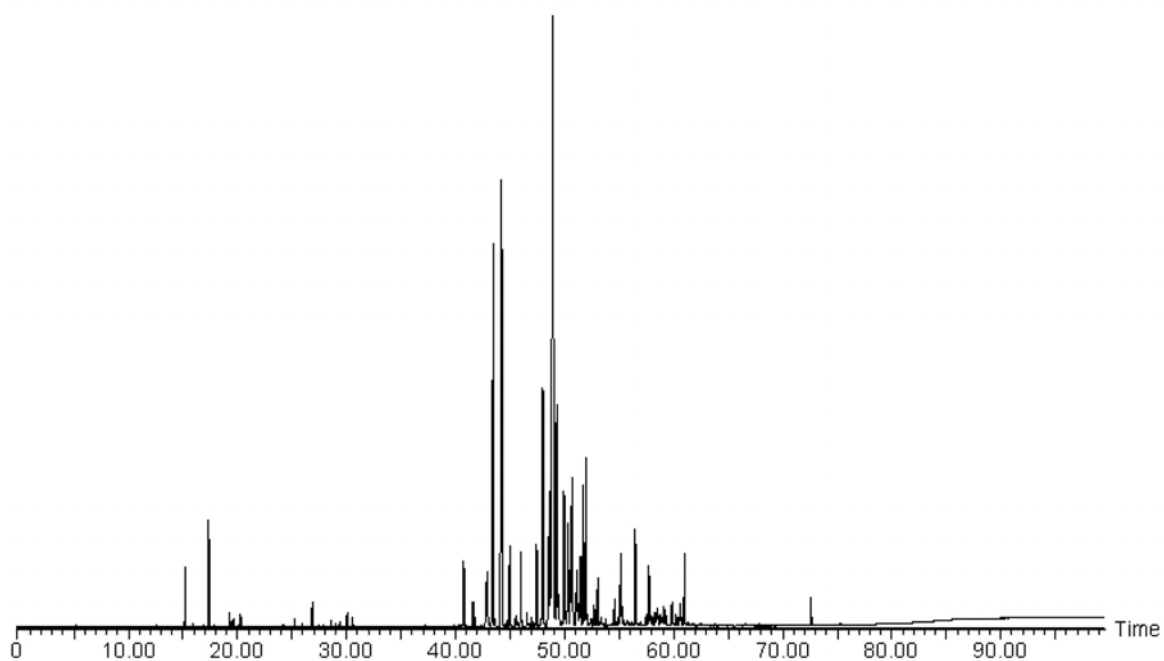
Chromatogramme de l'huile essentielle A de *Cedrelopsis grevei* Baillon
sur colonne polaire.



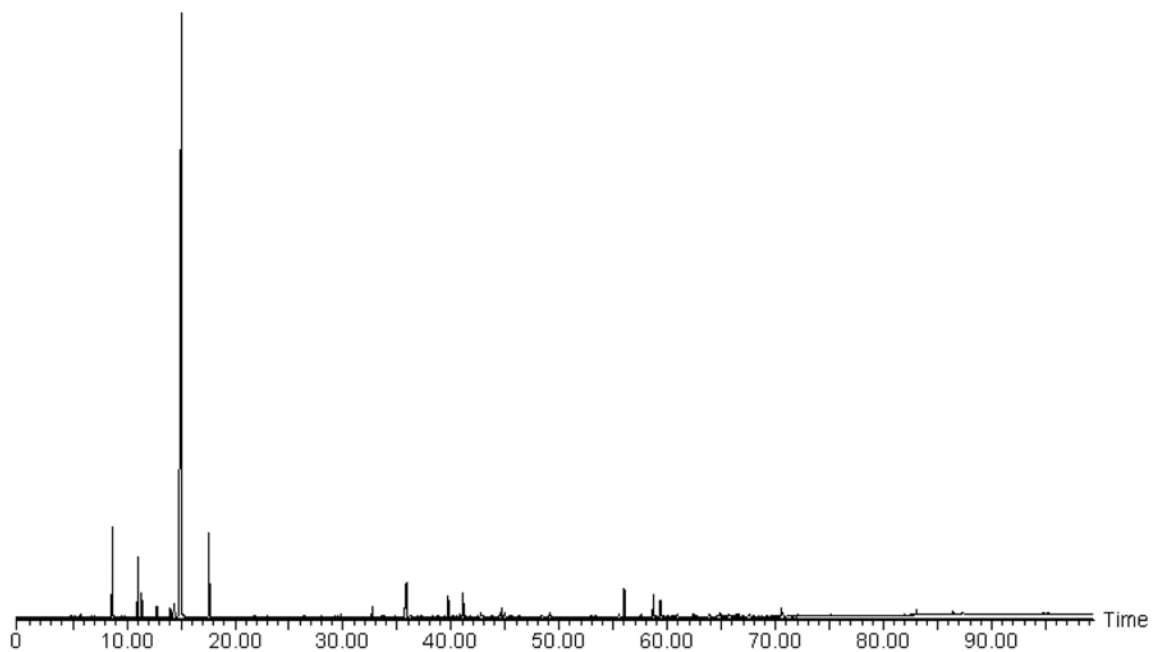
Chromatogramme de l'huile essentielle A de *Cedrelopsis grevei* Baillon
sur colonne apolaire.



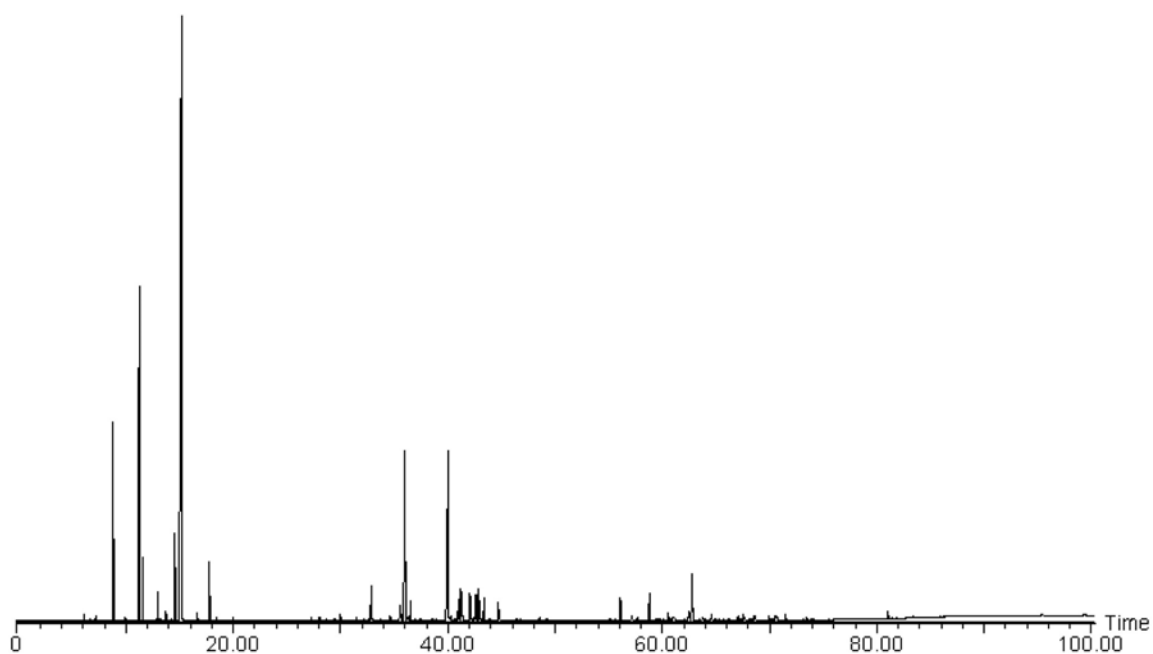
Chromatogramme de l'huile essentielle F de *Cedrelopsis grevei* Baillon
sur colonne polaire.



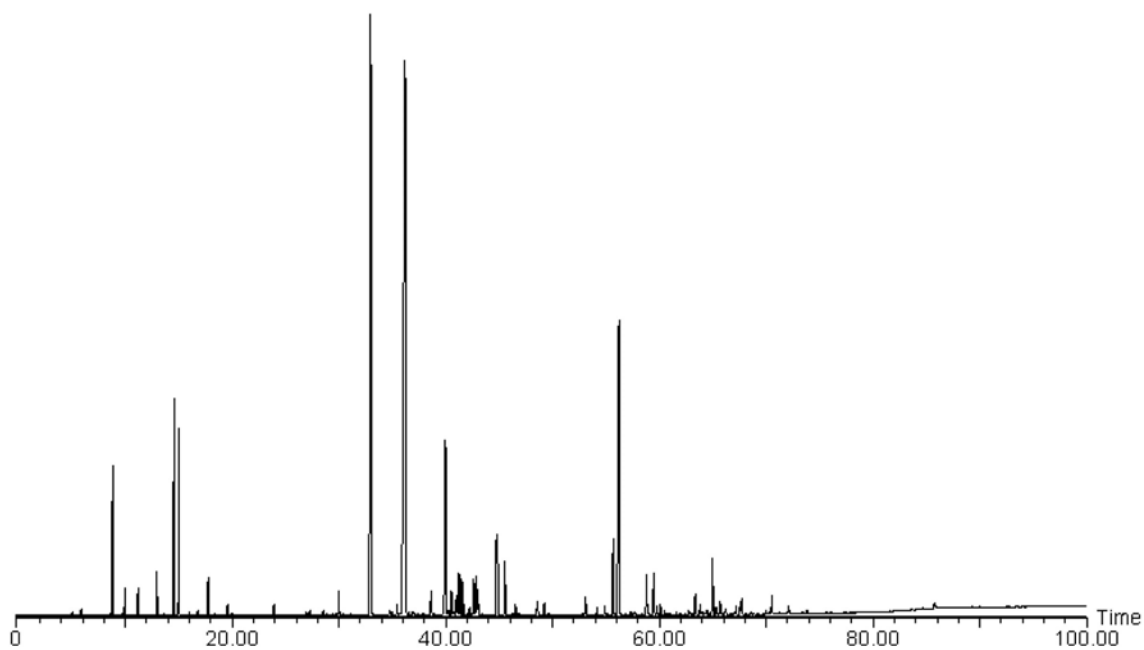
Chromatogramme de l'huile essentielle F de *Cedrelopsis grevei* Baillon
sur colonne apolaire.



Chromatogramme de l'huile essentielle A1 d'*Helichrysum gymnocephalum*
(DC) H. Humbert sur colonne polaire.

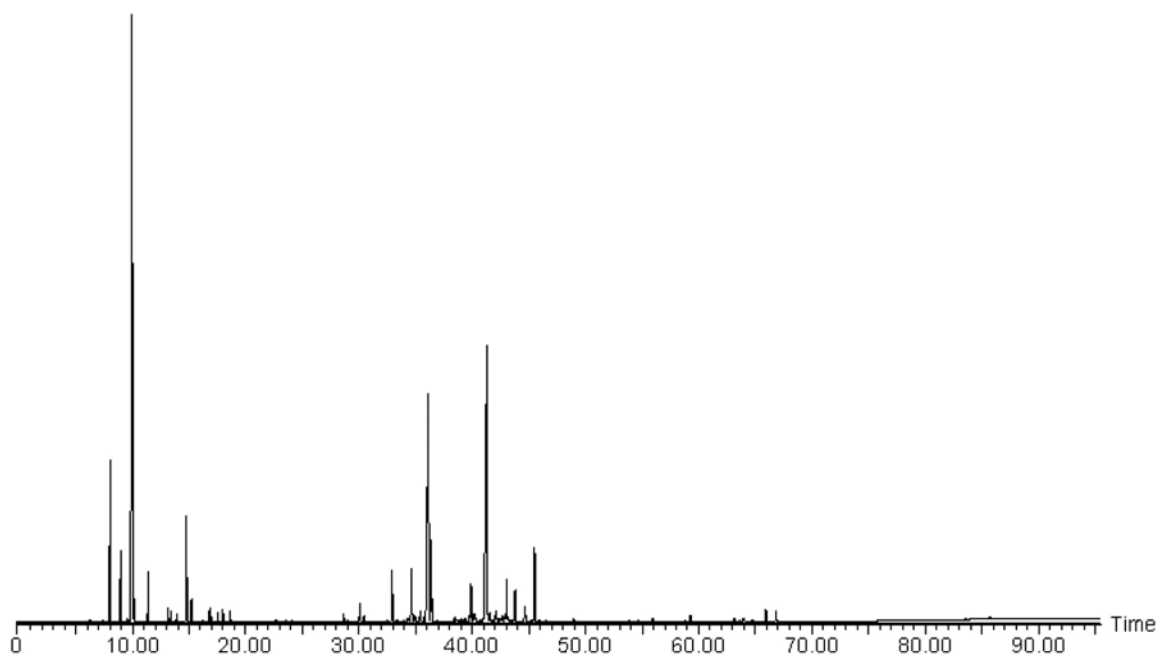


Chromatogramme de l'huile essentielle B1 d'*Helichrysum bracteiferum*
(DC) H. Humbert sur colonne polaire.



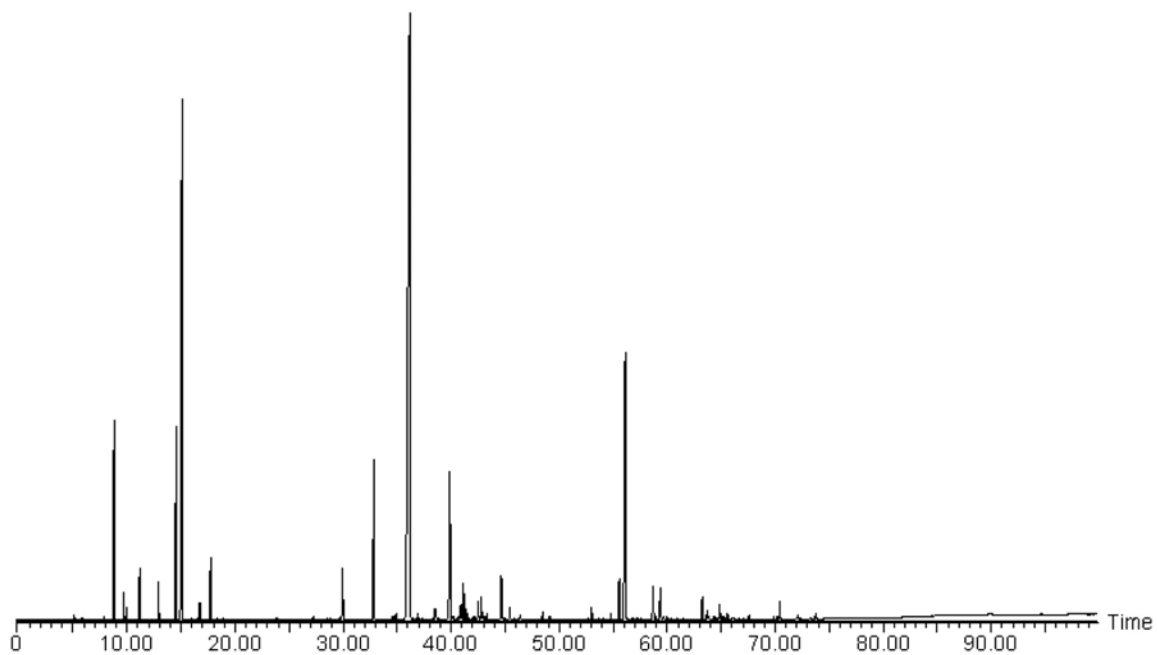
Chromatogramme de l'huile essentielle C1 d'*Helichrysum faradifani*

Sc. Ell. sur colonne polaire.

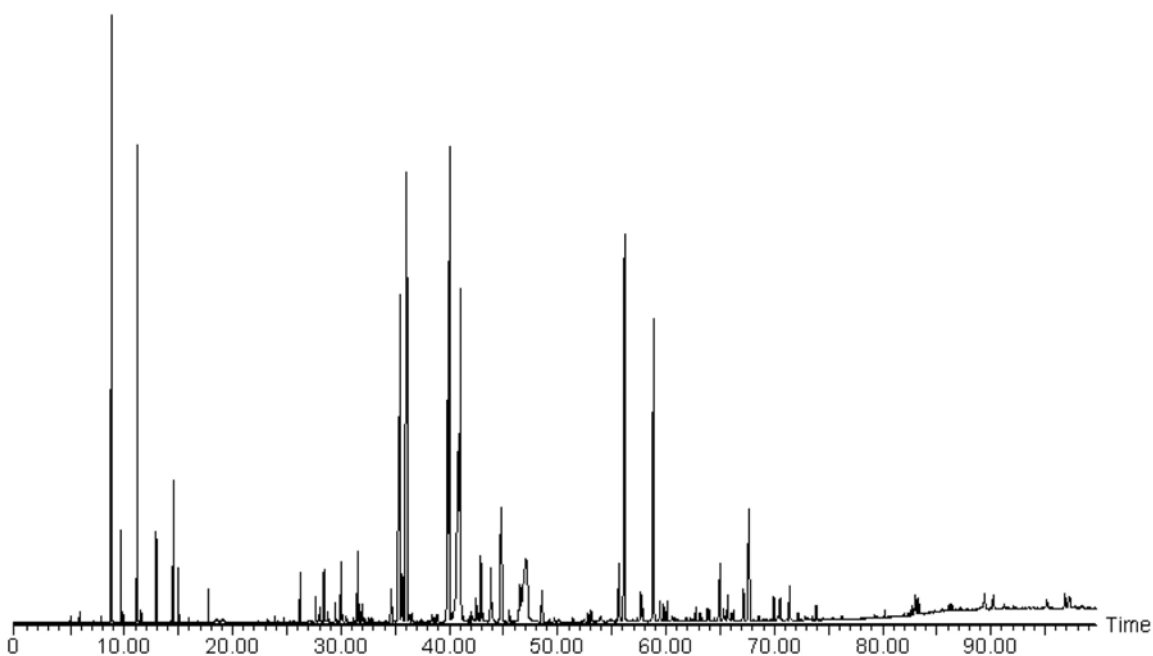


Chromatogramme de l'huile essentielle C2 d'*Helichrysum faradifani*

Sc. Ell. sur colonne polaire.



Chromatogramme de l'huile essentielle F d'*Helichrysum hypnoides*
(DC) R. Vig. et H. Humb. sur colonne polaire.



Chromatogramme de l'huile essentielle G d'*Helichrysum* sp. sur colonne polaire.

RESUME

Cette étude a pour objectif d'une part, de développer une méthode d'analyse des huiles essentielles basée sur la combinaison du couplage CPG/SM et de la RMN du carbone-13, avec ou sans fractionnement, en utilisant les données de la littérature, en reconstruisant les spectres de molécules absentes de nos bibliothèques et d'autre part, de contribuer à une meilleure connaissance de l'huile essentielle de diverses plantes de Madagascar, endémiques ou introduites, en les caractérisant et en décrivant une éventuelle variabilité chimique.

Ainsi, nous avons étudié divers échantillons d'huiles essentielles malgaches : *Cinnamomum camphora*, *Tagetes bipinata*, *Lantana camara*, *Eucalyptus citriodora*, *Cupressus lusitanicus* et *Chenopodium ambrosioides*. Nous avons montré l'intérêt de l'utilisation combinée de la CPG/SM et de la RMN du carbone-13. Cette dernière nous a permis d'identifier efficacement des composés délicats à analyser par les techniques conventionnelles, en particulier des molécules ayant des structures très proches (stéréoisomères de l'isopulégol, hydrates de menthol, cubébol et épi-cubébol) ou des molécules thermosensibles (ascaridole).

Nous avons également étudié une plante endémique de Madagascar : *Cedrelopsis grevei*. Nous avons analysé six échantillons d'huile essentielle et réalisé un fractionnement poussé de l'un d'entre eux. Ce fractionnement nous a permis d'identifier 115 composés, parmi lesquels nous trouvons un très grand nombre de molécules sesquiterpéniques hydrocarbonées et oxygénées. Les deux principaux constituants sont l'ishwarane et le (E)-caryophyllène. L'identification de ces constituants a été réalisée grâce aux bibliothèques de spectres constituées au laboratoire (SM et RMN ¹³C), mais également pour certains d'entre eux, à partir des données de la littérature ou par reconstruction du spectre de RMN à partir de molécules de référence.

Enfin, nous avons montré la variabilité interspécifique des huiles essentielles du genre *Helichrysum*. *Helichrysum gymnocephalum* et *H. bracteiferum* sont toutes les deux caractérisées par la prédominance du 1,8-cinéole. Un autre monoterpène, le β -pinène, est le constituant majoritaire de l'huile essentielle d'*H. selaginifolium*. Pour *H. faradifani*, nous avons décrit deux compositions chimiques très différentes : la première de type α -fenchène/ γ -curcumène/(E)-caryophyllène et la seconde de type (E)-caryophyllène/linalol/ α -humulène. Le (E)-caryophyllène est également le composé majoritaire des huiles essentielles d'*H. hypnoides*, d'*H. cordifolium* et d'*Helichrysum* sp.

DISCIPLINE :

Chimie Organique et analytique

MOTS CLES

Huiles essentielles - Madagascar - CPG/SM - RMN du carbone-13 - Terpènes - *Helichrysum* - *Cedrelopsis grevei* - *Chenopodium ambrosioides* - *Cupressus lusitanicus* - *Eucalyptus citriodora* - *Lantana camara* - *Tagetes bipinata* - *Cinnamomum camphora* - Ishwarane - Dihydroagarofurane - Davanone - Ascaridole -

ABSTRACT

This study aims at on the one hand, to develop a method of analysis of essential oils based on the combination of GC-MS and Carbon-13 NMR, with or without fractionation, using the literature data, by rebuilding the molecules spectra absent from our libraries and on the other hand, to contribute to a better knowledge of the essential oil of various plants of Madagascar, endemic or introduced, by characterising them and by describing a possible chemical variability. These analyses enabled us to identify effectively delicate compounds to analyse by the conventional techniques (stereoisomers, heat-sensitive molecules). We also studied six samples of *Cedrelopsis grevei* and carried out an important fractionation of the one of them, which enabled us to identify many sesquiterpenes. Finally, we showed the interspecific variability of essential oils of the *Helichrysum* genus.
